



VNiVERSiDAD D SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR

TESiS DOCTORAL

Regulación de la diferenciación megacariocítica por PTP-Bas y especies reactivas del oxígeno

JOSÉ LViS SARDiNA ORTEGA
Salamanca, 2010



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

*Campus Miguel de Unamuno - Edificio Departamental
Pza. Doctores de la Reina s/n 37007 Salamanca. Spain.
Tel.+34-923 294 465 Fax:+34-923 294 579*

D. ÁNGEL HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ Y D. JESÚS SÁNCHEZ YAGÜE, Profesores Titulares de Universidad del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICAN:

Que la presente Memoria de Tesis Doctoral titulada ***“Regulación de la diferenciación megacariocítica por PTP-Bas y especies reactivas del oxígeno”***, que para optar al Grado de Doctor en Biología presenta D. JOSÉ LUIS SARDINA ORTEGA, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

Considerando que la Tesis Doctoral se halla concluida, autorizamos su presentación para que sea juzgada por el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmamos el presente documento en Salamanca a veintiuno de septiembre de dos mil diez.

Fdo.: Ángel Hernández Hernández

Fdo.: Jesús Sánchez Yagüe



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

*Campus Miguel de Unamuno - Edificio Departamental
Pza. Doctores de la Reina s/n 37007 Salamanca. Spain.
Tel.+34-923 294 465 Fax:+34-923 294 579*

JOSÉ LUIS SARDINA ORTEGA, Licenciado en Biología y Bioquímica por la Universidad de Salamanca,

CERTIFICO:

Que soy el Autor de la Tesis Doctoral titulada “**Regulación de la diferenciación megacariocítica por PTP-Bas y especies reactivas del oxígeno**”, realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca bajo la dirección del Profesor Dr. Ángel Hernández Hernández y del Profesor Dr. Jesús Sánchez Yagüe.

Y para que así conste, firmo el presente documento en Salamanca a veinte de septiembre de dos mil diez.

NOTA PRELIMINAR

Este trabajo de investigación ha sido financiado con cargo a los proyectos subvencionados por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (Plan I+D+i, “*Estudio de la función y de la regulación de la expresión de PTP-Bas durante la diferenciación megacariocítica*” Ref. BFU2006-10362 y “*Papel de las especies reactivas del oxígeno en la megacariopoyesis y eritropoyesis: origen y mecanismo de acción*” Ref. BFU 2009-10568) y la Junta de Castilla y León (“*Función de PTP-Bas durante la megacariopoyesis. Regulación de su expresión génica*” SA126A071 y “*Papel de las especies reactivas del oxígeno en la megacariopoyesis*” SA010A10-2).

El autor de la Memoria ha disfrutado de una Beca de Formación de Personal Investigador de la Junta de Castilla y León (Junio 2006-Junio 2010).

Los resultados recogidos en esta Memoria han sido en parte publicados en un artículo y presentados en los siguientes Congresos:

Artículo:

J.L. Sardina, G. López-Ruano, L.I. Sánchez-Abarca, J.A. Pérez-Simón, A. Gaztelumendi, C. Trigueros, M. Llanillo, J. Sánchez-Yagüe, A. Hernández-Hernández. *p22^{phox}-dependent NADPH oxidase activity is required for megakaryocytic differentiation.*

Cell Death & Differentiation (2010). DOI:10.1038/cdd.2010.67.

Congresos:

1. **J.L. Sardina**, P.A. Mateos-Gómez, M. Pierna, M. Llanillo, J. Sánchez-Yagüe & A. Hernández-Hernández. *PTPase activity and SHP-1, SHP-2 and PTP1B expression in the early phase of PMA-induced myeloid differentiation of K562 and HEL cells.* **Europhosphatases 2007.** Organizado por EMBO-FEBS. Aveiro (Portugal), 24-28 de julio de 2007. Presentación de Póster. Becado por la FEBS.
2. **J.L. Sardina**, M. Llanillo, J. Sánchez-Yagüe & A. Hernández-Hernández. *Análisis de la expresión de SHP-1, SHP-2 y PTP1B durante la diferenciación megacariocítica.* **XXXI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular.** Bilbao (España). 10-13 Septiembre 2008. Presentación de Póster. Libro de resúmenes, pag 179.
3. **J.L. Sardina**, G. López-Ruano, M. Llanillo, J. Sánchez-Yagüe & A. Hernández-Hernández. *Análisis de las vías de señalización que regulan la diferenciación megacariocítica.* **XXXII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y**

Biología Molecular. Oviedo (España). 23-26 Septiembre 2009. Presentación de Póster. Libro de resúmenes, pag 185.

4. **J.L. Sardina**, G. López-Ruano, L.I. Sánchez-Abarca, J.A. Pérez-Simón, A. Gaztelumendi, C. Trigueros, M. Llanillo, J. Sánchez-Yagüe, & A. Hernández-Hernández. *p22^{phox}-dependent NADPH oxidase activity is required for megakaryocytic differentiation.* **International Symposium on the Pathophysiology of Reactive Oxygen and Nitrogen Species.** Salamanca (España). 19-21 Mayo 2010. Presentación Oral. Libro de resúmenes, pag 88.
5. G. López-Ruano, **J.L. Sardina**, S. Giancane, B. Sánchez-Sánchez, J. Sánchez-Yagüe, M. Llanillo, & A. Hernández-Hernández. *Regulación de la diferenciación megacariocítica por especies reactivas del oxígeno y proteína tirosina fosfatasas.* **XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular.** Córdoba (España). 14-17 Septiembre 2010. Presentación de Póster. Libro de resúmenes, pag 214

Al Dr. Ángel Hernández Hernández, quién me ha dado las alas y me ha enseñado a usarlas correctamente para poder volar por el, a veces, laberíntico mundo de la investigación científica. Así como también, por las correcciones y consejos fundamentales aportados durante la redacción de este manuscrito.

Al Dr. Jesús Sánchez Yägue, cuyas correcciones han contribuido a mejorar notablemente esta memoria. Así como también por sus consejos e ideas.

Al Dr. Luis Ignacio Sánchez-Abarca, de cuya mano me introduje en el campo de la citometría de flujo, por su amabilidad y simpatía.

A todos los profesores del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, con los que he convivido durante los últimos cinco años. Gracias por crear un ambiente familiar y distendido en el Departamento. Especialmente a Marcial, Pablo, Enrique, Isabel, Valery, Nieves y Carmen.

A la Dr. Dominique Bonnet, por acogerme amablemente durante mi estancia en su laboratorio del London Research Institute (Cancer Research U.K). Así como también a todos los compañeros con los que pude trabajar durante ese tiempo en dicho centro.

A todos los becarios del Departamento con los que he tenido el placer de trabajar. Vosotros sois los que hacéis que este trabajo merezca la pena en los momentos más duros. Especialmente a Fernando con quien aún tengo la suerte de seguir trabajando, aunque ya le tenga que tratar de Doctor. Así como también a Javi, Sara, Nazaret, Lorena, Juanjo, Juan y Lorena Zancada.

A todos mis compañeros del laboratorio 106. Especialmente al Dr. José Ignacio Sánchez Gallego. Fuente inagotable de alegría y buen humor, porque los días en el labo son un poquito más largos desde que se fue a Suecia. Por supuesto, a Guillermo con el que llevo trabajando codo con codo los últimos dos años compartiendo alegrías y frustraciones. Así como también, al resto de compañeros que están o han estado de una forma más o menos duradera en el laboratorio: Bea, Serena, Miriam y especialmente Pedro.

A mis padres, José Luis y Manoli, ejemplo diario de trabajo y esfuerzo. Valores que me han sabido inculcar y que han resultado imprescindibles para poder llevar a buen puerto esta Tesis Doctoral.

A Ernesto, buen amigo y mejor hermano.

A mis amigos, no os puedo nombrar a todos. Vosotros sabéis quienes sois. Especialmente a Ana, quién siempre ha estado a mi lado dándome su apoyo incondicional.

Y finalmente, a todas las demás personas que de un modo u otro me han ayudado a realizar este trabajo.

Abreviaturas

7-AAD: 7-Aminoactinomicina D

Ac: Anticuerpo.

ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia.

Akt = PKB (Protein Kinase B): Proteína quinasa B.

AMPc: Adenosina 3',5'-monofosfatocíclico.

APC: Aloficocianina.

ARE (antioxidant-responsive element): Elemento de respuesta a antioxidantes.

BFU-E (Burst forming unit erythroid): Unidades explosivas formadoras de eritrocitos.

BFU-MK (Burst forming unit megakaryocyte): Unidades explosivas formadoras de megacariocitos.

BSA: Seroalbúmina Bovina.

CD ([cluster of differentiation](#)): Grupo de diferenciación. Ej: CD45, CD61, CD42b, CD95.

Cdc(s) (Cell Division Cycle): Fosfatasa de ciclo celular.

Células HEK293 (human embryonic kidney 293 cells): Línea celular obtenida a partir de células tumorales de riñón embrionario humano.

CFU-MK (Colony-Forming Unit Megakaryocytes): Unidades formadoras de megacariocitos.

CMEP: Progenitor eritro-mieloide común.

CML: Leucemia mielogénica crónica.

CMLP: Progenitor linfo-mieloide común.

CMP (Common Myeloid Progenitor): Progenitor mieloide común.

CLP (Common Lymphoid progenitor): Progenitor linfoide común.

CSF-1 (Colony Stimulating Factor): Factor estimulador de colonias.

DCF: 2',7'-diclorofluoresceína.

DCFDA: 2',7'-diacetato de diclorohidrofluoresceína.

DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium): Medio de Eagle modificado por Dulbeco.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

CR-1(Complement Receptor-1): Receptor del Complemento 1.

dH₂O: Agua ultrapura.

dNTPs ([deoxyribonucleoside triphosphate](#)): desoxirribonucleósidos trifosfato.

DAG: Diacilglicerol

Dominio FERM (Four point one/Ezrin/Radixin/Moesin): Dominio homólogo a las proteínas Ezrina, Radixina y Moesina.

Dominio KIND (Kinase non catalytic C-lobe domain): Dominio no catalítico homólogo a los dominios kinasa.

Dominio PEST: Secuencia rica en aminoácidos prolina, glutamato, serina y treonina.

Dominio PDZ (PSD-95/*Drosophila* disc large/Zonula occludens): Dominio homólogo a los de la proteína PSD-95 de *Drosophila*, originalmente identificado como regiones repetitivas de homología entre el producto del supresor génico tumoral dgl *Drosophila* y la proteína sináptica PSD-95.

Dominio SH2 (Src homology 2 domain): Dominios homólogos al dominio 2 de la proteína Src.

DPI: difenil iodonium.

DSPs: Proteína tirosina fosfatasas de especificidad dual

DTT: Ditioneitol.

EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid): Ácido etilendiaminotetraacético.

EPO: Eritropoyetina.

EpoR: Receptor de eritropoyetina.

ERK (Extracellular-signal-regulated kinase): Quinasa reguladas por señales extracelulares.

F-Actina: Actina fibrilar.

FBS: Suero Fetal Bovino.

FGF4 (Fibroblast Growth Factor-4): Factor de crecimiento de los fibroblastos 4.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3 ligand): Ligando de la Tirosina quinasa 3 de hígado fetal.

FSC (Forward Scatter): Dispersión frontal de luz.

FOG-1 (Friend of GATA-1): Proteína que actúa como un cofactor de GATA-1.

FOXOs (Forkhead O Transcription Factors): Factores de transcripción de la familia "Forkhead O".

G418: Sulfato de geneticina.

G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor): Factor estimulador de colonias de granulocitos.

GFP (Green Fluorescence Protein): Proteína verde fluorescente.

GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor): Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos.

GMLP: Progenitor granulo-monocítico-linfoide.

GMP (Granulocyte/Monocitic Progenitor): Progenitor granulo-monocítico.

GP (glycoprotein): Glicoproteína.

GpA: Glicoforina A.

GRX: Glutarredoxina

HSCs (Haematopoietic Stem Cells): Células madre hematopoyéticas.

LT-HSCs (Long Term HSCs): HSCs a largo plazo.

ST-HSCs (Short Term HSCs): HSCs a corto plazo.

UCB-HSCs (Umbilical Cord Blood HSCs): HSCs de sangre de cordón umbilical.

HPP-CFU-MK (High Proliferative Potencial Colony-Forming Unit Megakaryocyte):

Unidades formadoras de colonias de megacariocitos de alto potencial proliferativo.

HRP (Horseradish peroxidase): Peroxidasa de rábano.

I κ B α (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha): Factor inhibidor del Factor Nuclear kappa B.

ILs: Interleuquinas

IP: Ioduro de propidio.

IRS1 (Insulin receptor substrate 1): Receptor de insulina de sustratos tipo 1.

JAKs (Janus Kinases): Quinasas de la familia "Janus".

JNKs: Quinasas c-Jun N-terminal.

kDa: KiloDaltons.

LMPP: Progenitor Multipotente Linfoide.

LMWPTPs (Low Molecular Weight PTPs): PTPs de bajo peso molecular.

LSCs (Leukaemic Stem Cells): Células madre leucémicas.

MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases): Proteínas quinasas activadas por mitógenos.

MBP: Progenitor mielo-linfoide B.

M-CSF (Mastocyte Colony Stimulating Factor): Factor estimulante de colonias de mastocitos.

MEP= MkEP (Megakaryocyte/Erythroid Progenitor): Progenitor eritro-megacariocítico.

MEK=MKK (Mitogen-activated protein kinase kinase): Proteína quinasa quinasa activada por mitógeno.

MKs: Megacariocitos.

MOI: Multiplicidad media de infección.

MPP: Progenitor Multipotente.

MNCs: Células mononucleadas de baja densidad.

MTP: Progenitor mielo-linfoide T.

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.

N-CAM (Neural Cell Adhesion Molecule): Molécula de adhesión de células nerviosas.

NF-E2 (Nuclear Factor Erythroid-derived 2): Factor nuclear eritroide derivado 2.

NF- κ B (nuclear factor-kappa B): Factor nuclear kappa B.

NAC: N-Acetilcisteína

NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate): nicotin adenin dinucleótido fosfato.

NMDA: N-metil-D-aspartato.

NOXs: NADPH oxidasas

NRPTPs: Proteína tirosina fosfatasas de tipo no receptor o intracelulares.

O₂⁻: Anión superóxido.

OH⁻: Radical hidroxilo.

ORE (oxidative responsive element): Elemento de respuesta a ROS

PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis): Gel de electroforesis de poliacrilamida.

pb: Pares de bases.

PBS (Phosphate Buffer Saline): Tampón fosfato salino o solución amortiguadora de fosfatos.

PE: Ficoeritrina.

PerCP (peridinin chlorophyll protein): Proteína peridina clorofila.

PIP2: Fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato.

PI-3K (Phosphoinositide 3-kinase): Fosfatidilinositol 3 quinasa.

PKC: Proteína quinasa C.

aPKCs: PKCs atípicas.

cPKCs: PKCs clásicas.

nPKCs: PKCs novedosas.

PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate): Forbol 12-Miristato 13-Acetato.

ppm: partes por millón

Proteína(s) STAT(s) (Signal Transducers and Activators of Transcription): Proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción.

PTK(s): Proteína tirosina quinasa(s).

PTP(s): Proteína tirosina fosfatasa(s).

PTP-BL (PTP-Bas Like): PTP homóloga de PTP-Bas en ratones.

p/v: peso/volumen.

PVDF: Difluoruro de polivinilideno.

shRNA (short hairpin RNA): ARNs pequeños con forma de horquilla.

siRNA: ARNs pequeños de interferencia.

RNAasa A: Ribonucleasa A.

ROS (Reactive Oxygen Species): Especies reactivas del oxígeno.

rpm: Revoluciones por minuto.

RPTPs: Proteína tirosina fosfatasas de tipo receptor.

RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction): Transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa.

RTKs: Receptores tirosina quinasa.

SCF (Stem Cell Factor): Factor de células madre.

SDF-1 (Stromal cell-Derived Factor-1): Factor celular derivado del estroma 1.

SDS: Dodecil sulfato sódico.

SOD: Superóxido dismutasa.

SSC (Side Scatter): Dispersión lateral de luz.

TBS (Tris Buffer Saline): Tampón Tris Salino.

TCA: Ácido tricloroacético.

TEMED: *N,N,N',N'*-tetrametil-etilendiamida.

TMRE: Tetrametilrodamina etiléster.

TPA: O-tetradecanoilforbol 13-acetato.

TPO: Tombropoyetina.

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano.

TRX: Tiorredoxina.

Trolox: ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico.

TrxR: Tiorredoxina reductasa.

Tween 20: Polioxietileno 20 sorbitan monolaurato.

v/v: volumen/volumen.

U: Unidades enzimáticas.

XOR: Xantina Oxidoreductasa

Índice

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1. HEMATOPOYESIS	3
1.1. Células madre hematopoyéticas.....	3
1.2. Diferenciación hematopoyética	4
1.3. Principales citoquinas implicadas en la hematopoyesis.....	6
2. MEGACARIOPOYESIS.....	8
2.1. Citoquinas implicadas en la diferenciación megacariocítica.....	9
2.2. Megacariopoyesis independiente de TPO.....	11
2.3. Factores de transcripción implicados en la megacariopoyesis.....	13
3. ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ROS).....	15
3.1. Origen de los ROS.....	15
3.1.1. Cadena de transporte electrónico mitocondrial.....	16
3.1.2. Xantina Oxidorreductasa.....	17
3.1.3. NADPH oxidasas.....	17
3.2. Sistemas intracelulares de defensa frente a los ROS.....	18
➤ Sistema de la glutarredoxina.....	18
➤ Sistema de la tioredoxina.....	19
3.3. Implicación de los ROS en la biología de las HSCs.....	20
4. FOSFORILACIÓN EN TIROSINAS: PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASAS.....	24
4.1. Características estructurales y clasificación de las PTPs.....	24
➤ Clase I.....	25
1. PTPs clásicas.....	25
2. PTPs de especificidad dual (DSPs).....	26
➤ Clase II.....	26
➤ Clase III.....	27
➤ Clase IV.....	27
4.2. Regulación de la actividad PTP por oxidación.....	27
4.3. Implicación de las PTPs en la hematopoyesis.....	30
5. PTP-Bas.....	32
5.1. Estructura de PTP-Bas.....	32
5.2. Funciones de PTP-Bas.....	34
CAPÍTULO II: OBJETIVOS	39
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	43
1. APARATOS Y MATERIALES.....	45
1.1. Aparatos.....	46
1.2. Material biológico.....	46
1.2.1. Líneas celulares.....	46
1.2.2. Células primarias hematopoyéticas.....	46
1.2.3. Plaquetas humanas.....	47

1.2.4. Cepas bacterianas.....	47
1.3. Material informático.....	47
2. REACTIVOS.....	48
3. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES.....	51
3.1. Medios de cultivo celular.....	51
3.2. Medios de cultivo bacteriano.....	51
3.3. Disoluciones y tampones.....	51
4. MÉTODOS.....	53
4.1. Cultivos celulares y obtención de muestras.....	53
4.2. Diferenciación de las células CD34 ⁺ y las líneas celulares.....	53
4.3. Análisis de la diferenciación megacariocítica.....	54
4.3.1. Citometría de flujo.....	54
4.3.1.1. Análisis de la expresión de marcadores de superficie.....	55
4.3.1.2. Análisis del contenido de ADN.....	56
4.3.2. Microscopía óptica.....	57
4.4. Ensayos de viabilidad celular.....	58
4.5. Ensayos de proliferación mediante el sistema del MTT.....	58
4.6. Medida del potencial mitocondrial.....	59
4.7. Medida de los niveles de ROS intracelulares.....	59
4.8. Medida de la producción extracelular de anión superóxido (O ₂ ⁻).....	60
4.9. Obtención de los extractos celulares proteicos.....	61
4.10. Valoración de proteínas.....	61
4.11. Determinación de la actividad fosfotirosina fosfatásica.....	62
4.12. Análisis de la expresión de proteínas mediante transferencia de Western.....	62
4.12.1. SDS-PAGE.....	63
4.12.2. Transferencia de las proteínas a la membrana de PVDF.....	64
4.12.3. Incubación de la membrana con los anticuerpos.....	64
4.12.4. Detección.....	64
4.13. Obtención de ARN.....	66
4.14. RT-PCR semicuantitativa.....	66
4.14.1. Síntesis del ADN copia.....	66
4.14.2. Reacción de PCR.....	67
4.15. Electroforesis en gel de agarosa.....	67
4.16. Experimentos de expresión ectópica y de ARN de interferencia.....	68
4.16.1. Transformación, comprobación y amplificación de las construcciones.....	68
4.16.1.1. Transformación.....	68
4.16.1.2. Comprobación de las construcciones mediante enzimas de restricción.....	68
4.16.1.3. Comprobación de las construcciones mediante secuenciación.....	69
4.16.1.4. Amplificación de las construcciones.....	69
4.16.2. Transfección por electroporación.....	70
4.16.3. Selección de las células positivas por tratamiento con geneticina.....	71

4.16.4. Construcciones empleadas para la expresión ectópica de PTP-Bas.....	71
4.16.5. Experimentos de ARN de interferencia de p22 ^{phox}	71
4.16.5.1. Diseño de las parejas de oligonucleótidos para el silenciamiento.....	71
4.16.5.2. Clonaje de los siRNAs en el plásmido pSuper/Neo/eGFP...73	
a) Preparación del pSuper.....	73
b) Preparación de los oligos.....	74
c) Ligación en pSuper.....	75
d) Comprobación de los clones.....	75
4.16.5.3. Silenciamiento de p22 ^{phox} en las líneas celulares.....	76
4.16.5.4. Silenciamiento de p22 ^{phox} en las células primarias UCB-CD34 ⁺	76
4.17. Análisis estadístico.....	77

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....79

1. ESTUDIO DEL PAPEL DE LOS ROS EN LA DIFERENCIACIÓN MEGACARIOCÍTICA.....	81
1.1. La producción de ROS es necesaria para la diferenciación megacariocítica de las líneas celulares.....	83
1.2. La producción de ROS es necesaria para la diferenciación megacariocítica de las células CD34 ⁺	90
2. ORIGEN DE LOS ROS IMPLICADOS EN MEGACARIOPOYESIS.....	93
2.1. Implicación de la actividad de una NADPH oxidasa en la diferenciación megacariocítica.....	93
2.2. Una NADPH oxidasa dependiente de p22 ^{phox} está implicada en la diferenciación megacariocítica de las líneas celulares.....	106
2.3. Una NADPH oxidasa dependiente de p22 ^{phox} está implicada en la diferenciación megacariocítica de las células CD34 ⁺	111
3. ANÁLISIS DE LAS PRINCIPALES RUTAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA DIFERENCIACIÓN MEGACARIOCÍTICA Y SU REGULACIÓN POR ROS.....	115
3.1. Análisis de las rutas de señalización importantes para la megacariopoyesis de las líneas celulares mediante el empleo de inhibidores específicos.....	116
3.2. Análisis de las rutas de señalización importantes para la megacariopoyesis de las células CD34 ⁺ mediante el empleo de inhibidores específicos.....	120
3.3. Los ROS derivados de la actividad de una NADPH oxidasa dependiente de p22 ^{phox} son necesarios para la completa activación de las rutas de señalización que desencadenan la diferenciación megacariocítica.....	123
4. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD PTPÁSICA A LO LARGO DE LA DIFERENCIACIÓN MEGACARIOCÍTICA.....	129

4.1.	Dinámica de la actividad PTPásica	129
4.2.	Análisis del efecto de diferentes inhibidores de PTPs.....	131
5.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE VARIAS PTPs DURANTE LA DIFERENCIACIÓN MEGACARIOCÍTICA.....	136
5.1.	Análisis del patrón de fosforilación en residuos de tirosina.....	136
5.2.	Análisis de la expresión de SHP1, SHP2 y PTP1B.....	137
5.3.	Expresión de una nueva PTP durante la diferenciación megacariocítica.....	139
5.4.	Análisis de la expresión de PTP-Bas a nivel del ARNm durante la diferenciación megacariocítica.....	141
6.	ESTUDIO DEL PAPEL DE PTP-Bas DURANTE LA DIFERENCIACIÓN MEGACARIOCÍTICA.....	143
6.1.	Análisis de la correlación entre la desfosforilación en residuos de tirosina y la expresión diferencial de PTP-Bas.....	143
6.2.	Análisis del efecto de la sobreexpresión de PTP-Bas.....	144
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES.....		149
CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA.....		153

CAPÍTULO I: Introducción

1. HEMATOPOYESIS.

La hematopoyesis es el proceso de formación de los componentes celulares de la sangre: eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Este proceso constituye uno de los paradigmas biológicos de la diferenciación celular, de modo que a partir de un único tipo de célula madre se originan hasta nueve linajes sanguíneos diferentes (Orkin y Zon, 2002). Una pequeña población de células germinales o progenitoras mantienen la hematopoyesis durante toda la vida del individuo adulto, ya que las células sanguíneas maduras suelen tener una vida media reducida (Orkin y Zon, 2008). Se estima que un individuo adulto produce cada día 2^{11} eritrocitos y 1^{11} leucocitos y plaquetas. Estos niveles pueden aumentar cuando aumenta la demanda de células sanguíneas.

1.1. Células madre hematopoyéticas (HSCs).

Las células madre hematopoyéticas (HSCs del inglés “Haematopoietic Stem Cells”), constituyen un tipo celular único dentro de las células hematopoyéticas ya que poseen la capacidad de diferenciarse, para dar lugar al resto de las células del sistema hematopoyético, al tiempo que mantienen la capacidad de autorrenovarse. El proceso de autorrenovación es un fenómeno celular de gran relevancia, en el cual una célula puede dividirse dando lugar a dos células hijas de las cuales al menos una de ellas es capaz de mantenerse en un estado indiferenciado. Gracias a esta propiedad las HSCs son capaces de generar todo el sistema hematopoyético a partir de una única célula, y de mantener la hematopoyesis durante toda la vida de un individuo (Ema et al, 2006).

Desde el punto de vista ontogenético, las HSCs provienen de un progenitor común (hemangioblasto) que origina las células hematopoyéticas y las potencialmente vasculares (Choi et al, 1998; Kennedy et al, 1997). Las HSCs se localizan en la médula ósea de los mamíferos adultos, aunque durante el desarrollo embrionario lo hacen en otros lugares tales como el saco vitelino, la región AGM (una zona alrededor de la parte dorsal de la aorta terminal, las gónadas y el mesonefros), la placenta y el hígado (Galloway y Zon, 2003).

Se considera que el microambiente o nicho de la médula ósea en el cual se localizan las HSCs juega un papel fundamental en la regulación de la autorrenovación y diferenciación de las mismas. Schofield en los años 70

(Schofield, 1978) propuso por primera vez esta idea. Actualmente, se entiende por nicho el conjunto de los diferentes tipos celulares y estructuras que rodean el hueso, y que regulan, directa o indirectamente, el destino de las células hematopoyéticas, lo que contribuye a la formación de todas las células sanguíneas que se requieren en una situación hematopoyética normal (Fuchs y Whartenby, 2004; Morrison y Spradling, 2008). Este nicho es incluso capaz de adaptarse a situaciones de estrés hematopoyético. Actualmente se sabe que las HSCs más inmaduras residen principalmente cerca de la región endostelial del hueso trabecular (Xie et al, 2009; Zhang et al, 2003). Se han descrito dos tipos de nichos: un nicho endostelial, donde las HSCs permanecen próximas a los osteoblastos del hueso trabecular de la médula ósea, y un nicho perivascular, en el cual las células madre hematopoyéticas están próximas al endotelio vascular de los senos óseos (Kiel y Morrison, 2008).

1.2. Diferenciación hematopoyética.

Tradicionalmente, en el proceso de hematopoyesis se han diferenciado dos linajes diferentes (Figuras I-1A, I-2A y I-3A): el linfoide, representado por el progenitor linfoide común (CLP), y el mieloide, representado por el progenitor mieloide común (CMP). El linaje linfoide dará lugar a los linfocitos T y B y a las células NK (“Natural Killer”) mientras el mieloide originará, al final del proceso de maduración, los diferentes granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos), los monocitos, los eritrocitos y los megacariocitos. Posteriormente, éstos últimos originarán las plaquetas circulantes.

Sin embargo, este modelo clásico no es capaz de explicar por qué los progenitores tempranos del timo de individuos adultos presentan potencial mieloide. Surgen entonces varios modelos alternativos de hematopoyesis. Uno de estos modelos es el “myeloid-based model” propuesto por *Katsura et al.* (Katsura, 2002; Katsura y Kawamoto, 2001) (Figura I-1B), según el cual, el potencial mieloide de las células sanguíneas permanece retenido en las distintas ramas: eritroide, linfoide T y linfoide B, incluso después de que los distintos linajes se hayan segregado. Según este modelo, las HSCs en primer lugar divergen para originar un progenitor eritro-mieloide común (CMEP) y un progenitor linfo-mieloide común (CMLP). Por lo tanto, según este modelo no existe un precursor linfoide

común (CLP) (Katsura, 2002; Katsura y Kawamoto, 2001; Kawamoto, 2006). En consecuencia, el CMLP originará los progenitores T y B a través de un progenitor bipotencial mielo-linfoide T y mielo-linfoide B respectivamente.

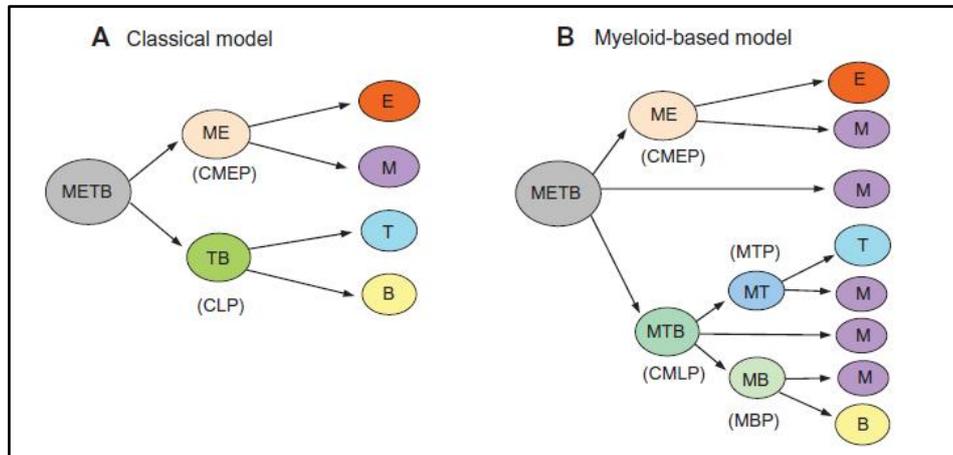


Fig. I-1. Comparación del modelo clásico y del modelo alternativo de hematopoyesis propuesto por Katsura et al. Tomado de (Kawamoto et al, 2010). METB (Progenitor Totipotencial), CMEP (Progenitor Común Eritro-Mieloides), CLP (Progenitor Linfocítico Común), CMLP (Progenitor Común Linfocítico-Mieloides), MBP (Progenitor Mielo-Linfocítico B), MTP (Progenitor Mielo-Linfocítico T), E (Linaje Eritroide), M (Linaje Mieloides), T (Linaje Linfocítico T), B (Linaje Linfocítico B).

Otro modelo de hematopoyesis es el propuesto por *Adolfsson et al.* (Adolfsson et al, 2005). Según este modelo, las HSCs perderían su potencial eritro-megacariocítico en un primer paso de diferenciación, para convertirse en un progenitor multipotente linfocítico (LMPP) que posteriormente pierde su potencial granulomonocítico generando finalmente el progenitor linfocítico común (CLP) (Figura I-2B).

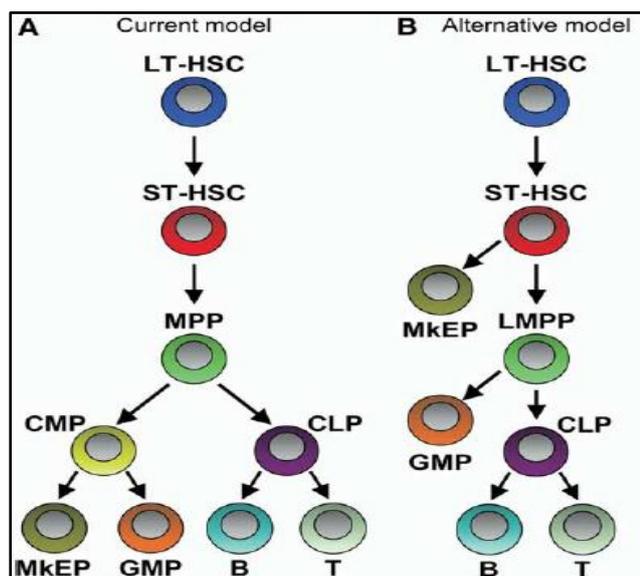


Fig. I-2. Comparación del modelo clásico y del modelo alternativo de hematopoyesis propuesto por Adolfsson et al. Tomado de (Adolfsson et al, 2005). HSC (Célula madre

hematopoyética), LT-HSC (HSC a largo plazo), ST-HSC (HSC a corto plazo), MPP (Progenitor Multipotente), LMPP (Progenitor Multipotente Linfoide), CLP (Progenitor Linfoide Común), CMP (Progenitor Mieloide Común), GMP (Progenitor granulo-monocítico), Mkep (Progenitor Eritro-Megacariocítico), B (Precursor de células B), T (Precursor de células T).

Por lo tanto, el camino que siguen las HSCs no está bien definido. Según *Iwasaki et al.* (Iwasaki y Akashi, 2007) existen rutas intermedias que enlazan los linajes tradicionales. Así, el CLP quedaría relegado a un nivel inferior, y una nueva especie, el progenitor granulocítico-monocítico-linfoide (GMLP), se situaría a nivel del CMP. Además el progenitor granulo-monocítico (GMP), que tradicionalmente se colocaba en el linaje mieloide diferenciado a partir del CMP, podría originarse también a partir del GMLP (Figura I-3B).

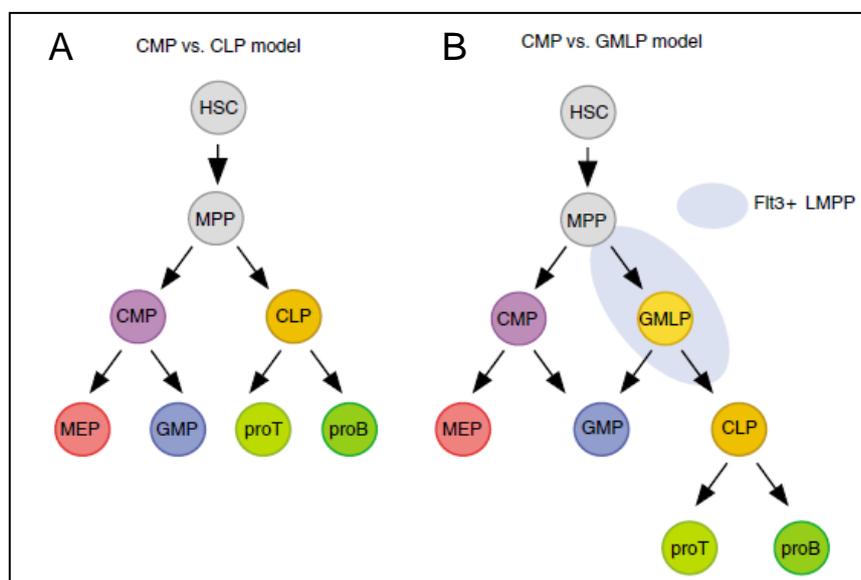


Fig. I-3. Comparación del modelo clásico y del modelo alternativo de hematopoyesis propuesto por Iwasaki et al. Tomado de (Iwasaki y Akashi, 2007). HSC (Célula madre hematopoyética), MPP (Progenitor Multipotente), CLP (Progenitor Linfoide Común), CMP (Progenitor Mieloide Común), MEP (Progenitor Eritro-Megacariocítico), GMP (Progenitor granulo-monocítico), GMLP (Progenitor granulo-monocítico-linfoide), proT (Precursor de células T), proB (Precursor de células B).

1.3. Principales citoquinas implicadas en la hematopoyesis.

Numerosas citoquinas afectan a la multipotencialidad de las HSCs y al camino que estas tomarán. Las más conocidas son el SCF (del inglés “Stem Cell Factor”), la FLT3 (del inglés “FMS-like tyrosine kinase 3”), el GM-CSF (del inglés “Granulocyte Colony Stimulating Factor”), la interleuquina-2, la interleuquina-3 y la interleuquina-7 (Kaushansky, 2006). Cada una de ellas dirige la diferenciación hacia los diferentes tipos de células maduras, y solamente la ausencia del SCF y de la interleuquina-7 provoca trastornos graves en la hematopoyesis. La

interleuquina-7 es el principal factor que controla los progenitores linfoides, está presente desde la diferenciación del progenitor linfoide común y luego es necesaria, junto con la interleuquina-2, para la formación de los linfocitos T maduros. La interleuquina-4 está implicada en la maduración de los linfocitos B y la IL-15 en la maduración de las células NK. Algo similar a lo que con la interleuquina-7 ocurre en la línea linfoide, sucede en la mieloide con la trombopoyetina (TPO), que es necesaria junto con el SCF para la formación del progenitor mieloide común, y luego es necesaria para la maduración de los megacariocitos. La eritropoyetina (EPO) y el M-CSF son necesarios para la formación de los eritrocitos y mastocitos respectivamente. Los eosinófilos requieren la interleuquina-5, los basófilos el SCF y los granulocitos el G-CSF.

La diferenciación hacia los diferentes linajes celulares desencadenada por las citoquinas inicia una señal que es ejecutada, finalmente, por factores de transcripción específicos que controlan la expresión de los genes necesarios para el proceso de diferenciación. Así, en el linaje mieloide trabaja fundamentalmente GATA-1, en el linfoide lo hace PU.1, y en el granulomonocítico ambos factores, al menos durante ciertas etapas de la diferenciación de mastocitos y de alguno de los tipos de granulocitos (Orkin y Zon, 2008).

2. MEGACARIOPOYESIS

La megacariopoyesis es el proceso por el cual las HSCs se diferencian dando lugar a un tipo celular denominado megacariocito, a partir del cual se originarán las plaquetas circulantes. El proceso de megacariopoyesis se caracteriza por la endoreduplicación del ADN, la maduración y la expansión del citoplasma celular, y la liberación de las plaquetas circulantes (Deutsch y Tomer, 2006; Kaushansky, 2008; Szalai et al, 2006).

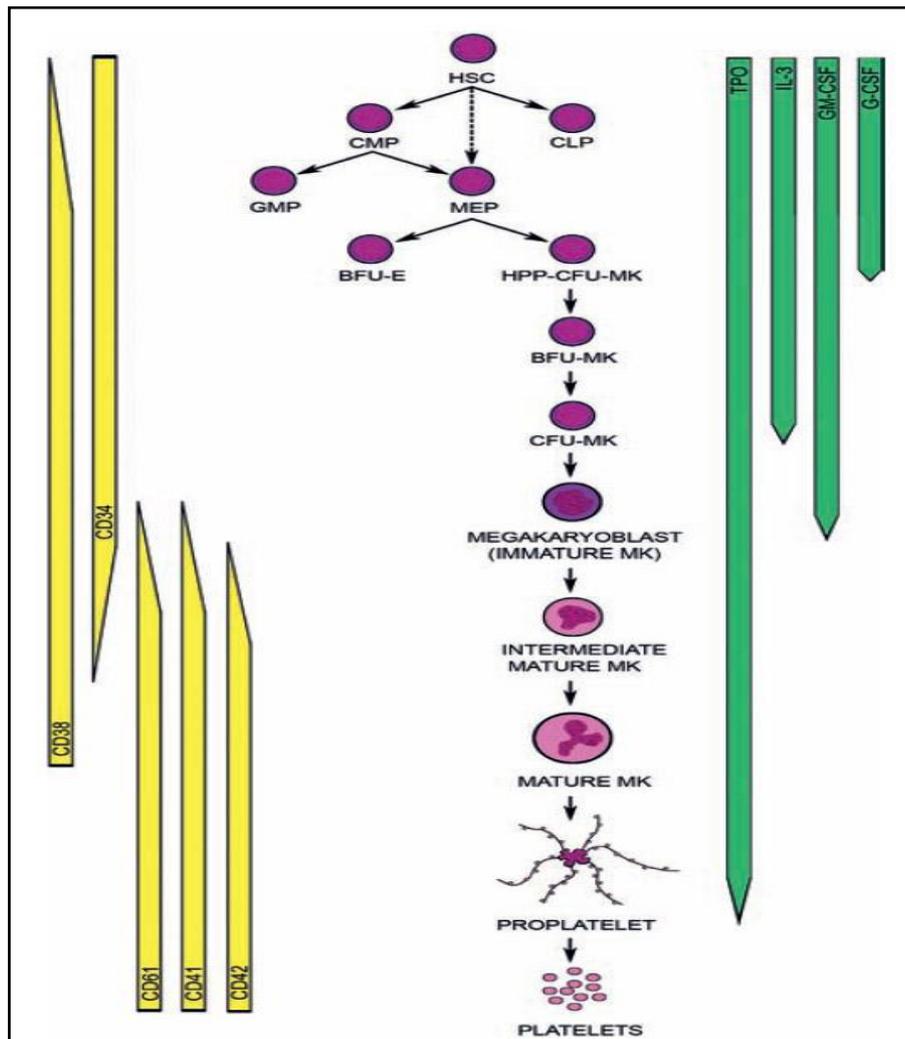


Fig. I-4. Esquema de la diferenciación megacariopoyética. Las flechas verdes indican las principales citoquinas estimulantes del proceso y las flechas amarillas la expresión diferencial de determinados marcadores megacariocíticos a lo largo del mismo. Tomado de (Szalai et al, 2006).

Los megacariocitos se originan en la médula ósea a partir de los precursores eritro-megacariocíticos (MEP), los cuales a su vez se pueden generar a través de distintas vías a partir de las HSCs (Figuras I-1, I-2 y I-3). Posteriormente, los MEP se diferencian en colonias formadoras de eritrocitos (BFU-E), y en colonias formadoras de megacariocitos (HPP-CFU-MK), que a la

postre acabarán dando lugar a los megacariocitos maduros a partir de los cuales se originarán las plaquetas circulantes (Deutsch y Tomer, 2006; Kaushansky, 2008; Szalai et al, 2006) (Figura I-4).

2.1. Citoquinas implicadas en la diferenciación megacariocítica.

La trombopoyetina (TPO) es la citoquina que más estimula la diferenciación megacariocítica, siendo capaz de provocar la diferenciación megacariocítica *in vitro* (Deutsch y Tomer, 2006). La TPO es necesaria desde las primeras etapas de la hematopoyesis (ya que el proceso de autorrenovación de las HSCs así lo requiere) hasta la maduración del megacariocito y posterior liberación de las plaquetas. Se necesitan, por lo tanto, unos niveles constitutivos de TPO circulante, los cuales son segregados, en adultos, principalmente por el hígado (Jelkmann, 2001), aunque las células del estroma de la médula ósea también pueden secretarla (Guerriero et al, 1997). La TPO es una proteína de 332 aminoácidos y 95 kDa de peso molecular que contiene dos dominios proteicos: el primero (aminoácidos 1-153) es el encargado de unirse a su receptor (receptor c-Mpl) y posee alta homología con la eritropoyetina (EPO); el segundo (aminoácidos 154-332) es rico en glúcidos y es importante para mantener la estructura (Bartley et al, 1994; de Sauvage et al, 1994). La transducción de la señal se desencadena cuando la TPO se une a su receptor. El receptor c-Mpl (Figura I-5) es un receptor de membrana típico dentro de los receptores de citoquinas hematopoyéticas. Está formado por dos monómeros homólogos llamados CRMs (cytokine receptor homology) que reconocen a las citoquinas (Kaushansky, 1995). El receptor c-Mpl está presente en las células madre hematopoyéticas, en las células progenitoras eritro-megacariocíticas y en las plaquetas (Li et al, 1999). La TPO se une sólo al CRM distal (CRM1) (Alexander et al, 1995; Feese et al, 2004). El receptor permanece activo en ausencia de este módulo distal, lo que sugiere que el CRM-1 tiene una función inhibitoria y que la unión de la TPO provoca la supresión de esta inhibición (Sabath et al, 1999).

Se supone que el mecanismo de activación de c-Mpl es similar al del receptor de eritropoyetina, el EpoR. Este último receptor es un homodímero que en ausencia de ligando unido, mantiene sus dominios separados. Tras la unión del ligando, la distancia relativa de los dominios citoplasmáticos se acorta. Estos dominios están unidos a proteínas de la familia de la quinasa Janus (JAK2 en el

caso del receptor de la TPO). Cuando los dominios se aproximan como respuesta a la unión del ligando, las JAK también se acercan permitiendo que se activen por fosforilación (Livnah et al, 1999). Todos los miembros de la familia de las quinasas Janus, y por tanto JAK2, tienen tres dominios en su estructura: un dominio FERM (del inglés four-point-one, ezrin, radixin, moesin), por el cual se une al receptor de citoquinas, y dos dominios de homología con JAK (JH1 y JH2). La actividad quinásica se localiza en JH1, mientras que JH2 probablemente module la actividad de JH1 (Livnah et al, 1999; Saharinen et al, 2003). La unión de TPO a su receptor activa tanto a JAK2 como a TYK2 (miembro también de la familia Janus), aunque sólo la activación de JAK2 es imprescindible para desencadenar la cascada de transducción. Además, JAK2 es la isoforma predominante de los megacariocitos primarios (Drachman et al, 1999; Saharinen et al, 2003). La activación de JAK2 hace que se inicie una cascada de señalización por fosforilación de al menos: (1) residuos del propio receptor; (2) moléculas que promueven la supervivencia y proliferación celular, como los factores de transcripción STATs, la fosfoinositol-3-quinasa (PI3K) y las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs); (3) fosforila a factores que limitan la señalización celular, entre los que se encuentran las fosfatasas SHP1, SHIP1 y SOCs (Kaushansky, 2005). Según (Dorsch et al, 1999), es el propio receptor el que activa las rutas de la PI3K y de las MAPKs.

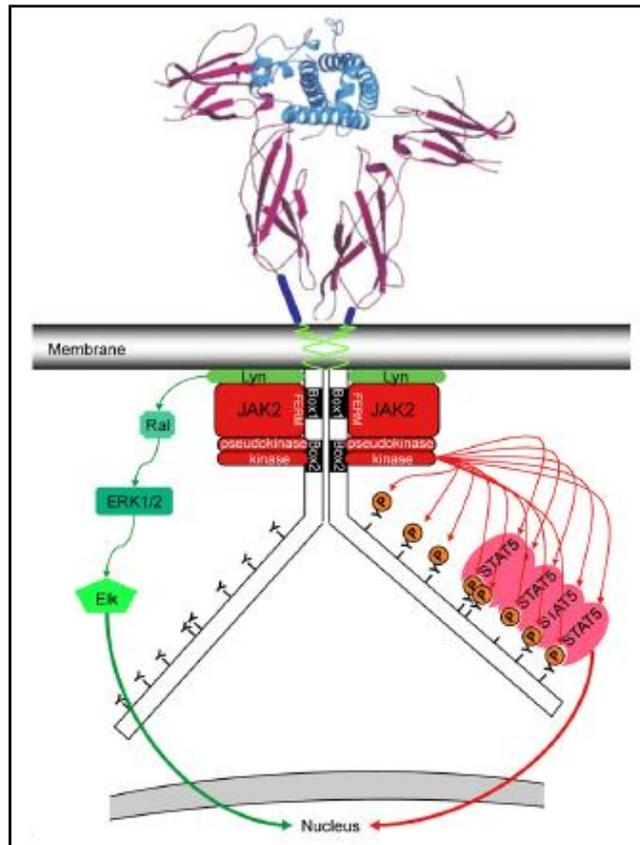


Fig. I-5. Representación esquemática de un receptor de hormonas (similar al c-Mpl). En la figura además del receptor se representan las proteínas JAK asociadas y las posibles fosforilaciones que realizan. Tomado de (Brooks et al, 2008).

Además de la TPO, numerosos factores de crecimiento hematopoyético regulan diferentes aspectos de la maduración de los megacariocitos. Algunas citoquinas, entre las que se incluyen el GM-CSF, las interleuquinas 3, 6, 11 y 12 y la eritropoyetina (EPO), estimulan la proliferación de los progenitores megacariocíticos (Figura I-4). Otras citoquinas, como la interleuquina 1 α y el factor inhibidor de la leucemia, modulan la maduración del megacariocito y la liberación de las plaquetas (Gordon y Hoffman, 1992; Vainchenker et al, 1995).

2.2. Megacariopoyesis independiente de TPO.

Actualmente se sabe que además de la TPO existen otras señales extracelulares que contribuyen a la megacariopoyesis *in vivo*. Así, los ratones deficientes en TPO o en su receptor (Tpo^{-/-} o Mpl^{-/-}), a pesar de tener sólo un 10% de megacariocitos en su médula ósea con respecto a un ratón silvestre, sobreviven y, además, no presentan hemorragias espontáneas porque tienen el

mismo número de plaquetas circulantes que los ratones silvestres (Bunting et al, 1997). Estos datos sugieren que debe de haber una serie de reguladores de la megacariopoyesis diferentes a la TPO que por sí mismos mantienen la hemostasis. Se han descrito al menos cuatro vías de regulación de la megacariopoyesis independientes de TPO (Figura I-6):

- **Receptor gp-130** (glicoproteína de 130 kDa): A este receptor se le unen proteínas de la familia de la Interleuquina-6 (Febbraio, 2007), lo que provoca la homo o heterodimerización del receptor (Heinrich et al, 2003). Estos dímeros se unen a alguna proteína de la familia de las quinasas Janus, las cuales desencadenan la respuesta que consiste en la activación de los factores de transcripción STATs por un lado y por otro la activación de la ruta de las MAPKs (Stross et al, 2006).
- **Notch:** Se han descrito tres mecanismos donde Notch juega un papel relevante en la megacariopoyesis: (1) la expresión de ligandos de Notch en el microambiente de las HSCs puede inhibir la diferenciación eritropoyética; (2) NIC (el dominio intracelular de Notch) tiene un efecto inhibitorio de la eritropoyesis mediante la inhibición de JNK; y (3) Notch inhibe la diferenciación de la vía eritro/megacariopoyética por la supresión de la actividad de GATA-1, que es un factor de transcripción esencial para el desarrollo de este proceso (Ishiko et al, 2005; Lam et al, 2000).
- **Receptor de NMDA** (receptor de N-metil-D-aspartato o receptor NR): Se trata de un receptor tipo glutamato con elevado nivel de expresión en la membrana plasmática de los megacarioblastos. El glutamato y su co-agonista la glicina activan al receptor NR lo que abre canales de Ca^{2+} incrementándose su concentración en el citoplasma (Jahr y Stevens, 1993). Este Ca^{2+} activa la calmodulina y las quinasas dependientes de calcio-calmodulina, que activan a su vez a la proteína quinasa C (PKC) y al receptor no dependiente de tirosina quinasa Src (Salter, 1998; Vaccarino et al, 1987). La PKC actúa después a través de GATA-1, y Src promueve la proliferación y la diferenciación de los megacariocitos (Guerriero et al, 2006; Racke et al, 2001; Yu et al, 1997).
- **SDF-1/FGF-4** (factor 1 derivado de células estromáticas/factor de crecimiento fibroblástico 4) (Avecilla et al, 2004): Estos reguladores desencadenan la respuesta uniéndose al receptor CXCR4. Algunos de los aspectos que regula el FGF-4 en los megacariocitos son el incremento de la ploidía, el aumento del

tamaño celular y el aumento de la glicoproteína IIb/IIIa. Por otro lado, el SDF-1 dirige a las células HSCs hacia precursores megacariocíticos durante el desarrollo fetal y parece provocar una migración de estas células desde un micronicho osteoblástico hasta uno vascular (Avecilla et al, 2004; Pang et al, 2005; Wang et al, 1998).

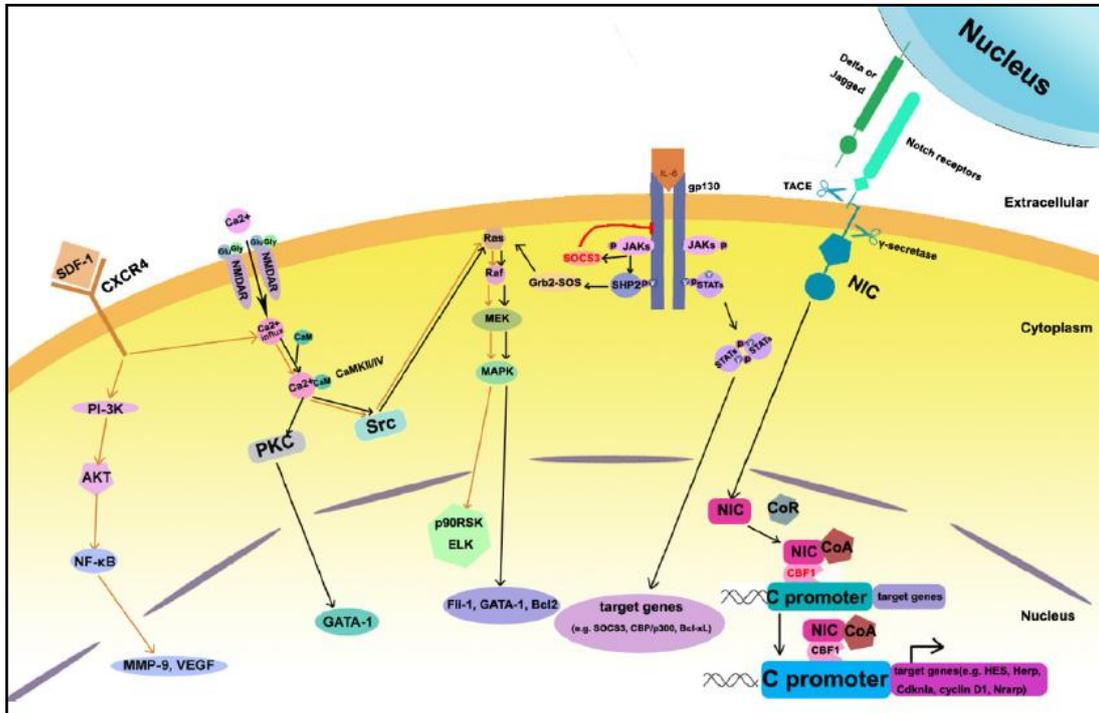


Fig. I-6. Resumen esquemático de todas las rutas señalización que desencadenan la megacariopoyesis independiente de TPO. Tomado de (Zheng et al, 2008).

In vitro, uno de los sistemas más empleados para estudiar la diferenciación megacariocítica se basa en el tratamiento de líneas celulares eritroleucémicas con ésteres de forbol. Así, por ejemplo, las células K562 (Sutherland et al, 1986; Tabilio et al, 1983; Tetteroo et al, 1984) y HEL (Zauli et al, 1996) pueden diferenciarse a megacariocitos gracias a su estimulación con ésteres de forbol como, por ejemplo, el TPA (12-O-tetradecanoil forbol-13-acetato) o el PMA (forbol 12-miristato 13-acetato). Los ésteres de forbol, que son análogos estructurales del diacilglicerol (DAG), son capaces de inducir la diferenciación megacariocítica de líneas celulares eritroleucémicas mediante una activación muy severa de la proteína quinasa C (PKC) (Alitalo, 1990; Long et al, 1990). En numerosos modelos de diferenciación megacariocítica basados en el empleo de líneas celulares se ha visto que la activación de la PKC induce diferentes características entre las que se incluyen: parada del ciclo celular, secreción de citoquinas megacariocíticas, sobreexpresión de marcadores megacariocíticos de superficie,

incremento del tamaño celular, poliploidización, desarrollo de procesos proplaquetarios y aparición de una demarcación de membranas (Alitalo, 1990; Long et al, 1990). El empleo de progenitores humanos primarios ha confirmado los efectos promegacariocíticos de los ésteres de forbol. Además, estos estudios han mostrado que dichos efectos se revierten mediante el empleo de antagonistas de la PKC como GF109203X y RO318220 (Lumelsky y Schwartz, 1997).

La familia de las proteínas serina/treonina quinasas PKC está constituida por al menos 12 isoenzimas diferentes en función de sus propiedades bioquímicas, farmacológicas y estructurales (Hug y Sarre, 1993). Estas 12 isoenzimas se dividen a su vez en tres grupos: las **PKCs clásicas** (cPKC- α , - β I, - β II y PKC- γ), las que se activan de manera dependiente de Ca^{2+} y DAG; las **PKCs novedosas** (nPKC- δ , - ϵ , - η , - θ y PKC- μ), dependientes de DAG pero independientes de Ca^{2+} ; las **PKCs atípicas** (aPKC- ζ , - ι y PKC- λ), independientes de DAG y Ca^{2+} . Este último grupo, aPKC, se caracteriza además por no responder a la estimulación con ésteres de forbol (Dekker y Parker, 1994; Hug y Sarre, 1993; Nishizuka, 1992). En células K562 se requiere la activación sostenida de la ruta de señalización Raf-MEK-ERK, mediada por PKC, para la iniciación de la diferenciación megacariocítica (Racke et al, 1997; Whalen et al, 1997). Múltiples isoenzimas de la PKC poseen la capacidad de activar la ruta Raf-MEK-ERK, en particular α , β I, η y δ (Schonwasser et al, 1998; Ueda et al, 1996). Además, el PMA induce la translocación de las isoformas α , ϵ y θ desde la fracción citosólica hasta la fracción de membrana (Ballen et al, 1996). Goldfarb et al. demostraron recientemente que la PKC- ϵ participa específicamente en el desarrollo del linaje megacariocítico a través de su cooperación funcional con GATA-1 y la activación de los promotores megacariocíticos, y que la disminución de los niveles de PKC- ϵ y MAPK inhibe la diferenciación megacariocítica de las células K562 (Goldfarb et al, 2001).

2.3. Factores de transcripción implicados en la megacariopoyesis.

A nivel transcripcional se considera que GATA-1 es el factor de transcripción indispensable para la diferenciación tanto de megacariocitos como de eritrocitos (Fujiwara et al, 1996). GATA-1 es un gen ligado al cromosoma X

que codifica una proteína de unión al ADN del tipo “zinc finger”, cuyo peso molecular es de 50 kDa (Martin y Orkin, 1990). La eliminación genética de este factor de transcripción permitió descubrir su papel clave en la hematopoyesis, ya que ratones “knockout” para GATA-1 (*GATA1^{-/-}*) mueren en etapas tempranas del estadio embrionario como consecuencia de un fallo severo en la eritropoyesis (Pevny et al, 1991). Cuando se realizó la eliminación megacariocito-específica de GATA-1, se observó una trombocitopenia severa debido a una megacariopoyesis defectuosa (Lecine y Shivdasani, 1998). GATA-1 ejerce el efecto regulatorio de la megacariopoyesis junto con un cofactor que afecta a la transcripción sin unirse al ADN: “friend of GATA-1” (FOG) (Tsang et al, 1997). La importancia de esta interacción en la megacariopoyesis es clara ya que diversas mutaciones en el sitio de unión de FOG a GATA-1 conllevan una trombocitopenia congénita (Nichols et al, 2000).

Otros factores de transcripción implicados en la megacariopoyesis son NF-E2, Fli-1 y RUNX (Goldfarb, 2007; Shivdasani, 2001). Mutaciones en estos factores de transcripción causan distintas enfermedades humanas, como por ejemplo, anemias, trombocitopenias y leucemias (Crispino, 2005; Goldfarb, 2007).

3. ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ROS)

Las células eucariotas, como consecuencia de su metabolismo aerobio, producen constantemente especies reactivas del oxígeno (ROS del inglés “Reactive Oxygen Species”). Los ROS son formas parcialmente reducidas del oxígeno, de las cuales las más comunes son el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^-) (Turrens, 2003). Se sabe desde hace tiempo que un exceso de ROS intracelulares conlleva la oxidación de proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos, lo que finalmente produce daño celular. Por este motivo, la producción de ROS se ha relacionado, tradicionalmente, con efectos deletéreos sobre las células, con procesos de envejecimiento y con numerosas enfermedades degenerativas (Genestra, 2007). Sin embargo, actualmente se acepta un papel de los ROS en la regulación de diferentes rutas de señalización celular (Tatla *et al.*, 1999) y en la expresión génica (Goldstone *et al.*, 1996), a pesar de que los mecanismos moleculares por los cuales se lleva a cabo esta regulación no están todavía totalmente claros.

3.1. Origen de los ROS

Los ROS se producen en prácticamente todos los tipos celulares de todos los organismos multicelulares, bien como consecuencia del metabolismo celular o como productos secundarios o colaterales de la actividad de distintos sistemas enzimáticos. Las principales fuentes de ROS en las células son los complejos enzimáticos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, el complejo enzimático de la Xantina Oxidorreductasa y el complejo enzimático de la NADPH oxidasa (Figura I-7).

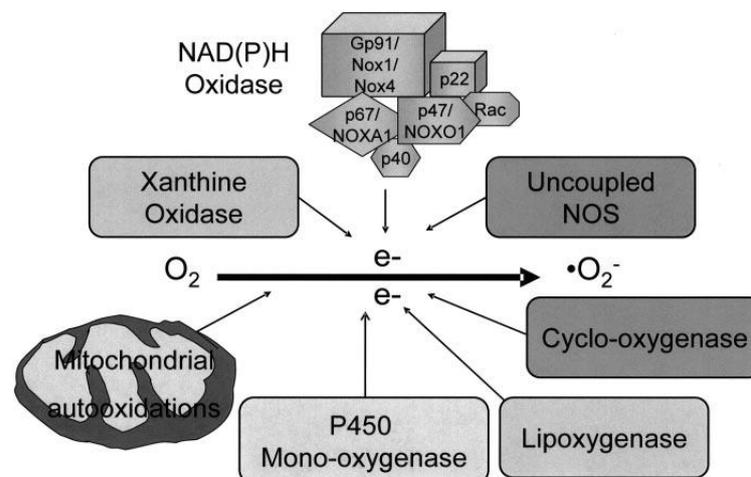


Fig. I-7. Fuentes enzimáticas de anión superóxido (O_2^-). Tomado de (Paravicini y Touyz, 2008).

3.1.1. Cadena de transporte electrónico mitocondrial.

Típicamente se ha considerado la cadena de transporte electrónico mitocondrial como el principal responsable de la producción de ROS intracelular (Loschen et al, 1973). Durante la respiración, la mayor parte del oxígeno consumido es reducido a agua. Sin embargo, aproximadamente el 1–2% del oxígeno consumido es parcialmente reducido a $O_2^{\cdot-}$ (Cadenas et al, 1977), el cual puede convertirse en H_2O_2 y en el radical OH^{\cdot} (Boveris et al, 1972). El $O_2^{\cdot-}$ se puede producir en distintas reacciones en el interior de la mitocondria (Turrens, 2003). Sin embargo, se considera que los dos principales puntos en los que se genera $O_2^{\cdot-}$ en la cadena de transporte electrónico se localizan en los complejos I y III (Figura I-8). El complejo III (ubiquinona citocromo c oxidorreductasa) produce $O_2^{\cdot-}$ por la auto-oxidación de la ubisemiquinona (QH^{\cdot}) formada en el ciclo Q (Sun y Trumpower, 2003). El $O_2^{\cdot-}$ producido en el complejo III puede liberarse al espacio intermembrana o a la matriz mitocondrial, mientras que en el caso del complejo I (NADH ubiquinona oxidorreductasa) la liberación se produce siempre hacia la matriz mitocondrial (St Pierre et al, 2002). Los mecanismos por los cuales se genera $O_2^{\cdot-}$ en el complejo I se conocen poco y además son controvertidos, ya que los resultados obtenidos se ha visto que dependen de las condiciones experimentales (Grivennikova y Vinogradov, 2006; Kudin et al, 2008; Lambert et al, 2008). El anión superóxido generado en los complejos I y III de la cadena de transporte electrónico puede ser transformado en H_2O_2 por la acción de superóxido dismutasas de la mitocondria (CuZnSOD o MnSOD). Este compuesto no cargado difunde al citosol a través de las membranas mitocondriales. El $O_2^{\cdot-}$ liberado en el espacio intermembrana llega al citosol a través de un canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC) que existe en la membrana mitocondrial externa (Kudin et al, 2008). Una vez en el citosol, el $O_2^{\cdot-}$ es dismutado a H_2O_2 por la acción de la CuZnSOD citosólica.

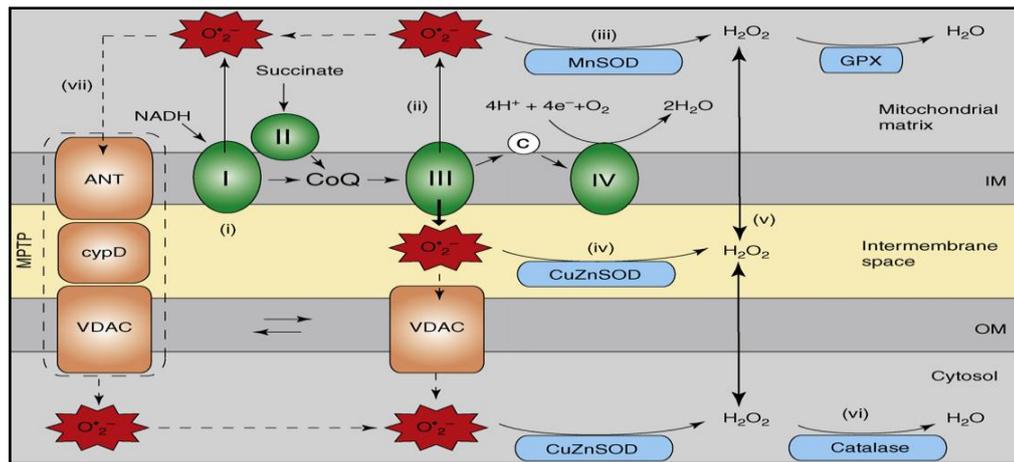


Fig. I-8. Representación esquemática de la producción de ROS en la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Tomado de (Poyton et al, 2009).

3.1.2. Xantina oxidorreductasa (XOR).

La xantina oxidorreductasa (XOR) cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina o de xantina a ácido úrico dentro de la ruta metabólica de la degradación de las purinas en animales superiores (Bray et al, 1975; Bray, 1988). Como productos secundarios de esta reacción de oxidación se generan $O_2^{\cdot-}$ y principalmente H_2O_2 (Lacy et al, 1998) (Figura I-9).

A pesar de que clásicamente se considera a la XOR como la enzima clave del catabolismo de las purinas, su complejidad estructural y su distribución específica en ciertos tejidos sugiere otras posibles funciones. Granger, McCord *et al.* propusieron que los ROS generados por XOR estarían implicados en las lesiones producidas durante el proceso de isquemia-reperfusión (Granger et al, 1981; Granger et al, 1986; McCord, 1985). Esta hipótesis, que ha generado cientos de publicaciones, contribuyó indudablemente a despertar el interés por XOR como fuente de ROS implicados no sólo en procesos patológicos, sino también en la transducción de señales.

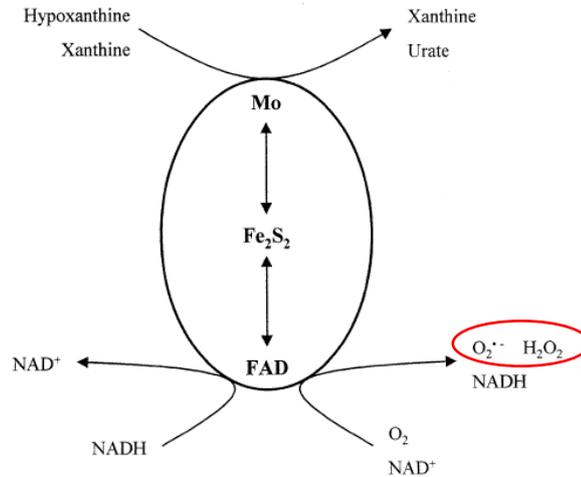


Fig. I-9. Diagrama esquemático mostrando la reacción de oxidación de hipoxantina y xantina catalizada por XOR y la producción secundaria de ROS. Modificado de (Harrison, 2002).

3.1.3. NADPH oxidasas (Noxs).

Las NADPH oxidasas constituyen la principal fuente de ROS no mitocondrial (Nauseef, 2008). Estas proteínas son complejos multiproteicos asociados a membrana que producen anión superóxido. El primer complejo que se describió fue el de la NADPH oxidasa de fagocitos (Phox), que produce grandes cantidades de anión superóxido y otros ROS fundamentales como mecanismo de defensa frente a infecciones (estallido respiratorio) (Babior et al, 1973; Klebanoff, 1970; Rossi y Zatti, 1964). La subunidad catalítica del complejo de la NADPH oxidasa, denominada gp91^{phox} o Nox2, ha sido ampliamente estudiada (Bedard y Krause, 2007). Nox2 está íntimamente unida a la proteína p22^{phox} formando un complejo denominado citocromo b₅₅₈, el cual, en células en reposo, se encuentra en vesículas intracelulares. Cuando se estimulan las células, dichas vesículas migran hasta la membrana plasmática junto con las subunidades citosólicas del complejo NADPH oxidasa (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} y la GTPasa Rac), para generar el complejo activo (Bedard y Krause, 2007) (Figura I-10). Existen seis homólogos de Nox2: Nox1, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 y Duox2, cada uno de los cuales presenta un patrón de expresión específico y un papel biológico todavía por esclarecer (Nauseef, 2008). Recientemente han aparecido algunos estudios que señalan la importancia de la producción de ROS mediada por la actividad NADPH oxidasa en la diferenciación de distintos tipos celulares (Buggisch *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2005).

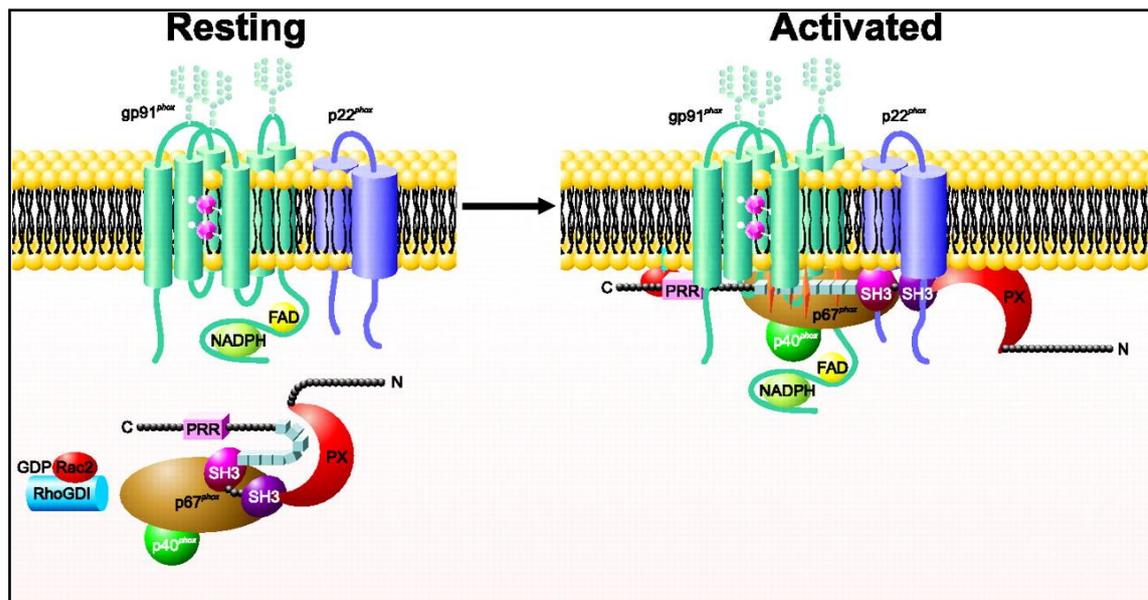


Fig. I-10. Representación esquemática del mecanismo de ensamblaje y activación de la NADPH oxidasa de fagocitos. Tomado de (Nauseef, 2008).

3.2. Sistemas intracelulares de defensa frente a los ROS.

Las células aeróbicas han desarrollado mecanismos de desintoxicación o sistemas antioxidantes que las protegen de los efectos perjudiciales de ROS. El daño celular se produce cuando existe un desequilibrio entre la formación de especies reactivas del oxígeno y los sistemas encargados de su eliminación, con predominio de los primeros que conduce al desarrollo del estrés oxidativo (Halliwell et al, 1992).

Los principales sistemas intracelulares de defensa frente al estrés oxidativo son los siguientes:

- **Sistema de la glutarredoxina:** Se trata de un sistema enzimático compuesto por la glutarredoxina (GRX), el glutatión (L-γ-glutamil-L-cisteinil-glicina) y el NADPH. El glutatión es un tripéptido que juega un papel fundamental en la regulación del equilibrio entre reducción y oxidación (estado redox) dentro de la célula, así como también en la regulación de las rutas de señalización aumentadas por estrés oxidativo (Haddad et al, 2000; Haddad y Land, 2000; Meister, 1988). Así, se considera que el glutatión es el principal regulador del estado redox en las células de mamíferos (Gomez et al, 2004; Haddad, 2001; Haddad, 2002; Ostergaard et al, 2004; Rahman, 1999; Rahman y MacNee, 2000; Rebrin et al, 2004; Wu et al, 2004). La molécula de cisteína proporciona el grupo tiol fundamental para las propiedades del glutatión. Este grupo generalmente se encuentra en estado reducido (GSH), sin embargo, se ha visto que en algunas enfermedades se

produce el agotamiento del glutatión en estado reducido pasando a ser la forma mayoritaria del mismo la forma oxidada (GSSG) (Bunnell y Pacht, 1993; Cantin et al, 1989; Roum et al, 1993; Saugstad, 1997). Entre los antioxidantes precursores del glutatión cabe destacar la N-acetilcisteína (NAC) (Bernard, 1991; Haddad et al, 2000), que es capaz de atenuar la producción de citoquinas (Tsuji et al, 1999) y las lesiones inducidas por ROS (Bernard, 1991).

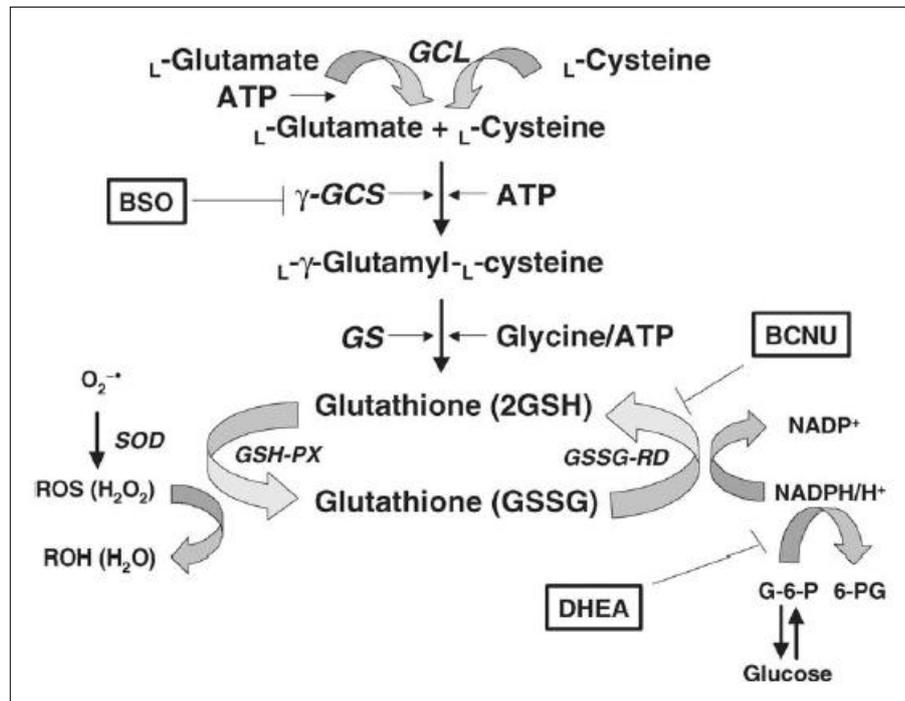


Fig. I-11. Representación esquemática del ciclo redox mostrando la relación entre las enzimas antioxidantes y el glutatión. Tomado de (Haddad y Harb, 2005)

- **Sistema de la tiorredoxina:** Se trata de un sistema enzimático compuesto por la tiorredoxina (TRX), el NADPH y la tiorredoxina reductasa (TrxR). En su forma reducida la tiorredoxina se encuentra formando enlaces ditiol (-SH, -SH), sin embargo, cuando se oxida se originan puentes disulfuro (S-S) en su sitio activo. En el citoplasma de las células, la tiorredoxina en su forma reducida cede electrones al puente disulfuro de la proteína diana oxidada reduciéndola. Como consecuencia de esta transferencia de electrones, la tiorredoxina se oxida, aunque puede volver al estado reducido previo por la acción de la TrxR y del NADPH (Bjornstedt et al, 1994; Holmgren, 1979; Holmgren, 1984). La proteína Trx-1, cuya expresión es ubicua, es uno de los principales sensores redox. La región promotora de esta proteína contiene elementos de respuesta a los ROS, como el elemento ORE (oxidative responsive element) y el elemento ARE (antioxidant-responsive element) (Das, 2004; Nakamura et al, 1997).

3.3. Implicación de los ROS en la biología de las HSCs.

Aunque las HSCs son capaces de generar células sanguíneas de todos los linajes hematopoyéticos a lo largo de toda la vida del animal, una característica principal de estas células es su capacidad para mantenerse en la fase no divisiva del ciclo celular (fase G_0) manteniéndose así en un estado denominado quiescencia. Se considera que aproximadamente el 75% de las HSCs presentes en un animal se encuentran en este estado quiescente G_0 (Cheshier et al, 1999). Empleando ratones “knockout” para algunos genes implicados en la regulación de los niveles de ROS, se ha visto que las HSCs de estos ratones no pueden mantener la quiescencia y por lo tanto, son deficientes en su capacidad para autorrenovarse (Naka et al, 2007). Estos datos sugieren que uno de los factores que regula el nicho de las HSCs serían los niveles de ROS. Otro experimento que apoya firmemente esta hipótesis fue el realizado por Jang y Sharkis en el año 2007 (Jang y Sharkis, 2007). En este experimento se describió un nuevo fenotipo para las HSCs en función de su contenido de ROS. Así Jang y Sharkis hablaban de dos poblaciones: *ROSlow HSCs* y *ROShigh HSCs*, ambas con un idéntico perfil de expresión de marcadores de superficie ($CD34^-$, Lin^- , $Sca-1^+$, $c-Kit^+$). Sin embargo, la población *ROSlow HSCs* era capaz de mantener su capacidad de autorrenovación a lo largo de todo un ensayo de trasplantes seriados, mientras que esta capacidad disminuía gradualmente en la población *ROShigh HSCs*. El tratamiento de la población *ROShigh HSCs* con el antioxidante NAC restauró la actividad funcional de esta población celular. Estos resultados sugieren que los niveles intracelulares de ROS en las HSCs regulan la capacidad de autorrenovación a largo plazo de dichas células. Todas estas evidencias sugieren que el mantenimiento de unos niveles bajos de ROS en las HSCs dependería de la interacción de las mismas con factores existentes en su propio nicho. Aunque sigue sin estar claro como las HSCs son capaces de regular sus niveles intracelulares de ROS, actualmente se considera que los ROS son un nuevo medio para el control de la homeostasis y de las funciones de este importante grupo celular.

Uno de los mecanismos por los cuales se podría llevar a cabo el control de los niveles de ROS en las HSCs es mediante la regulación de la transcripción de genes clave mediante las proteínas de la familia Forkhead O (FOXO). Esta familia de factores de transcripción incluye FOXO1, FOXO3a, FOXO4 y FOXO6. Todos ellos son importantes dianas de la ruta de señalización PI3K-AKT (Greer y Brunet, 2005). Cuando un factor de crecimiento se une a su receptor de superficie específico, la ruta PI3K-AKT se activa. Entonces AKT en su forma activa fosforila directamente a los FOXOs en tres puntos de fosforilación conservados evolutivamente, lo cual se traduce en su salida del núcleo vía

interacción con una proteína 14-3-3 para su subsecuente degradación en el citoplasma. En ausencia de estimulación por factores de crecimiento, los FOXOs se encuentran en el núcleo en su forma activa, donde inducen libremente la transcripción de sus genes diana (Figura I-12) que se han relacionado con diversos procesos fisiológicos, tales como la parada del ciclo celular, la resistencia al estrés, la inducción de la apoptosis y la detoxificación de ROS (Coffer y Burgering, 2007). Los factores de transcripción FOXO son reguladores no sólo del estrés oxidativo, sino también de la capacidad de autorrenovación de las HSCs. Así, se ha comprobado que tras la degradación de los factores FOXOs en el citoplasma de las HSCs, como consecuencia de la activación de la ruta PI3K-AKT mediada por citoquinas, se produce una pérdida en la capacidad de repoblación de las HSCs. Asimismo se han realizado varios estudios analizando la implicación de los genes de la familia FOXO sobre la capacidad de autorrenovación de las HSCs utilizando ratones “knockout” (Miyamoto et al, 2007; Tothova et al, 2007). En general estos estudios confirman una reducción del número de células hematopoyéticas inmaduras, tanto HSCs como progenitores de los distintos linajes. La pérdida de Foxo3a parece significativamente esencial, ya que produce una reducción de la expresión de múltiples reguladores negativos del ciclo celular, lo que conlleva un defecto en el mantenimiento de la quiescencia de las HSCs y una pérdida también de la capacidad para reconstituir la hematopoyesis a largo plazo (Miyamoto et al, 2007). Por otro lado, FOXO3a parece jugar un papel importante también en la regulación de los niveles intracelulares de ROS de tal manera que los ratones “knockout” utilizados por *Miyamoto et al.* mostraban niveles de ROS elevados, así como una reducción en la expresión de la SOD2 y de la catalasa (genes diana de la familia FOXO implicados en la detoxificación de los ROS). Ya que el incremento de ROS afecta al mantenimiento de la quiescencia de las HSCs, podría ser que la deficiencia de FOXO3a produjera las anormalidades en el ciclo celular observadas en las HSCs de ratones FOXO3a^{-/-} vía desregulación de ROS.

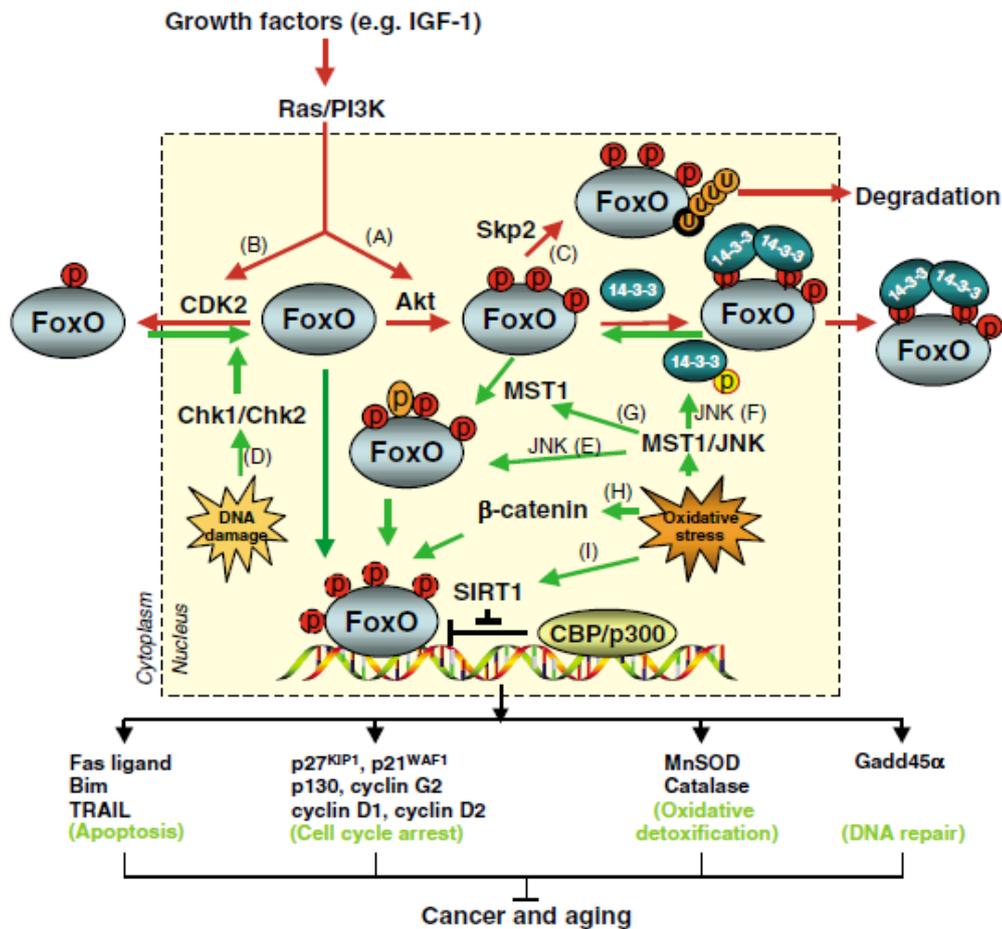


Fig. I-12. Representación esquemática de la regulación de las proteínas FOXO por factores externos e internos. Tomada de (Huang y Tindall, 2007).

Todas estas evidencias sobre la implicación de los ROS en la regulación de la autorrenovación de las HSCs, sugieren que la manipulación de los niveles de ROS podría ser una herramienta terapéutica en trasplantes de médula ósea, tratamientos antienvjecimiento o en medicina regenerativa.

Además, parece que cambios mutacionales dentro de las rutas de señalización que regulan la autorrenovación de las HSCs podrían estar implicados en el desarrollo leucémico. Comparadas con el resto de células sanguíneas diferenciadas, las HSCs están expuestas al estrés oxidativo durante periodos de tiempo mucho más largos. Este estrés oxidativo podría generar ROS, que causarían mutaciones en genes supresores de tumores o en genes clave responsables del mantenimiento de la estabilidad genómica. Como consecuencia de su larga esperanza de vida, las HSCs acumularían suficientes mutaciones

dependientes de ROS como para producirse transformación maligna y generación de células madre leucémicas (LSCs del inglés “Leukaemic Stem Cells”). Por lo tanto, el estudio de la regulación de los niveles intracelulares de ROS en las HSCs ayudaría no sólo a conocer mejor el proceso de autorrenovación sino también el proceso de leucemogénesis.

Desde hace algunos años se sabe que la señalización desencadenada por citoquinas hematopoyéticas va acompañada por un incremento de los ROS intracelulares (Sattler et al, 1999). Además, como acabamos de señalar, un mayor contenido de ROS se relaciona con una menor capacidad de autorrenovación por parte de las HSCs (Jang y Sharkis, 2007), mientras que otros trabajos sugieren una relación entre el incremento de ROS intracelulares y la diferenciación de HSCs (Owusu-Ansah y Banerjee, 2009; Tothova y Gilliland, 2007). Teniendo todo esto en mente, es razonable asumir que la producción de ROS podría estar jugando un papel directo en la diferenciación hematopoyética. Obviamente esta es una cuestión de suma importancia para comprender como se produce la diferenciación hematopoyética tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. A pesar de ello, hasta donde nosotros sabemos, no hay muchos trabajos que analicen en profundidad el papel de los ROS en la diferenciación hematopoyética, ni en lo que respecta a la diferenciación de HSCs (Owusu-Ansah y Banerjee, 2009; Tothova y Gilliland, 2007), ni en la diferenciación de linajes hematopoyéticos concretos (Yamamoto et al, 2009).

4. FOSFORILACIÓN EN TIROSINAS: PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASAS (PTPs)

El nivel de fosfotirosinas en las células viene determinado por el equilibrio entre las actividades de dos tipos de enzimas: proteína tirosina quinasas (PTKs, proteína-tirosina quinasa O-fosfotransferasa, E.C. 2.7.1.112) y proteína tirosina fosfatasas -también llamadas fosfotirosina fosfatasas (PTPs, proteína-tirosina-fosfato fosfohidrolasa, EC 3.1.3.48). Por lo tanto, si se desea conocer completamente el papel de la fosforilación en tirosinas es necesaria la caracterización de las PTKs y de las PTPs. Hasta hace unos pocos años se pensaba que el único cometido de las PTPs era revertir la acción de las PTKs. Las últimas evidencias están en contra de esta idea.

Aunque las PTPs se expresan tanto en eucariotas como en procariotas y en virus, la fosforilación en tirosinas se utiliza extensivamente sólo en eucariotas multicelulares. De hecho, la fosforilación de tirosinas es un mecanismo fundamental en numerosos aspectos de la fisiología eucariota, así como en los estados de salud y de enfermedad en la especie humana (Hunter, 1989; Mustelin et al, 2002). Las PTPs están implicadas en el control de los siguientes procesos: la forma y movilidad de las células, las decisiones de proliferar o diferenciar, la regulación de la transcripción de genes y el procesamiento del ARNm, y el transporte de moléculas hacia el exterior o interior celular. También juegan un papel importante en la coordinación de dichos procesos entre células vecinas durante la embriogénesis, el desarrollo de órganos, la homeostasis tisular y, asimismo, en el sistema inmune. Por otro lado, la fisiopatología de numerosas enfermedades humanas adquiridas o heredadas, desde el cáncer hasta las deficiencias inmunes, cursan con alteraciones en la fosforilación de tirosinas.

Hoy en día sabemos que las PTPs representan una familia de enzimas muy diversa. Así, se considera que en el genoma humano existen 107 genes que codifican PTPs (Alonso et al, 2004), lo que constituye un número muy similar a los 90 genes que codifican PTKs. Es decir, parece que por cada PTK habría al menos una PTP capaz de revertir su acción. Por lo tanto, podemos afirmar que las PTPs son un grupo ampliamente distribuido y tan numeroso como el de las propias PTKs.

4.1. Características estructurales y clasificación de las PTPs.

Las PTPs se localizan preferentemente en el citoplasma celular, aunque también pueden asociarse a membranas o incluso ser receptores de membrana plasmática (Brautigan y Pinault, 1991). En menor medida también aparecen en el núcleo, donde intervienen en los mecanismos de regulación de la expresión génica (Logan et al, 1994). Las PTPs, a pesar de su enorme variabilidad en tamaño y estructura, tienen un origen evolutivo común debido a la presencia en todas ellas de al menos un segmento conservado de unos 240 aminoácidos (Charbonneau y Tonks, 1992), donde se localiza una secuencia de 21 residuos invariables para toda la familia (Zhang et al, 1994), que corresponde al dominio catalítico. Este dominio se caracteriza por la presencia de un residuo de cisteína, que es esencial para la catálisis, y que se encuentra dentro de la secuencia conservada **[I/V]HCXAGXXR[S/T]** (Fischer et al, 1991). La cisteína parece formar un enlace tiol-fosfato intermediario durante la catálisis (Ishibashi et al, 1994).

Las PTPs se caracterizan, desde el punto de vista bioquímico, por su sensibilidad a la inhibición por vanadato, su insensibilidad al ácido ocadoico (inhibidor de serina/treonina fosfatasas), la no dependencia de iones metálicos para llevar a cabo su actividad, y porque pierden completamente su actividad cuando el residuo de cisteína es sustituido por un residuo de serina (Fauman y Saper, 1996). Todas ellas prefieren como sustratos a péptidos que contengan residuos de fosfotirosina, aunque algunos miembros de esta familia tienen doble especificidad, hidrolizando también residuos de fosfoserina o fosfotreonina.

Basándonos en la secuencia de aminoácidos de su dominio catalítico las PTPs pueden clasificarse en cuatro clases distintas (Alonso et al, 2004): Clase I, Clase II, Clase III y Clase IV.

➤ **Clase I:** PTPs dependientes de cisteína. Se caracterizan por la presencia de un residuo conservado de cisteína indispensable para la catálisis. Es el grupo más numeroso con diferencia. Se encuadran aquí las PTPs clásicas (Andersen et al, 2004), que únicamente desfosforilan residuos de tirosina, así como también las enzimas similares a VH1, cuya especificidad de sustrato es dual (DSPs), de tal forma que son capaces de desfosforilar residuos de fosfotirosina, fosfotreonina y fosfoserina, así como también sustratos no proteicos como fosfoinosítidos e incluso glúcidos complejos (Pulido y Hooft, 2008).

1. PTPs clásicas: Son las más estudiadas de todas las PTPs (Figura I-13).

Existen 38 genes en el genoma humano que codifican para estas PTPs

clásicas. Pueden subdividirse a su vez en PTPs transmembrana -PTPs de tipo receptor (RPTPs)- y PTPs intracelulares -PTPs de tipo no receptor (NRPTPs)-. Las 21 **RPTPs** se caracterizan por tener un dominio extracelular muy variable, un corto dominio transmembrana y normalmente dos dominios PTPs intracelulares (por ejemplo CD45 o LAR) cuyo significado funcional se desconoce. Tampoco se conoce con certeza si los dos dominios poseen actividad intrínseca. También hay casos de enzimas tipo receptor con un solo dominio catalítico como el caso de PTP α . Las 17 **PTPs intracelulares** se caracterizan por la presencia de un dominio PTP y dominios adicionales muy variables tanto en el extremo amino terminal como en el carboxilo terminal, que confieren distintos modos de localización subcelular y de regulación: dominios SH2 (SHP-1 y SHP-2), dominios de unión a membrana (PTP1B, TCPTP), dominios PEST (PTP-PEST), dominios de unión a citoesqueleto (MEG1, PTP-Bas) y dominios de unión a moléculas lipídicas (MEG-02, PTP-Bas).

2. PTPs de especificidad dual (DSPs): Existen aproximadamente 65 genes codificantes para este grupo de PTPs en el genoma humano (Tonks, 2006). De estos 65 genes, 11 de ellos codifican enzimas implicadas en la ruta de las quinasas activadas por mitógeno (Keyse, 1998; Saxena y Mustelin, 2000). Estas MAP quinasas fosfatasas (MKPs) se caracterizan por tener doble especificidad para fosfotreonina y fosfotirosina y presentar un dominio CH2 de unión a MAP quinasas (Bordo y Bork, 2002). Existen dos grupos de enzimas dentro de las DSPs que han evolucionado con el fin de defosforilar fosfatidilinositoles. Se trata del grupo de PTEN, codificado por 5 genes, que es capaz de defosforilar al fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato y del grupo de las miotubularinas (MTMs), codificado por 16 genes, que defosforilan principalmente al fosfatidilinositol-3-fosfato y al fosfatidilinositol-3,5-bisfosfato (Pulido y Hooft, 2008).

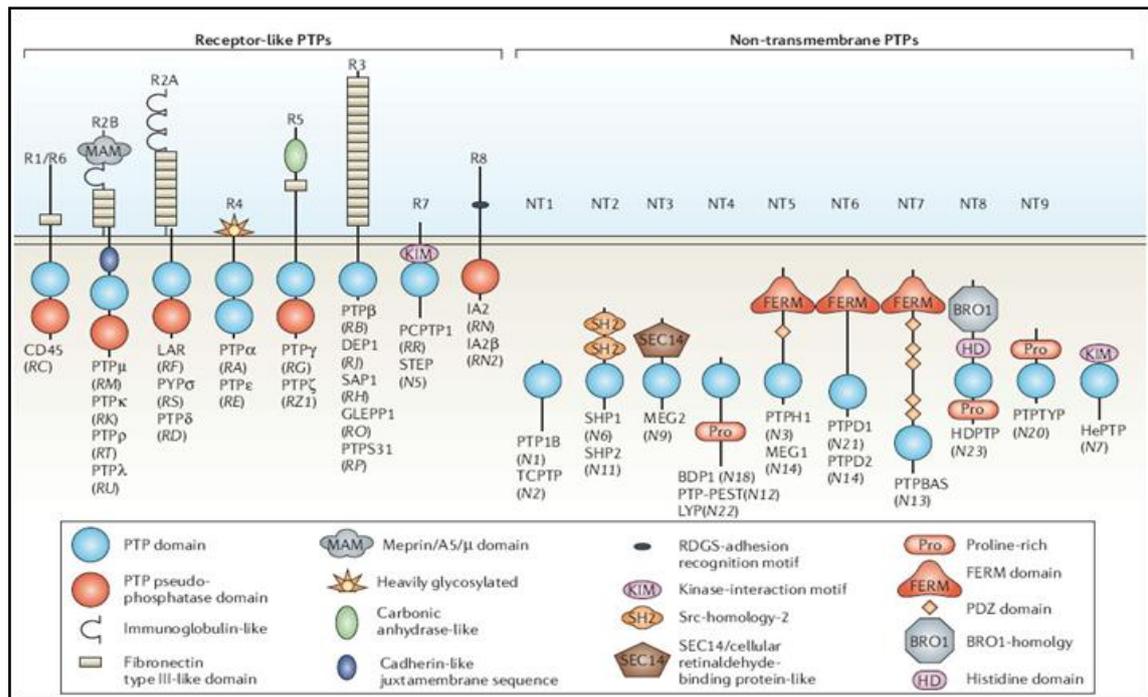


Fig. 1-13: Representación esquemática de las proteína tirosina fosfatases clásicas de tipo receptor e intracelulares. Tomado de (Tonks, 2006).

- **Clase II:** PTPs dependientes de cisteína. Se incluyen en este grupo a las PTPs de bajo peso molecular (LMWPTP). Actúan exclusivamente sobre residuos de fosfotirosina.
- **Clase III:** PTPs dependientes de cisteína. Pueden hidrolizar tanto residuos de fosfotirosina como de fosfotreonina. En este grupo se incluyen únicamente los tres p80^{Cdc25} reguladores del ciclo celular.
- **Clase IV:** PTPs dependientes de ácido aspártico. Estas enzimas utilizan un mecanismo catalítico distinto dependiente de un residuo de aspartato y un catión. Se incluyen aquí las proteínas EyA que son fosfatases duales para fosfoserina y fosfotirosina.

4.2. Regulación de la actividad PTP por oxidación.

Las PTPs tienen una alta actividad específica y una alta afinidad por su sustrato, lo que sugiere que *in vivo* pueden actuar como una barrera importante frente a la acción de las PTKs y, además, que su actividad debe estar regulada de modo muy estricto (Tonks et al, 1988; Tonks et al, 1990).

Tabla I-1. Oxidación reversible de PTPs en respuesta a diversos estímulos. Modificada de (Tonks, 2006).

PTP	Estímulo inductor de la oxidación	Referencias
PTP1B	EGF	(Lee et al, 1998)
PTP1B	Insulina	(Mahadev et al, 2001; Meng et al, 2004)
TCPTP	Insulina	(Meng et al, 2004)
SHP2	PDGF	(Meng et al, 2002)
SHP2	Estimulación receptor células T	(Kwon et al, 2005)
SHP2	Endotelina-1	(Chen et al, 2006)
SHP1	Estimulación receptor células B	(Singh et al, 2005)
CD45	Estimulación receptor células B	(Singh et al, 2005)
PTPκ	Radiación Ultravioleta	(Xu et al, 2006)
PTP-PEST	Migración celular endotelial	(Wu et al, 2005)
MKPs	TNF α	(Kamata et al, 2005)
MKPs	Estrés oxidativo neuronal	(Levinthal y Defranco, 2005)
PTEN	PDGF, EGF, Insulina	(Kwon et al, 2004; Seo et al, 2005)
LMW-PTP	PDGF	(Chiarugi et al, 2001)
LMW-PTP	Unión de Integrina	(Chiarugi et al, 2003)
LMW-PTP	Mutantes Rac activados	(Nimnual et al, 2003)

A pH fisiológico, el residuo de cisteína esencial para la catálisis se encuentra como anión tiolato, siendo vulnerable a la oxidación (Denu et al, 1996; Lohse et al, 1997; Zhang y Dixon, 1993). Muchos estímulos celulares, incluidos los factores de crecimiento, las citoquinas y la luz ultravioleta, inducen la producción de ROS (Tabla I-1), los cuales modifican los estados redox celulares y pueden oxidar la cisteína catalítica de las PTPs (Den Hertog et al, 2005; Meng et al, 2004; Van Der et al, 2003; Van Der et al, 2004).

En general, la oxidación de la cisteína en forma de anión tiolato a ácido sulfénico es reversible, sin embargo en condiciones muy oxidantes se induce una oxidación irreversible hasta ácido sulfónico (Figura I-14). El proceso de oxidación reversible no es exclusivo de las PTPs clásicas, de tal modo que la actividad de otras PTPs como PTEN, cdc25c y las LMW-PTPs también se regula por oxidación. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con las PTPs clásicas, estas PTPs no convencionales presentan dentro de la secuencia altamente conservada en su centro catalítico dos residuos de cisteína en lugar de uno. Como consecuencia, en estas enzimas se produce la formación de un puente disulfuro entre los dos residuos de cisteína que impide que se produzca la oxidación irreversible de la cisteína nucleofílica cuando las condiciones oxidantes son muy fuertes (Salmeen y Barford, 2005).

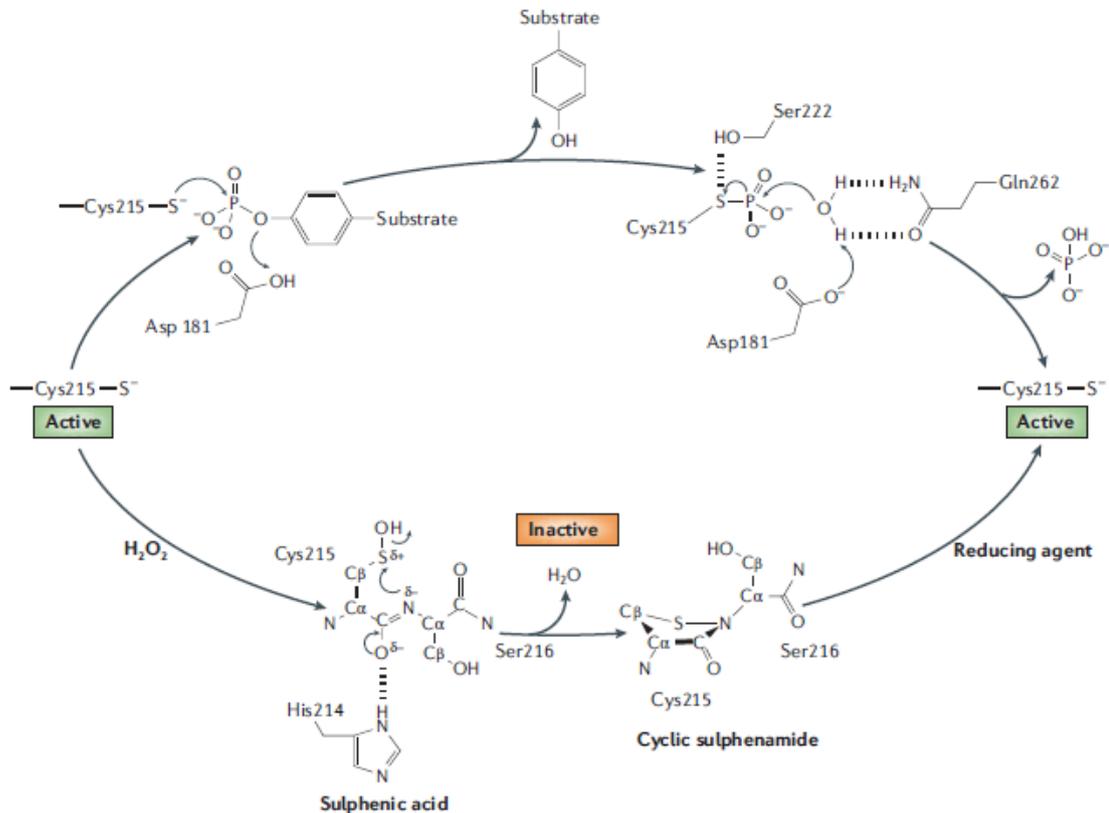


Fig. I-14. Reacción esquemática del proceso de oxidación reversible de las proteína tirosina fosfatasa. Tomado de (Tonks, 2006).

Según el modelo actual, diversos estímulos fisiológicos (Tabla I.1) desencadenan una producción localizada de ROS. Esta producción de ROS conlleva la oxidación y por tanto la inactivación de PTPs. Las PTPs normalmente actúan atenuando diferentes rutas de señalización. Sin embargo, como consecuencia de su inactivación por oxidación, se facilitará la fosforilación en residuos de tirosina, lo cual intensificará la señalización. La oxidación de las PTPs es un proceso transitorio, de tal modo que una vez finalizado el estímulo éstas son reducidas por tiorredoxina o glutatión, volviendo así a su estado activo, lo cual conlleva el final de la señalización por tirosina fosforilada.

Se trata, por lo tanto, de un nuevo modelo de control de las rutas de señalización mediadas por fosforilación en residuos de tirosina. Sin embargo, se desconocen aspectos fundamentales de este mecanismo de control. En particular, se desconoce cómo se controla la producción de ROS en respuesta a los estímulos. El complejo enzimático de la NADPH oxidasa es la principal fuente de ROS no mitocondrial (Nauseef, 2008) (Ver apartado 3.1.3). El ensamblaje de este

complejo enzimático está sometido a un estricto control, de tal forma que tras un estímulo externo las distintas subunidades se ensamblan siguiendo un mecanismo que depende de la fosforilación de las subunidades reguladoras (Lambeth, 2004). Además, para conocer como la oxidación de PTPs por ROS puede regular la señalización celular, es esencial saber cómo los ROS una vez producidos pueden presentar especificidad por una determinada PTP. Es probable que existan diferencias intrínsecas en cuanto a la sensibilidad de PTPs individuales en cuanto a su oxidación (Groen et al, 2005). También es probable que sean preferentemente oxidadas aquellas PTPs que se encuentran más próximas al punto de formación de los ROS. Así, se ha visto que Nox4 regula la oxidación de PTP1B en respuesta a insulina (Goldstein et al, 2005) y que ambas enzimas colocalizan en las membranas intracelulares (Martyn et al, 2006). Por lo tanto, es importante definir dónde tiene lugar la oxidación, la fuente precisa de los ROS y cómo se regula la localización de las PTPs.

Dentro de las PTPs plaquetarias, nuestro grupo de investigación describió, por primera vez, la sensibilidad de estas enzimas a la oxidación tanto por sistemas que producen ROS como por productos secundarios de la peroxidación lipídica (Hernandez-Hernandez et al, 1999b; Hernandez-Hernandez et al, 2005), lo que puede contribuir a la alteración de la fisiología de las plaquetas durante el almacenamiento en bancos de sangre (Hernandez-Hernandez et al, 2001).

Existen otros mecanismos por los cuales la actividad de las proteína tirosina fosfatasas puede ser regulada:

- **Control de la distribución subcelular** (Gu y Majerus, 1996; Maekawa et al, 1994; Moller et al, 1994).
- **Regulación de las RPTPs por unión a ligandos específicos** (Johnson y Van Vactor, 2003).
- **Fosforilación reversible** (Persson et al, 2004).
- **Interacciones proteína-proteína** (Brady-Kalnay et al, 1993; Sap et al, 1994; Wang y Bixby, 1999).
- **Rotura proteolítica** (Frangioni et al, 1993).

- **Regulación de las RPTPs por dimerización** (Bilwes et al, 1996; Gross et al, 2002).

4.3. Implicación de las PTPs en la hematopoyesis.

La diferenciación de las HSCs está regulada por la acción de diversas citoquinas, que son glicoproteínas capaces de desencadenar la activación de diversas rutas de señalización cuando se unen a su receptor específico. En muchas ocasiones, los receptores para estas glicoproteínas poseen actividad PTK, lo que indica que los procesos de fosforilación y desfosforilación en residuos de tirosina van a tener un papel muy importante durante la hematopoyesis. Por lo tanto, como cabría esperar, la función de determinadas PTPs es fundamental para que se lleve a cabo la hematopoyesis de manera correcta.

Hay varias PTPs que se expresan fundamentalmente en el sistema hematopoyético, como por ejemplo hePTP, PEST-PTP, SHP-1, o CD45 (Mustelin et al, 2005), lo que resalta el importante papel de esta familia de enzimas en las células sanguíneas.

Dos PTPs intracelulares muy similares, SHP-1 y SHP-2, que se caracterizan por presentar dos dominios SH2, parece que tienen efectos antagónicos en la hematopoyesis. SHP-2, que se expresa en numerosos tejidos, es indispensable para la hematopoyesis. Los ratones “knock-out” para este gen mueren hacia la mitad del periodo de gestación debido, entre otros defectos, a que no son capaces de llevar a cabo la hematopoyesis (Qu et al, 1998), sobre todo la diferenciación del linaje eritromieloide (Qu et al, 2001). Los últimos trabajos sugieren que SHP-2 es crítica en los primeros pasos de la diferenciación, actuando en la vía de LIF-gp130-STAT3 para mantener un balance adecuado de diferenciación, totipotencialidad y apoptosis en las HSCs (Chan et al, 2003). Por el contrario, SHP-1, que se expresa mayoritariamente en la línea hematopoyética, ejerce un efecto negativo sobre la hematopoyesis. Ratones que presentan mutaciones espontáneas de este gen se caracterizan por una producción aumentada de granulocitos, macrófagos, linfocitos y eritrocitos, por lo que se supone que SHP-1 actuaría como un regulador negativo del proceso de hematopoyesis (Siminovitch y Neel, 1998; Tsui y Tsui, 1994). SHP-1 interacciona

con los receptores para eritropoyetina, SCF e interleuquina 3, regulando de manera negativa la señal mitogénica de dichos receptores (Wickrema et al, 1999). Probablemente la SHP-1 es capaz de intervenir sobre la diferenciación hematopoyética en múltiples momentos a lo largo de todo el proceso de diferenciación (Paling y Welham, 2005).

PTP-1B, la enzima fundadora de la familia, ha sido implicada en el control de la fosforilación del receptor de insulina, y, por consiguiente, en el control del metabolismo glucídico (Tonks, 2003). La presencia de PTP-1B en células hematopoyéticas se conoce desde hace tiempo (Adachi et al, 1992; Yi et al, 1991), y últimamente se ha hecho evidente su capacidad para regular la hematopoyesis, en concreto, la diferenciación de la línea mieloide (Heinonen y Tremblay, 2006). Todas las células mieloides (eritrocitos, plaquetas y macrófagos) proceden de un progenitor común que se diferenciará en progenitores megacariocíticos/eritrocíticos o granulocítico/monocíticos según el esquema de hematopoyesis tradicional (Ver apartado 1.2). PTP1B afecta a la diferenciación de la línea mieloide, modificando la proporción de monocitos y macrófagos en favor de los primeros. Este efecto parece deberse a una mayor sensibilidad de las células a la citoquina CSF-1, gracias a la capacidad de PTP1B para regular la fosforilación del receptor de esta citoquina (Heinonen et al, 2006).

TC-PTP, una enzima muy similar a PTP1B, es muy abundante en células sanguíneas (Kamatkar et al, 1996; Lorenzen et al, 1995). La mutación de este gen en el ratón provoca letalidad entre las semanas 3 y 5 después del nacimiento debido a graves defectos en la hematopoyesis y en el sistema inmune. Parece ser que los defectos en la hematopoyesis no se deben a una disfunción de las células totipotenciales, sino a la incapacidad de las células del estroma para llevar a cabo la hematopoyesis (You et al, 1997). TC-PTP interviene en la vía de señalización iniciada por la interleuquina 6, desfosforilando STAT3 en el núcleo (Yamamoto et al, 2002).

Hay otras PTPs que parecen estar implicadas en la diferenciación terminal de megacariocitos, ya que su expresión se activa en líneas celulares sometidas a dicha diferenciación, como FLP1 (Dosil et al, 1996), PTP-RO (Taniguchi et al,

1999) o SHP-1 (Bruecher-Encke et al, 2001), mientras que la expresión de otras PTPs se activa en los primeros estadios de la hematopoyesis, como es el caso de PTP- γ (Sorio et al, 1997).

Aunque al parecer PTP-Bas se expresa en la mayoría de los linajes hematopoyéticos (Maekawa et al, 1994), por el momento no se ha descrito ninguna función de esta enzima en la hematopoyesis.

5. PTP- Bas.

PTP-Bas pertenece a una familia de PTPs, que también incluye a PTPH1/PTP-MEG y PTPD1/PTP-RL10, que se caracteriza por la presencia de un dominio FERM. Su nombre se debe a que inicialmente se clonó en una línea celular de basófilos (Maekawa et al, 1994). Posteriormente se clonó de forma paralela en líneas celulares de glioma humano y en líneas celulares de carcinoma de mama humano, llamándose PTP-L1 (Banville et al, 1994) y hPTP1e (Saras et al, 1994). También se la denomina PTPN13, que es el nombre del gen que codifica esta enzima, o FAP-1 por interactuar con la proteína Fas (Sato et al, 1995). Su homólogo en el ratón se llamó RIP o PTP-BL (“PTP-Bas like”) (Chida et al, 1995). La expresión del ARNm de PTP-BL varía de un tejido a otro. Al principio del desarrollo, PTP-BL es ubicua, pero en etapas posteriores su expresión es más evidente en los tejidos de origen epitelial y neuronal (Erdmann, 2003), aunque también se ha detectado en el tejido pancreático, el riñón, el músculo esquelético, el hígado, el pulmón, la placenta y el corazón (sobre todo en el riñón y el pulmón) (Banville et al, 1994). También se expresa en células T (Gjorloff-Wingren et al, 2000).

5.1. Estructura de PTP-Bas

PTP-Bas es una proteína de alto peso molecular con varias isoformas. Puede tener hasta 2490 aminoácidos y 276 kDa. Su estructura modular incluye diversos dominios (Fig I-4) que median numerosas interacciones con otras proteínas.

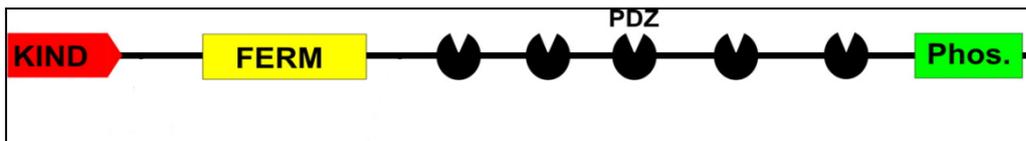


Fig. I-15. Representación estructural básica de PTP-Bas.

En la zona N-terminal (residuos 3 a 190) tiene un **dominio KIND** (“Kinase non catalitic C-lobe domain”) similar a un dominio quinasa, pero sin actividad catalítica (Ciccarelli et al, 2003). Se desconoce su función, pero podría mediar interacciones proteína-proteína. A continuación tiene un **dominio FERM** (residuos 568 a 781). Este tipo de dominios juega un papel importante en la conexión de receptores de membrana con el citoesqueleto (Chishti et al, 1998), y está presente en proteínas tales como la proteína 4.1 del eritrocito, la ezrina, la radixina y la moesina, y también en los supresores tumorales “expanded” y “merlin”, así como en las proteínas tirosinas fosfatasas PTP-MEG, PTPH1, PTP1D y CDEP. El dominio FERM de PTP-BL es capaz de unirse a moléculas de fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato de fracciones membranosas, lo que determina que la proteína se localice en el lado apical de células epiteliales polarizadas (Bompard et al, 2003; Cuppen et al, 1999b). Después del dominio FERM se localizan cinco **dominios PDZ** (“PSD-95/Drosophila disc large/Zonula occludens”) que abarcan los residuos 1102 a 1990. Estos dominios median interacciones proteína-proteína y son cruciales para la formación de complejos supramoleculares (Sheng y Sala, 2001). Se han descrito diversas moléculas que interaccionan con estos dominios:

1. **Dominio PDZ I**: interacciona con I κ B α (Maekawa et al, 1999) y con BP75 (Cuppen et al, 1999a).
2. **Dominio PDZ II**: interacciona con p75^{NTR} (Irie et al, 1999), con las proteínas adaptadoras RIL (Cuppen et al, 1998) y TRP-6/ZRP-1 (Cuppen et al, 1997; Murthy et al, 1999), con el receptor humano para Fas (Sato et al, 1995), y con la proteína supresora de tumores APC (Erdmann et al, 2000). Se han descubierto dos isoformas, PDZIIa y PDZIIb, con diferentes niveles de expresión en tejidos (Erdmann et al, 2000) y con distinta afinidad por APC [menor en PDZIIb, (Kachel et al, 2003)].
3. **Dominio PDZ III**: interacciona con la proteína quinasa PRK2 (Gross et al, 2001), una serina treonina quinasa citosólica regulada por la proteína G monomérica Rho, y que está implicada en la modulación del citoesqueleto de actina.
4. **Dominio PDZ IV**: interactúa con la proteína Parg activadora de la GTPasa de Rho (Saras et al, 1997), con el receptor transmembranal de efrina B (Lin et al, 1999),

así como con la proteína adaptadora RIL (Cuppen et al, 1997), con TRP-6/ZRP1 y con el receptor humano Fas/CD95 (Cuppen et al, 1997; Sato et al, 1995).

5. **Dominio PDZ V:** interacciona con el Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) (Zimmermann et al, 2002).

Finalmente, en la parte C-terminal encontramos el **dominio PTP** (aminoácidos 2087 a 2485) característico de la familia. Mutaciones cercanas al centro activo de PTP-Bas están relacionadas con un número significativo de tumores colorrectales y funcionalmente producen un descenso significativo de la actividad enzimática (Villa et al, 2005).

A esta complejidad hay que añadir la existencia de diferentes isoformas producidas por empalme alternativo entre el dominio FERM y el primer dominio PDZ, y dentro del segundo dominio PDZ (Maekawa et al, 1994).

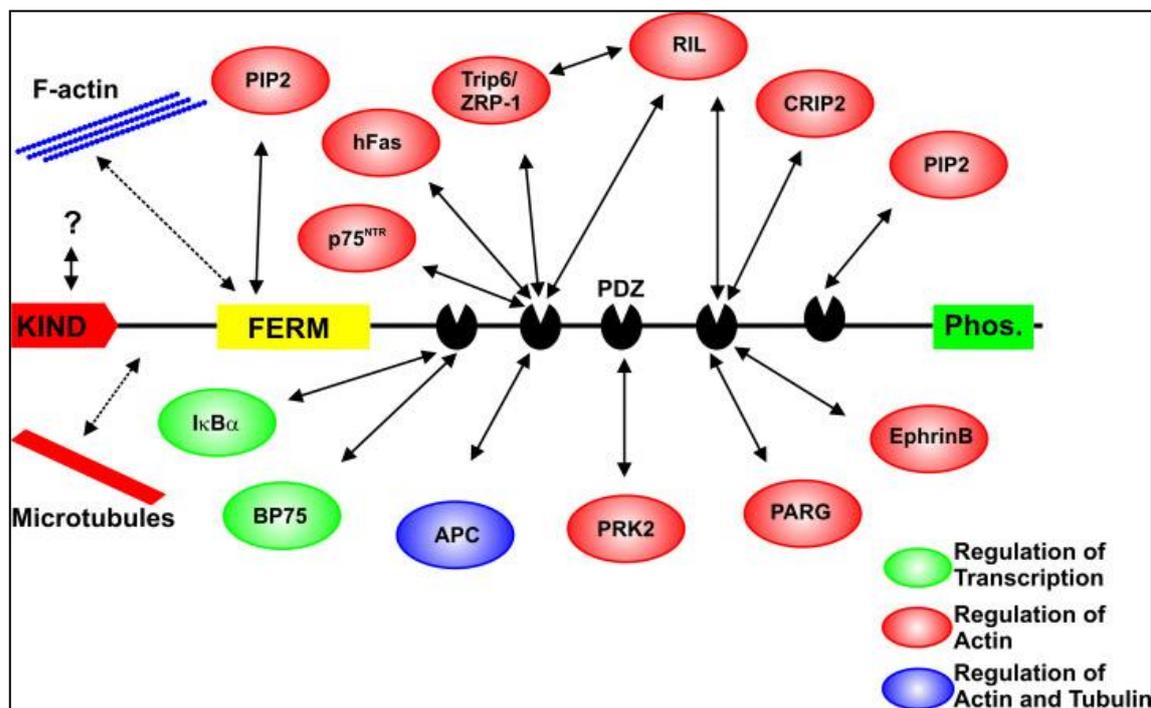


Fig. I-16. Representación esquemática de las interacciones de PTP-Bas. Tomado de (Erdmann, 2003).

5.2. Funciones de PTP-Bas

A pesar de los datos comentados anteriormente acerca de la expresión de PTP-Bas (PTP-BL) en el desarrollo embrionario y en diferentes tipos de

carcinomas, el conocimiento del papel funcional de PTP-Bas es limitado. Por una parte, al ser una proteína tan grande y con tantos módulos proteicos, es posible que esté implicada en diferentes funciones dependiendo de dónde y cuándo se exprese. Además, presenta varias isoformas, por lo que es probable que la función varíe entre ellas. Se ha propuesto que juega un papel en la regulación de la dinámica de los microfilamentos, en la citocinesis, en la apoptosis y en el crecimiento de las neuritas. La eliminación del dominio catalítico de PTP-BL en el ratón no provoca alteraciones morfológicas muy evidentes en los animales, que siguen siendo viables y fértiles, encontrándose defectos únicamente en la reparación de lesiones de nervios motores (Wansink et al, 2004). Nakahira et al. en el año 2007 analizaron los efectos de la deficiencia completa de PTP-BL, demostrando que PTP-BL es capaz de desfosforilar STAT4 y 6, y que su deficiencia provoca un defecto en la diferenciación de células T (Nakahira et al, 2007). En cualquier caso, parece probable que PTP-BL ejerza funciones importantes que no dependan de su actividad enzimática sino de algún otro de sus dominios, como proteína adaptadora o de andamiaje.

El sistema formado por la proteína Fas y su ligando FasL constituye el sistema esencial por el cual los linfocitos T citotóxicos y las células NK son capaces de inducir la apoptosis (Kägi, 1994). La proteína Fas es un receptor transmembranal de tipo I y un miembro de la familia de receptores de factores de necrosis tumoral y de crecimiento nervioso que es expresado en múltiples tejidos normales y distintos tipos de tumores. PTP-Bas ejerce un efecto regulador negativo en la señalización por Fas (Li et al, 2000; Saras et al, 1997; Sato et al, 1995), por lo que PTP-Bas confiere resistencia a la muerte celular inducida por Fas (Li et al, 2000). En humanos se ha comprobado que PTP-Bas está sobreexpresada en tumores de ovario. Hay correlación entre la expresión de PTP-Bas y la resistencia a la muerte celular inducida por Fas en líneas celulares de estos cánceres (Lee et al, 2001; Sato et al, 1995). La explicación radica en que PTP-Bas es capaz de regular negativamente la expresión de Fas en la superficie celular, bien debido a un descenso directo de los niveles de Fas en la membrana plasmática, o bien porque afecta al reciclaje de Fas desde los almacenes intracelulares (Cao et al, 1999; Swiatecka-Urban et al, 2002). PTP-Bas también parece intervenir en la quimioresistencia del cáncer de colon, ya que se ha visto que estas células no sufren apoptosis a pesar de que presentan en su superficie el receptor de Fas y altos niveles de su ligando en sangre (O'Connell et al, 1998; von Reyher et al, 1998). Cuando se trataron células de cáncer de colon con interleucina-2 se observó un incremento en la sensibilidad de estas células a la

apoptosis mediada por Fas, lo cual se correlacionó directamente con una disminución en los niveles de PTP-Bas (Song et al, 2001).

Sin embargo, también existen evidencias de que PTP-Bas es capaz de inducir apoptosis. Así se ha visto que esta PTP induce apoptosis en las células MCF7, uno de los modelos más utilizados para estudiar el cáncer de mama (Bompard et al, 2002). La sobreexpresión de PTP-Bas en estas células induce la defosforilación de la proteína IRS1, sustrato del receptor de insulina, lo que resulta en la inhibición del crecimiento celular regulado por PI-3K y de las respuestas de supervivencia (Freiss y Vignon, 2004).

PTP-Bas puede regular la transcripción génica debido a sus interacciones con I κ B α (inhibidor del factor de transcripción NF κ B) y BP75. PTP-Bas defosforila a I κ B α *in vivo*, suprimiendo así su disociación del factor de transcripción NF κ B, e impidiendo su translocación al núcleo y la subsiguiente activación de la transcripción (Maekawa et al, 1999) (Figura I-17). Por otra parte, BP75, proteína de alrededor de 75 kDa, se caracteriza por contener bromodominios (Cuppen et al, 1999a). Estos bromodominios se definen como una secuencia conservada de 110 aminoácidos, que se encuentra en cerca de 40 proteínas, y que son importantes en la ubicación de las proteínas y de los complejos proteicos en lugares específicos del cromosoma vía unión a histonas acetiladas (Jeanmougin et al, 1997; Palmer et al, 2002).

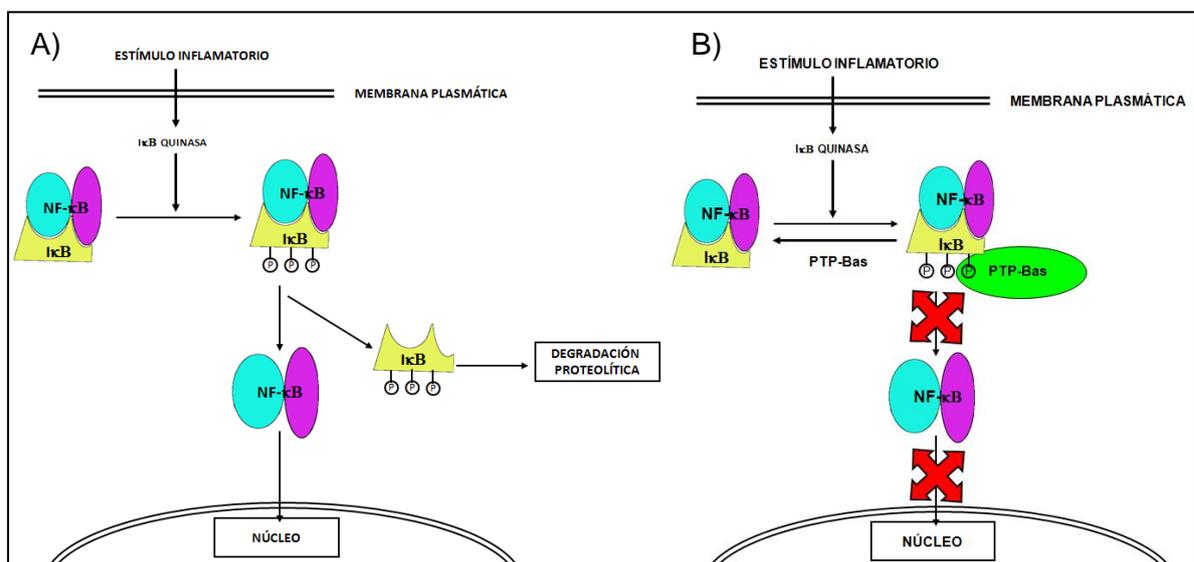


Fig I-17. Representación esquemática del mecanismo de control de la transcripción por I κ B α y PTP-Bas de los genes diana para NF κ B. A) I κ B α se fosforila y degrada permitiendo la entrada de NF κ B en el núcleo. B) PTP-Bas defosforila a I κ B α impidiendo la disociación de esta proteína de NF κ B y por lo tanto la llegada de este factor de transcripción al núcleo.

Además, PTP-Bas tiene un efecto regulador negativo en la señalización por fosforilación de la efrina B. El sistema efrina B/receptor efrina B regula una variedad de procesos de desarrollo, incluyendo la migración celular, la angiogénesis, la segmentación y la formación de compartimentos de barrera tales como la sinaptogénesis y la orientación del axón. PTP-Bas desfosforila *in vitro* los dominios de tirosina conservados de la molécula de efrina B (Palmer et al, 2002), lo que evita el reclutamiento de proteínas con dominios SH2 implicadas en el desencadenamiento de la señalización intracelular pertinente.

Se ha sugerido también que PTP-Bas está implicada en la regulación de la citoquinesis ya que se localiza en los centrosomas durante la interfase y la metafase, y en la zona media durante la anafase (Herrmann et al, 2003). Durante la anafase se asocia a la F-actina del anillo contráctil por su dominio FERM, y a los microtúbulos de la zona media por su extremo N terminal. Este dominio también es necesario y suficiente para su unión al lado apical de las células epiteliales MDCK (Cuppen et al, 1999b).

Además, PTP-Bas debe jugar un papel en la atenuación de la señalización mediada por PI-3K, aunque todavía se desconocen los sustratos precisos (Bompard et al, 2003).

Recientemente, Ghiran *et al.* han descubierto que PTP-Bas está implicada en la correcta localización de la proteína CR-1 (Complement Receptor 1) en la membrana de los eritrocitos (Ghiran et al, 2008). CR-1 es una proteína de tipo receptor cuya función es reconocer y unirse a partículas opsonizadas (microorganismos o complejos inmunes) (Cornacoff et al, 1983; Fearon y Austen, 1980), lo cual permite su retirada del sistema circulatorio por la acción de los macrófagos alojados a nivel del hígado y del bazo (Cosio et al, 1990; Lobatto et al, 1987). El receptor CR-1 presenta en su dominio citosólico dos motivos PDZ a través de los cuales se unirá a los dominios PDZ 2, 3 y 5 de PTP-Bas. Esta unión determina la correcta localización en la membrana del complejo CR-1/PTP-Bas, ya que esta enzima es capaz de unirse simultáneamente a la actina del citoesqueleto y a los lípidos de la membrana mediante su dominio FERM (Ver apartado 5.1). Se trata por lo tanto, del primer estudio en el que se describe la presencia de PTP-Bas en eritrocitos.

La proteína de unión a la secuencia consenso del interferon (ICSBP) es una proteína reguladora que controla múltiples aspectos de la mielopoiesis. De tal modo que esta proteína se expresa exclusivamente en células mieloides y células B. Entre los genes activados por ICSBP durante la diferenciación de células mieloides se encuentran entre otros los genes codificantes de las distintas subunidades del complejo enzimático

de la NADPH oxidasa (gp91^{phox} y p67^{phox}) (Eklund et al, 1998; Eklund y Kakar, 1999; Kim et al, 1999; Rehli et al, 2000; Wang et al, 2000). Llama la atención en este sentido, que en un trabajo publicado en el año 2008 por el grupo de Eklund se sugiere que ICSBP podría regular negativamente la transcripción del gen codificante de PTP-Bas, PTPN13, durante la diferenciación mieloide (Huang et al, 2008). La interacción de ICSBP con el promotor de PTPN13 se produciría según este estudio de una manera dependiente de fosforilación en residuos de tirosina. Por lo tanto, según este modelo el sistema ICSBP/PTP-Bas estaría implicado en la regulación de la diferenciación de todo el linaje mieloide, así como también en la regulación de la apoptosis en este mismo sistema por la interacción de PTP-Bas con la proteína proapoptótica Fas.

CAPÍTULO II: Objetivos

Los niveles de fosfotirosinas en las células están regulados por el equilibrio entre las PTKs y PTPs. La actividad de las PTPs se puede regular por oxidación reversible como consecuencia de la producción intracelular de ROS.

El papel de los ROS como “segundos mensajeros” está empezando a ser plenamente aceptado por la comunidad científica, a pesar de que aún se sabe poco acerca de su mecanismo de acción. Como se ha indicado en la introducción los ROS parecen ser importantes en la regulación de la biología de las HSCs (Jang y Sharkis, 2007). Además se sabe que las citoquinas hematopoyéticas señalizan vía ROS (Sattler et al, 1999), sin embargo, hasta donde nosotros sabemos no hay muchos estudios que analicen la implicación de los ROS en la diferenciación hematopoyética, ni en lo que respecta a la diferenciación de HSCs (Owusu-Ansah y Banerjee, 2009; Tothova et al, 2007), ni en la diferenciación de linajes hematopoyéticos concretos (Yamamoto et al, 2009).

Por lo tanto, el **OBJETIVO GENERAL** que nos propusimos en esta Tesis Doctoral era averiguar si la producción de ROS es importante para la diferenciación megacariocítica y comenzar a estudiar si las PTPs, y en concreto PTP-Bas, están implicadas en dicho proceso de diferenciación.

Dicho objetivo general se concreta aquí con el estudio de una serie de **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Averiguar si los ROS son importantes para la diferenciación megacariocítica.
2. Analizar el origen de los ROS implicados en megacariopoyesis.
3. Análisis de las principales rutas de señalización implicadas en la diferenciación megacariocítica y su posible regulación por ROS.
4. Estudiar si la actividad PTPásica varía a lo largo de la diferenciación megacariocítica.
5. Analizar si la expresión de algunas PTPs descritas en plaquetas (PTP1B, SHP1, SHP2 y PTP-Bas) varía a lo largo de la diferenciación megacariocítica.
6. Comenzar a estudiar el papel de *PTP-Bas* en la diferenciación megacariocítica.

CAPÍTULO III: Materiales y Métodos

1. APARATOS Y MATERIALES.

1.1. Aparatos.

- Agitador balancín BFR 25 de “Grant Boekel”.
- Agitador magnético Minimix de “OVAN”.
- Aparatos de electroforesis horizontal: GNA 100 de “Pharmacia Biotech” y “BioRad DNA Sub Cell™”.
- Autoclaves: Steam Sterilizer de “Raypa” y Autester-G de “Selecta”.
- AutoMACS™ Pro Cell Separator de “Miltenyi Biotec”.
- Balanza analítica 40SM-200A de “Precisa” y granataria Electronic Scale de “Want”.
- Baño termoregulables: SBS TFB serie B, Memmert y Retostat.
- Cámara Gel Logic 100 Imaging System de “Kodak”
- Campanas de flujo laminar LABCONCO Purifier class II Biosafety Cabinet, de “Delta Series”.
- Centrífugas: Biofuge 15 de “Heraeus Sepatech”, Allegra™ 21R Centrifuge de “Beckman coulter”, Microfuge Lite Centrifuge J2-21M de “Beckman” y 5810R Centrifuge de “Eppendorf”, Cytospin2 de “Shandon”.
- Citómetro FACSCalibur de “Becton Dickinson Biociences”.
- Congeladores: de -20° C “IGNIS” y de -80° C Forma -86C ULT Freezer de “Thermo Electron Corporation”.
- Contenedor de nitrógeno líquido “Thermo Forma”.
- Electroporador Gene Pulser de “BioRad”.
- Escáner Hewlett-Packard, modelo Scanjet 3C.
- Espectrofotómetros RNA/DNA calculator de “GeneQuant pro”, U-200 de “Hitachi” y Unicam 8675 Visible Spectrometer de “ATI Unicam”.
- Incubadores de “Heraeus”, de “Mettler”, ISF-1-W de “Kühner” y Orbital Shaker de “Thermo Forma”.
- Lectores de ELISA: ELx800 de “BIO-TEK Instruments, Inc”, Multiskan FC de “Thermo Scientific” y Varioskan Flash “Thermo Electron Corporation”.
- Máquina de revelado para Western “Medical X-ray Processor” de “Kodak”.
- Microscopios de luz invertida: Olympus 1X51 y Nikon TMS.
- pH-metro Crison microP 2001.

- Roller mix (agitador) de “Ovan”
- Secuenciador capilar automático 3100 Genetic Analyzer de “Applied Biosystems Hitachi”.
- Sistema de electroforesis vertical, sistema para el montaje de los cristales y polimerización de los geles de poliacrilamida de “BioRad”.
- Sistema de purificación de agua ultrapura Milli Q (Millipore).
- Termocicladores: PTC-100 de “MJ Research Inc” y Mastercycler egradient de “Eppendorf”.
- Transiluminador TFX 35M de “Vilber Lourmat”.
- Unidades de corriente: Electroforesis Power Suply EPS 200 de “Pharmacia Biotech”, GPSU-200/100 de “BioRad DNA Sub Cell™” y “Power Pac HC y Power Pac Basic de “BioRad”
- Otros aparatos de uso frecuente en el laboratorio.

1.2. Material biológico.

1.2.1. Líneas celulares.

Todas las líneas celulares que se emplearon en este trabajo son de origen humano.

- **HEK 293:** Línea celular derivada de células tumorales de riñón humano embrionario. Se crecieron en DMEM-10%FBS/PS/Gln a 37° C en una atmósfera del 5% de CO₂.
- **HEL:** Línea celular eritroleucémica derivada de un paciente con linfoma de Hodgkin. Se crecieron en RPMI 1640-10%FBS/PS/Gln a 37° C en una atmósfera del 5% de CO₂.
- **K562:** Línea celular eritroleucémica derivada de un paciente con leucemia mielogénica crónica (CML). Se crecieron en RPMI 1640-10%FBS/PS/Gln a 37° C en una atmósfera del 5% de CO₂.

1.2.2. Células primarias hematopoyéticas.

En el presente trabajo se emplearon células primarias humanas hematopoyéticas (HSCs) tanto de sangre periférica de donantes adultos (PB-HSCs) como de sangre de cordón umbilical (UCB-HSCs). Inicialmente se aislaron

células mononucleadas de baja densidad (MNCs) mediante separación en gradientes de ficoll, a partir de las cuales se aislaron posteriormente los precursores hematopoyéticos empleando anticuerpos frente a CD34 (CD34⁺ Microbead Kit) y un proceso de purificación inmunomagnético mediante el empleo del AutoMACS™ Pro Cell Separator (Miltenyi Biotec).

Las células humanas hematopoyéticas de sangre periférica se obtuvieron a través de una colaboración con el Dr. Luis Ignacio Sánchez Abarca y el Dr. José Antonio Pérez Simón (Departamento de Hematología, Hospital Clínico Universitario de Salamanca, Salamanca). Para ello se contó con la autorización pertinente del Hospital Clínico Universitario de Salamanca y se obtuvo el consentimiento informado de los donantes voluntarios para la realización de dichos experimentos de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

Las células humanas hematopoyéticas de cordón umbilical se obtuvieron a través de una colaboración con el Dr. César Trigueros (Fundación Inbiomed, Fundación para la Investigación de Células Madre, San Sebastián)

1.2.3. Plaquetas humanas.

En ocasiones se emplearon muestras de plaquetas humanas que se obtuvieron por centrifugación a 4.300 x g durante 10 minutos a 4° C a partir de concentrados plaquetarios proporcionados por el Centro de Hemoterapia de Castilla y León.

1.2.4. Cepas bacterianas.

- ***Escherichia coli* DH5α:** Cepa bacteriana utilizada para transformar por choque térmico. Se crecieron generalmente en medio de cultivo LB a 37° C.

1.3. Material informático.

- **Adobe Photoshop:** Procesamiento de las imágenes de microscopía.
- **Cell Quest Pro “BD Biociences” y WinMDI 2.9** (Joseph Trotter, Universidad de Purdue, West Lafayette, Indiana, US): Se emplearon estos programas para la adquisición y análisis, respectivamente, de muestras de citometría de flujo.

- **DP Controller “Olimpus”:** Realización de fotografías al microscopio de luz invertida Olympus 1X51.
- **Kodak Digital Science 3.6 y Quantity One “BioRad”:** Para realizar fotografías de geles de agarosa y cuantificar películas de transferencia de Western.
- **Paquete DNA STAR:** Se emplearon los programas de este paquete de software para el análisis de secuencias de ADN y el diseño de oligonucleótidos.
- **Paquete Microsoft Office:** Realización de la redacción del trabajo, construcción de figuras y análisis de resultados.

2. REACTIVOS.

Todos los productos empleados en este trabajo fueron de calidad analítica.

- Los siguientes reactivos fueron suministrados por Sigma Chemical Co (Sigma-Aldrich-Química, Madrid, España): *N*-acetil-L-cisteína (NAC), anfotericina B, anticuerpo anti- β -tubulina, bromuro de etidio, citocromo C, cloroquina, 2',7'-diacetato de diclorohidrofluoresceína (DCFDA), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), difenileneiodonium (DPI), dimetilsulfóxido (DMSO), forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), inhibidor selectivo de la quinasa c-Jun N-terminal (JNK) SP600125, yoduro de propidio (IP), nicotin adenin dinucleótido fosfato (NADPH), ortovanadato sódico, quercetina, ribonucleasa A, seroalbúmina bovina (BSA), superóxido dismutasa (SOD), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), Tetrametilrodamina etiléster (TMRE), Top-Block, TRI Reagent, tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), Triton X-100 y Tween 20 (polioxietileno 20 sorbitan monolaurato).
- Reactivos suministrados por LONZA (Barcelona, España): estreptomicina, medios de cultivo RPMI 1640 y DMEM, L-glutamina, penicilina, suero fetal bovino (FBS) y tripsina-EDTA.
- La trombopoyetina recombinante humana (TPO) y el medio de cultivo "Stem Cell Growth Medium" fueron adquiridos de Cellgenix GmbH (Freiburg, Alemania)
- Los inhibidores específicos de la proteína quinasa B (AKT) *Akt. Inhibitor X.*, de la Fosfatidilinositol3-quinasa (PI3K) *LY294002*, de la quinasa Janus (JAK2) *AG490* y el sulfato de geneticina (G418) fueron adquiridos a Calbiochem (Darmstadt, Alemania).
- El inhibidor específico de MEK U0126 fue adquirido de Promega Biotech Iberica (España).
- Los anticuerpos utilizados en citometría de flujo (CD42b-FITC, CD42b-PerCP, CD41-PE, CD61-APC, GpA-PE) fueron adquiridos de Immunostep (Salamanca, España).

- Los anticuerpos contra p-AKT (Ser 473), p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185), p-STAT3 (Tyr 705) y p-STAT5 (Tyr 694) proceden de Cell Signalling Technology (Danvers MA, USA).
- Los anticuerpos contra PTP-Bas (C20, L20 y H300), el anticuerpo secundario anti-cabra-HRP, p-ERK (E-4), ERK 1 (K-23), AKT 1/2/3 (H-136), JNK1 (FL), STAT3 (F-2), STAT5 (H-134) y p22^{phox} (C-17) fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).
- La acrilamida, bisacrilamida, dodecil sulfato sódico (SDS), persulfato amónico, *N,N,N',N'*-tetrametil-etilendiamida (TEMED) y las membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) fueron adquiridos en Bio-Rad Laboratories (Barcelona, España)
- El anticuerpo α -mouse IgG conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), el sistema de revelado de los Westerns (“ECL plus Western Blotting Detection System”) y el hyperfilm-ECL fue suministrado por GE Healthcare Limited (Buckinghamshire, Reino Unido)
- El kit de purificación inmunomagnético de células CD34⁺ “CD34⁺ Microbead Kit” se obtuvo de Miltenyi Biotec (Madrid, España).
- El “FACS lysing solution”, los anticuerpos α -PTP1B, α -SHP1 y α -SHP2 (Transduction Laboratories) y el “apoptosis detection kit” fueron adquiridos de BD Bioscience (Madrid, España).
- Los reactivos suministrados por Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) fueron: el anticuerpo α -rabbit IgG-HRP (Zymed), el marcador de peso molecular para SDS-PAGE “BenchMark™ Prestained Protein Ladder” y los kit de extracción de ADN plasmídico “HiPure Plasmid Midiprep” y “Quick Plasmid Miniprep”.
- El anticuerpo α -HA fue adquirido de Roche (Madrid, España).

- La retrotranscriptasa, (Revert Aid M-MULV RT), Taq ADN polimerasa, el kit de purificación de bandas de ADN “DNA Extraction Kit” y el marcador de tamaño de ADN “Gene Ruler™ DNA Ladder Mix” se obtuvieron de Fermentas (Domaine de Saint Paul, Francia)
- Los oligonucleótidos se obtuvieron de Isogen (Barcelona, España)
- La retronectina, la ligasa “T4 DNA Ligase” y las endonucleasas de restricción procedían de Takara (Saint-Germain-en-Laye, Francia).
- La O-fosfotirosina fue adquirida de Boehringer-Mannheim, Roche (Barcelona, España).
- Los restantes productos empleados en este trabajo fueron proporcionados por Probus (Badalona, España) o Panreac (Castellar del Vallés, España).

3. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES.

3.1. Medios de cultivo celular.

- **DMEM-10%FBS/PS/Gln:** DMEM suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% (inactivado por calentamiento a 55° C durante 1h), 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml estreptomicina, y L-glutamina 2 mM.
- **RPMI 1640-10%FBS/PS/Gln:** RPMI 1640 suplementado con FBS al 10% (inactivado por calentamiento a 55°C durante 1h), 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml estreptomicina, y L-glutamina 2 mM.
- **Stem Cell Growth Medium:** Medio de cultivo libre de suero para el mantenimiento de células primarias hematopoyéticas. Este medio fue suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml estreptomicina y anfotericina B 0,27 µM.

3.2. Medios de cultivo bacteriano.

- **LB (Luria-Bertoni):** Extracto de levadura 0,5%, bacto triptona 1%, NaCl 1% y NaOH 1mM.
- **LB-Agar:** Extracto de levadura 0,5%, bacto triptona 1%, NaCl 1%, NaOH 1mM y agar bacteriológico 1,5%.
- **TB (Terrific Broth Medium):** Extracto de levadura 2,4%, bacto triptona 1,2%, glicerol 0,4%, KH_2PO_4 0,17 M y K_2HPO_4 0,72 M.

3.3. Disoluciones y tampones.

Todas las disoluciones empleadas se prepararon con H₂O ultrapura.

- **PBS 1X (Solución amortiguadora de fosfatos):** NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 100mM, KH_2PO_4 2mM, pH 7,0.
- **Poliacrilamida al 40%:** acrilamida al 38.96% y bis-acrilamida al 1.04%.
- **Solución de bloqueo:** leche desnatada o TOP-BLOCK al 5% en tampón de lavado (TBS-tween).

- **Solución de arrastre de los anticuerpos unidos a una membrana de transferencia de Western (Solución de arrastre):** Tris 62,5 mM pH 6,8, SDS 2% p/v y β -mercaptoetanol 100 mM.
- **Soluciones de revelado de Western (AB):** Solución A (Luminol 1mM, Ácido cumárico 0,4 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8,5) y solución B (H_2O_2 0,02%, Tris-HCl 100 mM pH 8,5)
- **Solución de precipitación/purificación de ADN (Fenol/cloroformo/isoamílico):** Fenol/cloroformo 1:1. El cloroformo se estabiliza con alcohol isoamílico 4%. La mezcla se cubre con Tris-HCl 10 mM pH 8.
- **Solución de trabajo de yoduro de propidio:** IP 50 μ g/ml, Ribonucleasa A 0,1 mg/ml y Triton X-100 0,05% en PBS 1X.
- **Tampón de carga o de muestra para proteínas:** Tris 125 mM, SDS 2%, glicerol 5% v/v, azul de bromofenol 0,003% y β -mercaptoetanol 1%. Se ajustó a pH 6,8 con HCl.
- **Tampón concentrante:** Tris 0,5 M, pH 6,8 ajustado con HCl.
- **Tampón de anillamiento:** Acetato sódico 100 mM, acetato de magnesio 2 mM y HEPES 30 mM. Se ajustó a pH 7,4 con KOH.
- **Tampón de electroforesis de agarosa TAE (Tris-Acético-EDTA):** Tris 40 mM, ácido acético glacial 20 mM y EDTA 2 mM.
- **Tampón de electroforesis para Western 5X:** Tris 25 mM, glicina 200 mM y SDS al 0,1%, se ajustó a pH 8,3 con HCl.
- **Tampón de lavado (TBS-tween):** Tris 10 mM, NaCl 100 mM y Tween 20 0,05%, se ajustó a pH 7,5 con HCl.
- **Tampón de lisis MLB:** HEPES 25 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Igepal 1%, glicerol 10%, $MgCl_2$ 10 mM, EDTA 1mM, NaF 25 mM, Na_3VO_4 1mM e inhibidores de proteasas.
- **Tampón de lisis RIPA:** Tris-HCl 10 mM, NP40 1%, desoxicolato sódico 0,1%, SDS 0,1%, EDTA 1mM y NaCl 0,2M.
- **Tampón separador:** Tris 1,5 M, pH 8,8 ajustado con HCl.
- **Tampón STET:** Sacarosa 15%, Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 50 mM pH 8 y Triton X-100 1%.
- **Tampón de transferencia:** Tris 25 mM, glicina 190 mM y metanol 20% v/v.
- **TE (Tris-EDTA):** Tris 10 mM y EDTA 1 mM.

4. MÉTODOS.

4.1. Cultivos celulares y obtención de muestras.

Las células K562 y HEL se crecieron a una densidad de entre 2×10^5 células/ml y 5×10^5 células/ml. Para cambiar el medio se centrifugaron a $300 \times g$ durante 5 minutos a $4^\circ C$. Se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos 1X (PBS; Phosphate Buffer Saline) y se resuspendieron en medio RPMI fresco a una concentración de 2×10^5 células/ml, dejándose crecer hasta que la densidad llegaba a 5×10^5 células/ml.

Las células HEK 293, que se adhieren a la placa, se dejaron crecer hasta confluencia. Se retiró el medio de cultivo, se lavaron 2 veces con PBS y se añadió Tripsina-EDTA durante 1-2 minutos para liberar las células. Posteriormente, se añadió medio DMEM fresco y las células se depositaron en nuevas placas de cultivo diluyéndolas cinco veces.

4.2. Diferenciación de las células CD34⁺ y las líneas celulares.

Las células CD34⁺ son células totipotenciales hematopoyéticas, es decir son capaces de generar todos los linajes celulares de la sangre. En nuestro caso, lo que hicimos fue inducir la diferenciación megacariocítica de estas células primarias hematopoyéticas por tratamiento con trombopoyetina recombinante humana (TPO): las células CD34⁺ se resuspendieron en medio de cultivo sin suero (CellGro CellGenix) a una densidad celular de 1×10^5 células/ml y fueron sometidas a diferenciación megacariocítica por tratamiento con TPO 100 ng/ml durante 7 días.

Las células K562 y HEL se pueden diferenciar tanto a megacariocitos como a eritrocitos. La diferenciación a megacariocitos se llevó a cabo tratando las células con PMA 20 nM, recogiendo muestras a distintos tiempos.

Con la excepción del inhibidor AG490 con el que se incubó las células durante 60 minutos previamente a la inducción de la diferenciación megacariocítica por tratamiento con PMA o TPO, los demás inhibidores y antioxidantes empleados en el presente trabajo se añadieron 30 minutos antes del estímulo diferenciador (Tabla III-1).

Tabla III-2. Especificaciones de uso de los distintos antioxidantes e inhibidores empleados.

Compuesto	Concentración final	Vehículo	Factor de dilución
PMA	20 nM	DMSO	1:10.000
TPO	100 ng/ml	dH ₂ O	1:1.000
Quercetina	100 µM	DMSO	1:1.000
NAC	100 µM	PBS	1:1.000
Trolox	10 µM	EtOH 100%	1:1.000
DPI	5 µM	DMSO	1:1.000
Apocinina	12,8 µM	PBS	1:50
U0126	10 µM	DMSO	1:1.000
SP600125	10 µM	DMSO	1:1.000
LY294002	10 µM	DMSO	1:1.000
AKT inh.X	10 µM	DMSO	1:1.000
AG490	50 µM	DMSO	1:1.000
H₂O₂	50 µM	dH ₂ O	1:1.000
Pervanadato	50 µM	dH ₂ O	1:1.000

La apocinina se sometió a un tratamiento previamente a su adicción al medio de cultivo tal y como describen Vejrazka et al (Vejrazka et al, 2005). De modo general, en un tubo tipo Eppendorf se pusieron 240 µl de apocinina 4 mM, 1,2 ml de PBS, peróxidasa de rábano (HRP) 3U y 60 µl de H₂O₂ 3 ppm. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante una hora, tras lo cual se añadieron 8 kU de catalasa y se incubó a 37°C durante 15 minutos. Finalmente para detener la reacción la mezcla de apocinina se hirvió durante dos minutos.

4.3. Análisis de la diferenciación megacariocítica

Este fenómeno fue analizado empleando distintas aproximaciones.

4.3.1. Citometría de flujo.

Las células K562, HEL y CD34+ fueron sometidas a diferenciación megacariocítica con PMA o TPO tal y como se describe en el apartado anterior. Transcurrido el tiempo deseado de diferenciación, las células fueron procesadas para su análisis por citometría de flujo.

De forma estandarizada las células se mantuvieron en hielo durante dos horas previamente a su procesamiento. Esto se realizó ya que tanto las células HEL como las CD34+ se adhieren fuertemente al sustrato sobre el que están creciendo una vez se inicia la diferenciación megacariocítica. Tras este periodo y con la ayuda de la pipeta, conseguimos soltarlas totalmente y depositar el medio de cultivo, con las células en suspensión, en tubos tipo "Falcon". Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 300 x g durante 5 minutos a 4° C en una centrífuga de mesa Allegra™ 21R Centrifuge de "Beckman Coulter". Se aspiró el sobrenadante con una bomba de vacío y el sedimento celular se resuspendió en PBS 1X, poniendo por cada muestra 500.000 células en 50 µl de PBS 1X en un tubo de citometría. Posteriormente, estas células siguieron distintos tipos de tratamiento en función del tipo de estudio que se pretendiera llevar a cabo en el citómetro.

4.3.1.1. Análisis de la expresión de marcadores de superficie.

Para llevar a cabo el análisis de la diferenciación megacariocítica en función de la expresión de marcadores de superficie se emplearon tres marcadores megacariocíticos (CD42b, CD41 y CD61) y un marcador eritrocítico (glicoproteína A o GpA):

- **CD42b-FITC/PerCP:** Anticuerpo dirigido frente a la glicoproteína GPIX que forma un complejo con GPIb y GPV. Este anticuerpo lleva unido el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) cuyas longitudes de onda de excitación y emisión son respectivamente: 488 nm y 530 nm. Este fluorocromo permite que el anticuerpo CD42b sea detectado por el fotomultiplicador FL1 del citómetro correspondiente a la fluorescencia verde. En otros casos este anticuerpo se utilizó conjugado a un fluorocromo diferente como es el PerCP (del inglés "peridinin chlorophyll protein") 488/677 nm. Por lo tanto, en este caso el CD42b era detectado por el fotomultiplicador FL3 del citómetro.
- **CD41-PE:** Anticuerpo dirigido frente al complejo de GPIIb y GPIIIa. Lleva unido ficoeritrina (PE), que es un fluorocromo cuyas longitudes de onda de excitación y emisión son respectivamente: 488 nm y 575 nm. Este fluorocromo permite que el anticuerpo CD41 sea detectado por el fotomultiplicador FL2 del citómetro correspondiente a la fluorescencia roja.

- **CD61-APC:** Anticuerpo dirigido frente a la glicoproteína GPIIIa. Este Ac lleva conjugado alofococianina, que es un fluorocromo cuyas longitudes de onda de excitación y de emisión son respectivamente: 633 nm y 675 nm. A diferencia de los otros dos fluorocromos, que se excitan con el láser de argón del citómetro, la APC debe ser excitada con un láser de helio-neón, generando así una fluorescencia azul que es detectada por el fotomultiplicador FL4.
- **GpA-PE:** Este anticuerpo reconoce a la glicoforina A.

De forma general, las células se marcaron con 5 μ l de cada anticuerpo tal y como recomiendan las casas comerciales para 500.000 células, durante 15 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Trascurrido este tiempo, las células se lavaron con 2 ml de PBS y se centrifugaron a 400 x g durante 5 minutos a 4° C en la centrífuga Allegra™ 21R Centrifuge de “Beckman Coulter”. El sobrenadante fue aspirado de nuevo y el precipitado celular fue resuspendido en 250 μ l de PBS. Las células ya preparadas fueron adquiridas inmediatamente en un citómetro FACSCalibur utilizando Cell Quest Pro en la adquisición y WinMDI 2.9 en el análisis.

4.3.1.2. Análisis del contenido de ADN.

El marcaje de las células, en este caso, se lleva a cabo con yoduro de propidio (IP), que es un compuesto capaz de unirse a los ácidos nucleicos cuando la membrana celular pierde su integridad. La longitud de onda de excitación de este compuesto es de 488 nm, al igual que la de la PE. Sin embargo, la longitud de onda de emisión no coincide con la de la PE. De tal modo, que el IP puede ser detectado tanto en FL2 como en FL3.

En este caso, las células no se adquirieron en fresco, sino que se fijaron inicialmente. Así, éstas se resuspendieron en 500 μ l de FACSlysing solution 1X y se incubaron en esta solución durante 10 minutos en agitación en un Agitador balancín BFR 25 de “Grant Boekel”. Posteriormente las células se lavaron y se centrifugaron igual que en el apartado anterior y se permeabilizaron mediante el tratamiento de las mismas con 500 μ l de la solución de trabajo de yoduro de propidio (IP 50 μ g/ml, Ribonucleasa A 0,1 mg/ml y Triton X-100 0,05% v/v en PBS 1X). Las células se incubaron en esta solución a 37° C en oscuridad durante 40

minutos con el fin de que el IP se uniera al ADN (es necesario añadir a la solución de trabajo ribonucleasa A ya que el IP se une por igual al ADN y al ARN). Transcurridos los 40 minutos, las células se lavaron, centrifugaron y resuspendieron en 500 µl de PBS y finalmente se adquirieron en el citómetro FACSCalibur.

La adquisición de este tipo de muestras se realizó a un número bajo de eventos/segundo (células/segundo) ya que el ioduro de propidio aumenta la agregación celular y, en consecuencia, incrementa la probabilidad de aparición de dobletes que se pueden confundir con células poliploides. Se registró la fluorescencia para el IP tanto en FL2 en escala lineal como en FL3 en escala logarítmica. El análisis de la aparición de células poliploides durante la diferenciación se llevó a cabo utilizando el programa WinMDI 2.9.

4.3.2. Microscopía óptica.

Las células primarias CD34+ y las líneas celulares K562 y HEL se fotografiaron a distintos tiempos del proceso de diferenciación con el fin de observar el efecto de los distintos tratamientos sobre la morfología celular. Para la realización de las fotografías se empleó el microscopio de luz invertida Olympus 1X51 y el programa DP Controller. Las fotografías obtenidas tenían un aumento de 40 veces el tamaño original de la imagen.

Las células además se tiñeron con May-Grünwald-Giemsa con el fin de visualizar las características morfológicas de los megacariocitos. La técnica de coloración de May-Grünwald-Giemsa (STRUMIA et al, 1947), también denominada coloración panóptica de Pappenheim, se emplea habitualmente para la coloración de las células hemáticas. El colorante de May-Grünwald consta de una solución de eosina y de azul de metileno en alcohol metílico, que actúa como fijador. Su disolución en agua determina la disociación parcial de sus componentes, permitiendo su actuación como colorantes. El colorante de Giemsa es una combinación de eosina y derivados del azul de metileno (azur I y azur II). La acción combinada de ambos colorantes permite la correcta tinción de todas las estructuras celulares. Los núcleos adquieren una tonalidad rojo-violácea, los citoplasmas basófilos se tiñen de color azul y los acidófilos adquieren un tono rosáceo.

La preparación de las células para su tinción mediante esta técnica fue la siguiente:

1. En primer lugar se llevaron a cabo los citoespines con el fin de dejar adheridas las células en un portaobjetos. Así, las células se centrifugaron sobre un porta en una centrífuga especial para realizar citoespines: Cytospin2 de Shandon a 300 rpm durante 5 minutos.
2. Después, los citoespines se cubrieron con la solución de May-Grünwald (previamente filtrada) dejándola actuar durante unos 30 segundos. Se añadieron unas gotas de agua destilada, evitando que se virtiera el colorante, y se homogeneizó la mezcla para dejarla posteriormente actuar durante 3 minutos.
3. Se lavaron los citoespines con agua destilada y se tiñeron con el colorante de Giemsa (previamente filtrado y diluido en el momento de su uso en la proporción de 2 o 3 gotas de colorante por cada mililitro de agua destilada) durante 15-20 minutos. Los citoespines se volvieron a lavar con agua destilada y se dejaron secar.

Las células sometidas a diferenciación megacariocítica y teñidas con esta técnica generalmente se observan como células de mayor tamaño que sus precursores, con núcleos polilobulados o polisegmentados y con el citoplasma basófilo.

4.4. Ensayos de viabilidad celular

La viabilidad de las líneas celulares K562, HEL y de las células primarias CD34+ se determinó para los distintos tratamientos a los que se sometieron. Para llevar a cabo este tipo de estudio se empleó el kit comercial "AnnexinV-PE/7-AAD apoptosis detection kit" de BD Pharmingen siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se trataron las células durante 48 horas o 7 días con los distintos tratamientos en presencia de PMA o TPO respectivamente. Por lo tanto, comparamos en todos los casos la viabilidad celular para los distintos agentes siempre en presencia del estímulo inductor de la diferenciación megacariocítica (PMA o TPO). De forma general se pusieron, 5×10^5 células por muestra en un tubo de citometría, donde se lavaron con PBS y se resuspendieron en 100 μ l de "Binding Buffer" (1:10 diluido en dH_2O). En este tampón, que contenía Ca^{2+} , las células se marcaron con 5 μ l de anexina V-PE y 5 μ l de 7-aminoactinomicina D (7-AAD) y se incubaron en oscuridad y a temperatura ambiente durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron por adición a cada muestra de 400 μ l de "Binding Buffer"

1X. Para cada condición se adquirieron 50.000 células en el citómetro, las cuales se analizaron posteriormente empleando el programa WinMDI 2.9. Ya que la anexinaV es una proteína que se une específicamente a la fosfatidilserina en presencia de Ca^{2+} , fosfolípido que se externaliza en los procesos de apoptosis, y la 7-AAD se une específicamente al ADN (para lo cual es necesario que la membrana plasmática esté rota, proceso que ocurre frecuentemente en los últimos pasos de la apoptosis y en procesos de necrosis), se consideraron como células viables las anexina V/ 7-AAD dobles negativas.

4.5. Ensayos de proliferación mediante el sistema del MTT.

El método del MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] fue propuesto por Mosmann (Mosmann, 1983) como un método para evaluar los efectos citotóxicos de una sustancia así como para realizar estudios de proliferación celular. El MTT es una sal de tetrazolio de color amarillo, que se convierte en cristales de formazán de color azul oscuro-violeta por las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas. Después de la solubilización de los cristales de MTT en DMSO, se obtiene un medio de color violeta cuya mayor o menor absorbancia a 570 nm se relaciona directamente con el número de células vivas presentes en el cultivo.

Las células K562 y HEL, cultivadas y diferenciadas en presencia de distintos tratamientos durante 48 horas, se lavaron con PBS y se resuspendieron en una solución que contenía PBS y MTT 0,5 mg/ml en la cual se incubaron durante 75 minutos a 37°C. Posteriormente, las células se lavaron de nuevo con PBS y se resuspendieron en un volumen adecuado de DMSO para solubilizar el MTT y poder medir la absorbancia de las muestras a 570 nm.

4.6. Medida del potencial respiratorio mitocondrial.

La tetrametilrodamina etiléster (TMRE) es una sonda fluorescente catiónica que penetra en las células donde es secuestrada rápidamente por las mitocondrias activas. Por lo tanto, se utiliza frecuentemente para medir el potencial mitocondrial de las células.

En nuestro caso, la medida del potencial respiratorio de las mitocondrias con TMRE se llevó a cabo por citometría de flujo. Las líneas celulares K562 y HEL se trataron durante 48 horas con PMA 20 nM en presencia o ausencia de DPI 5 μ M. Transcurrido el tiempo de diferenciación, las células se centrifugaron, se lavaron con PBS y se resuspendieron en RPMI suplementado con FBS 1%. En este medio de cultivo, con baja concentración de suero, las células se incubaron con TMRE 10 nM durante 30 minutos a 37° C, después de lo cual se lavaron dos veces con PBS para finalmente resuspenderse

en este mismo tampón para el análisis de las mismas por citometría de flujo. El potencial respiratorio mitocondrial de las distintas muestras fue determinado como la fluorescencia media de las mismas detectada en el fotomultiplicador correspondiente a la fluorescencia roja (FL2).

4.7. Medida de los niveles de ROS intracelulares.

Los niveles intracelulares de ROS se valoraron por citometría de flujo mediante la tinción de las células con la sonda fluorescente oxidable 2',7'-diacetato de diclorohidrofluoresceína (DCFDA). La DCFDA es un compuesto no fluorescente que penetra en las células por difusión pasiva. Así, una vez en el citoplasma celular, la DCFDA es hidrolizada por la acción de diesterasas a 2',7'-diclorohidrofluoresceína (DCFH₂), compuesto que es susceptible de ser oxidado por los ROS dando lugar al compuesto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). Como la longitud de onda de excitación-emisión para la DCF es 488/530 nm, pudimos determinar la cantidad de ROS en una muestra celular en función de la fluorescencia media observada para la DCF en el fotomultiplicador FL1 del citómetro (fluorescencia verde).

Para llevar a cabo estos experimentos las células K562 y HEL se crecieron durante al menos 24 horas a baja densidad celular (por debajo de 3×10^5 células/ml). Posteriormente se centrifugaron aproximadamente 350.000 células por muestra y se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo RPMI/PS/Gln suplementado sólo con FBS al 1%, de tal forma que las células quedarán a la densidad celular habitual de $3,5 \times 10^5$ células/ml. En el caso de que las células fueran a recibir algún tratamiento, éstas se preincubaban con los distintos antioxidantes o inhibidores durante 2 horas, previamente a la inducción con PMA, en el medio de cultivo con baja concentración de suero. El pretratamiento de las células se llevó a cabo en el medio sin suero con el fin favorecer la entrada del antioxidante o inhibidor en las células. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en medio de cultivo completo al cual se reañadió el tratamiento inicial 30 minutos antes de la inducción con PMA a distintos tiempos. En todos los casos, la sonda se mantuvo en el cultivo celular durante 30 minutos a 37° C y a una concentración final 10 µM previamente al procesamiento de las células. Este procesamiento consistió en dos lavados consecutivos con PBS con

el fin de eliminar la sonda no unida a las células y en la resuspensión final del botón celular en 200 µl de PBS para su análisis por citometría de flujo.

En el caso de las células primarias CD34⁺, se pusieron por muestra alrededor de 50.000 células a una concentración de 1×10^5 células/ml en el medio de cultivo sin suero CellGro de CellGenix, y se dejaron en el mismo durante toda la noche previa al experimento. Si las células iban a recibir algún tratamiento, éstas se preincubaban durante todo ese tiempo con los distintos antioxidantes. El mismo día del experimento se reañadió el tratamiento inicial 30 minutos antes de la inducción con TPO a distintos tiempos. En todos los casos, la sonda se mantuvo en el cultivo celular durante 30 minutos a 37° C y a una concentración final 10 µM previo al procesamiento de las células. En el caso de las células CD34⁺ se realizó únicamente un lavado, de tal modo que se añadió 1 ml de PBS al cultivo celular, se centrifugaron las muestras y se resuspendieron en 200 µl de PBS para su análisis por citometría de flujo.

4.8. Medida de la producción extracelular de anión superóxido (O₂⁻).

La actividad NADPH oxidasa se valoró por la producción extracelular de O₂⁻, el cual se midió por el sistema de la reducción del citocromo C inhibible por la superóxido dismutasa (SOD). La reducción del citocromo C se registró a 37° C en un lector de placas de ELISA Varioskan Flash de “Thermo Electron Corporation” a 550 nm. La cantidad de O₂⁻ liberado se calculó usando un coeficiente de extinción molar de $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Para realizar el experimento se cogieron $2,5 \times 10^5$ células por muestra tanto para K562 como para HEL. Posteriormente, estas células se lavaron con PBS y se resuspendieron en este mismo tampón en un volumen final de 200 µl en placas de 96 pocillos. A todas las muestras, excepto al control negativo, se les añadió posteriormente NADPH 100 µM y citocromo C 250 µM. Para poder valorar si se producía incremento en la cantidad de O₂⁻ liberado en respuesta a la inducción con PMA y si este incremento era debido o no a la actividad NADPH oxidasa algunas muestras fueron pretratadas durante 30 minutos con DPI 50 µM previamente a la inducción con PMA 20 µM. En algunas de las muestras se añadió también superóxido dismutasa (SOD) 50U para asegurarnos de que estábamos detectando O₂⁻ extracelular. Se tomaron medidas de la absorbancia de las muestras a 550 nm cada 5 minutos durante 4 horas.

4.9. Obtención de los extractos celulares protéicos.

Los extractos celulares se obtuvieron resuspendiendo las células en tampón MLB con inhibidores de proteasas (HEPES 25mM, pH 7,5, NaCl 150mM, Igepal CA-630 1%, glicerol 10%, NaF 25nM, Mg₂Cl 10mM, EDTA 1mm, Na₂VO₄ 1mM, leupeptina 10 µg/ml y aprotinina 10 µg/ml) en hielo durante 15 minutos, lo que permite la rotura y solubilización de las membranas celulares. Estos extractos se centrifugaron durante 15 minutos a 4° C en una centrífuga de mesa (para tubos tipo Eppendorf) a velocidad máxima, separándose el sobrenadante para su uso posterior. En el caso de que dicho uso fuera la medida de la actividad proteína tirosina fosfatasa, se empleó el tampón de lisis RIPA (Tris-HCl 10 mM, NP40 1%, desoxicolato sódico 0,1 %, SDS 0,1%, EDTA 1mM y NaCl 0,2 M), el cual carece en su composición de Na₂VO₄, conocido inhibidor de PTPs. En este caso, las células se incubaron con el tampón RIPA a 4° C durante 30 minutos en agitación, lo que permite la rotura y solubilización de las membranas celulares. Estos extractos se centrifugaron durante 15 minutos en una centrífuga de mesa (para tubos tipo Eppendorf) a velocidad máxima, separándose el sobrenadante para su uso posterior.

Los homogenados plaquetarios se obtuvieron mediante resuspensión de las plaquetas en una disolución hipotónica (HEPES 10mM, EGTA 0,2 mM, KCl 5 mM y glucosa 5,5 mM pH 6,5), manteniéndolas en dicho medio durante 15-20 minutos con el fin de producir su hinchamiento celular, o bien sometiendo las plaquetas a un ciclo de congelación-descongelación. En ambos casos, la suspensión resultante se pasó 30 veces a través de una jeringa con una aguja de 0,7 mm de diámetro.

4.10. Valoración de proteínas.

Las proteínas totales se valoraron según el método de Bradford (Bradford, 1976). El patrón utilizado fue seroalbúmina bovina (BSA) a distintas concentraciones. Para realizar las mediciones de la absorbancia de las muestras se emplearon lectores de placas de ELISA: ELx800 de "BIO-TEK Instruments, Inc" o Multiskan FC de "Thermo Scientific".

4.11. Determinación de la actividad fosfotirosina fosfatásica.

La actividad enzimática se valoró según el método de Smilowitz (Smilowitz et al, 1991), realizándose como se describe a continuación: la mezcla de reacción estaba compuesta por 10 µl de disolución amortiguadora de acetato sódico 100 mM, pH 6,0; 10 µl de Triton X-100 al 0,2% (p/v); 10 µl de O-fosfo-L-tirosina 10 mM y 10 µl de muestra a una concentración aproximada de 2 mg de proteína/ml. La reacción se llevó a cabo por incubación de la mezcla en tubos tipo Eppendorf de 1,5 ml a 37° C durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, las muestras se sumergieron en un baño de hielo, añadiéndose a cada una 120 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 25% (p/v) y 40 µl de seroalbúmina bovina (BSA) 10 mg/ml. Los tubos se centrifugaron a 15.000 x g 5 minutos y a continuación se recogieron 130 µl del sobrenadante donde se midió el fósforo liberado por acción de la enzima.

La valoración del fósforo liberado se realizó por el método de Rouser (Rouser et al, 1970). A los 130 µl de sobrenadante procedentes de la reacción enzimática se le añadieron 770 µl de agua, 150 µl de ácido perclórico al 60%, 100 µl de molibdato amónico al 2,5% (p/v) y 100 µl de ácido ascórbico al 10% (p/v), manteniéndose la mezcla a 100° C durante 5 minutos. La coloración azul desarrollada se midió espectrofotométricamente a 797 nm.

4.12. Análisis de la expresión de proteínas mediante transferencia de Western.

Para estudiar la posible implicación de diferentes PTPs en el proceso de la diferenciación megacariocítica se analizó la expresión diferencial de las mismas mediante transferencia de Western. También se empleó esta técnica para determinar cuáles eran las principales rutas de señalización implicadas en la diferenciación megacariocítica en función de las proteínas que se activaban específicamente en dicho proceso (Tabla III-2).

Tabla III-2. Características de los anticuerpos primarios utilizados para transferencia de Western.

Proteína	Referencia	Reactividad	Tipo	Especie
PTP-Bas	H300	a.a. 1-300	Policlonal	Conejo
PTP-Bas	C20	Carboxi-terminal	Policlonal	Cabra
PTP-Bas	L20	Carboxi-terminal	Policlonal	Cabra
PTP1B	15/PTP1B	a.a. 269-435	Monoclonal	Ratón
SHP1	52/SHP1	a.a. 492-597	Monoclonal	Ratón
SHP2	79/SHP2	a.a. 1-177	Monoclonal	Ratón
P-tirosina	PY20	Fosfotirosinas	Monoclonal	Ratón
β-Tubulina	SAP.4G5	Carboxi-terminal	Monoclonal	Ratón
p-AKT	S473	P-Ser473	Policlonal	Conejo
AKT	H-136	a.a. 345-480	Policlonal	Conejo
p-ERK	E-4	P-Tyr204	Monoclonal	Ratón
ERK-1	K-23	Subdominio XI	Policlonal	Conejo
p-JNK	T183/Y185	P-Thr183/P-Tyr185	Policlonal	Conejo
JNK	FL	a.a. 1-380	Policlonal	Conejo
p-Stat3	Y705	P-Tyr705	Policlonal	Conejo
Stat3	F-2	a.a. 50-240	Monoclonal	Ratón
p-Stat5	Y694	P-Tyr694	Monoclonal	Conejo
Stat5	H-134	a.a. 661-794	Policlonal	Conejo
p22^{phox}	FL-195	a.a. 1-195	Policlonal	Conejo
Epítipo HA	12CA5	YPYDVPDYA	Monoclonal	Ratón

4.12.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).

Los extractos proteicos procedentes de las líneas celulares y los extractos de plaquetas se sometieron a electroforesis desnaturizante en condiciones reductoras, siguiendo el método de Laemmli (Laemmli, 1970). Las muestras se incubaron a 100° C durante 5 minutos en tampón de carga [Tris-ClH 125 mM, que contenía SDS al 2% (p/v), glicerol al 5% (v/v), azul de bromofenol 0,003% (p/v) y β-mercaptoetanol al 1% (v/v) pH 6,8]. En cada carril del gel se depositó una cantidad variable de proteínas dependiendo de la naturaleza del anticuerpo. Las electroforesis se efectuaron en una disolución amortiguadora (tampón de

electroforesis) de Tris-ClH 25 mM, con SDS al 0,4% (p/v), pH 6,8, aplicándose un voltaje constante de 125 V a temperatura ambiente.

4.12.2. Transferencia de las proteínas a la membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF).

Tras la electroforesis se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF como se ha descrito previamente (Hernandez-Hernandez *et al.*, 2006). Para ello se empleó un sistema de transferencia húmedo utilizando una disolución amortiguadora (tampón de transferencia) de Tris-ClH 25 mM, con glicina 190 mM y metanol al 20% (v/v), pH 8,1-8,4. La transferencia se efectuó aplicando un amperaje constante de 400 mA durante 4 horas a 4° C.

4.12.3. Incubación de la membrana con los anticuerpos.

Una vez realizada la transferencia se bloqueó la membrana mediante inmersión de ésta en una disolución de bloqueo que contenía leche desnatada o TOP-BLOCK al 5% (p/v) (se utilizó Top-Block para los Western en los que se pretendía detectar proteínas fosforiladas) en TBS (Tris-ClH 10 mM, ClNa 100 mM y Tween 20 al 0,05% (v/v), pH 7,5), durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación constante. A continuación, se incubó la membrana con el anticuerpo primario convenientemente diluido durante toda la noche a 4° C y con agitación constante (ver Tabla III-3). Después de la incubación con el anticuerpo primario, la membrana se lavó con TBS (tres veces, durante 10 minutos cada vez) y se incubó con una dilución adecuada del correspondiente anticuerpo secundario conjugado a la peroxidasa de rábano durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación constante (Tabla III-3).

4.12.4. Detección.

Tras la incubación de la membrana con los anticuerpos, ésta se lavó de nuevo con TBS (tres veces, durante 10 minutos cada vez) y se sometió al revelado por el sistema de sustrato luminiscente para la peroxidasa de rábano mediante el kit comercial "ECL plus Western Blotting Detection System", siguiendo

las instrucciones de la casa comercial. Cuando la señal del anticuerpo primario era muy fuerte se empleó un sistema de revelado basado en el empleo de la solución de revelado AB (ver 3.3). Las membranas se incubaron durante dos minutos con esta solución de revelado AB. El tiempo de exposición de las películas a las membranas varió en función de la muestra y del anticuerpo primario utilizado. Tras la exposición, la película se reveló en una máquina de revelado para Western “Medical X-ray Processor” de “Kodak”.

Las diluciones de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la detección de las distintas proteínas analizadas en el presente estudio se recogen en la Tabla III-3.

Tabla III-3. Especificaciones para la incubación, bloqueo y revelado para las distintas proteínas analizadas por transferencia de Western.

Proteína	Anticuerpo 1º	Anticuerpo 2º	S. bloqueo	S. revelado
PTP-Bas	(H300) 1:5000	Anti-rabbit 1:10000	Leche	ECL plus
PTP-Bas	(C20) 1:1000	Anti-goat 1:5000	Leche	ECL plus
PTP-Bas	(L20) 1:1000	Anti-goat 1:5000	Leche	ECL plus
PTP1B	1:2000	Anti-mouse 1:5000	Leche	ECL plus
SHP1	1:1000	Anti-mouse 1:5000	Leche	ECL plus
SHP2	1:2500	Anti-mouse 1:5000	Leche	ECL plus
P-tirosina	(PY20) 1:2000	Anti-mouse 1:5000	Top-Block	ECL plus
Tubulina	1:2000	Anti-mouse 1:5000	Leche	Solución AB
p-AKT	(S473) 1:1000	Anti-rabbit 1:3000	Top-Block	ECL plus
AKT	(H-136) 1:3000	Anti-rabbit 1:5000	Leche	Solución AB
p-ERK	(E-4) 1:1000	Anti-mouse 1:5000	Top-Block	ECL plus
ERK	(K-23) 1:5000	Anti-rabbit 1:5000	Leche	Solución AB
p-JNK	(T183/Y185) 1:1000	Anti-rabbit 1:5000	Top-Block	ECL plus
JNK	(FL) 1:2000	Anti-rabbit 1:5000	Leche	Solución AB
p-Stat3	(Y705) 1:1000	Anti-rabbit 1:5000	Top-Block	ECL plus
Stat3	(F-2) 1:1000	Anti-rabbit 1:5000	Leche	Solución AB
p-Stat5	(Y694) 1:1000	Anti-rabbit 1:5000	Top-Block	ECL plus
Stat5	(H-134) 1:2000	Anti-rabbit 1:5000	Leche	Solución AB
p22^{phox}	(FL-195) 1:750	Anti-rabbit 1:5000	Top-Block	ECL plus
Epítopo HA	(12CA5) 1:500	Anti-mouse 1:2000	Leche	ECL plus

En el caso de las membranas hibridadas con anticuerpos frente a las formas fosforiladas de una proteína (p-ERK, p-JNK, p-AKT, p-STAT3 y p-STAT5), después de haber sido reveladas se sometieron a un proceso destinado a eliminar los anticuerpos unidos a las mismas. Esta eliminación se llevó a cabo con el fin de reutilizar esas membranas para determinar los niveles de las proteínas totales correspondientes a las formas fosforiladas de las mismas (ERK, JNK, AKT, STAT3 y STAT5).

Inicialmente, las membranas se lavaron con TBS, con el fin de eliminar los restos de las soluciones de revelado, para después incubarse durante 5 min a 55° C en la solución de arrastre (Tris 62,5 mM pH 6,8, SDS 2% (p/v) y β -mercaptoetanol 100 mM). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las membranas se lavaron abundantemente con TBS. El lavado con TBS permite arrastrar todas las proteínas que quedan unidas débilmente a la membrana tras la incubación con la solución de arrastre en las condiciones anteriormente citadas (anticuerpo 1°, anticuerpo 2° y la proteína de bloqueo). Por lo tanto, tras el lavado con TBS las membranas se bloquearon de nuevo y se hibridaron con los anticuerpos correspondientes a las formas totales de las proteínas.

4.13. Obtención de ARN

El ARN total de las células se obtuvo a partir de muestras celulares tomadas a distintos tiempos de diferenciación. Se empleó el reactivo "TRI reagent" de SIGMA siguiendo las instrucciones de la casa comercial para la extracción: 1×10^7 células se resuspendieron en 1 ml de TRI reagent. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 0,2 ml de cloroformo y se agitaron los tubos durante 15 segundos. Se incubaron de nuevo a temperatura ambiente durante 2-3 minutos y se centrifugaron a $12.000 \times g$ durante 15 minutos a 4° C. Tras la centrifugación la fase acuosa superior se transfirió a un tubo limpio y se añadieron 0,5 ml de isopropanol, incubándose a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se centrifugaron a $12.000 \times g$ durante 10 minutos a 4° C para precipitar el ARN. El ARN se sometió a un lavado con 1 ml de etanol al 75% y se volvió a centrifugar a $7.500 \times g$ durante 5 minutos a 4° C. Se dejó secar el precipitado y se resuspendió en tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 7,5). La concentración de ARN

se calculó midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro GeneQuant pro RNA/DNA Calculator. La integridad del ARN se comprobó corriendo 1 µg de ARN en geles de agarosa.

4.14. RT-PCR semicuantitativa.

4.14.1. Síntesis del ADN copia (ADNc)

Se llevó a cabo a partir del ARN total obtenido tal y como se describe anteriormente. Para trabajar en condiciones semicuantitativas se realizó la reacción con distintas cantidades de ARN (entre 2 y 5 µg). La reacción se llevó a cabo del siguiente modo: el ARN se mezcló con agua ultrapura y 2 µl de oligo-dT en un volumen final de 11 µl. Se incubó a 70° C durante 5 minutos y se enfrió en hielo. A continuación y en orden se añadieron: 4 µl del tampón de reacción comercial de la retrotranscriptasa proporcionado junto con la enzima, 2 µl de dNTPs 10 mM, 0,5 µl del inhibidor de Ribonucleasa (20U) y agua ultrapura hasta 19,8 µl. Se incubó la muestra a 37° C durante 5 minutos, y a continuación se añadieron 0,2 µl (40 U) de la retrotranscriptasa (Revert Aid M-MULV RT). Se dejó transcurrir la reacción durante 1 hora a 37° C y se paró calentando la mezcla a 70° C durante 10 minutos.

4.14.2. Reacción de PCR.

Una vez obtenido el ADNc se realizó la reacción de PCR. Para estar seguros de que trabajábamos en condiciones semicuantitativas, a partir del ADNc (obtenido a partir de distintas cantidades de ARN) se realizó la reacción de PCR con distinto número de ciclos, comprobando que tanto el aumento de la cantidad de ARN como el aumento del número de ciclos reflejaba un aumento de la cantidad de ADN obtenido en la PCR. Se realizó la PCR a partir del mismo ADNc para dos genes: PTP-Bas y β-Actina (empleado como control de carga). La mezcla de PCR, en un volumen final de 50 µl, contenía 5 µl del tampón de reacción comercial de la Taq polimerasa proporcionado junto con la enzima, 1 µl de dNTPs 10 mM, 2 µl de cada oligonucleótido a una concentración de 10 µM, 3 µl de MgCl₂ 25 mM, 1-2 µl de ADNc y 1,25 U de Taq polimerasa. Cada ciclo de la

PCR consistió en un paso de desnaturalización (1 minuto a 95° C), un paso de hibridación (1 minuto a la temperatura adecuada a cada pareja de oligonucleótidos) y un paso de amplificación (1 minuto a 72° C). Se llevó a cabo la reacción entre 16 y 35 ciclos, recogándose muestras a distinto número de ciclos. La secuencia y temperaturas de hibridación de los oligos empleados fueron los siguientes:

➤ **PTP-Bas:**

Oligo sentido: ACATTCTCCCCTTACCAGTTCAAAA.

Oligo antisentido: GGAAATAATAGATGGACTTTCCTGG.

Tª hibridación: 58 °C.

Tamaño del amplicón: 459 pb.

➤ **β-Actina:**

Oligo sentido: GATCTGGCACCCTTCTACAAT.

Oligo antisentido: GCCACATAGCACAGCTTCTCCTTGA.

Tª hibridación: 54 °C.

Tamaño del amplicón: 438 pb.

4.15. Electroforesis en gel de agarosa.

Esta técnica consiste en separar los fragmentos de ADN en función de su tamaño. Para la preparación de los geles se realizó una disolución de agarosa al 1% en TAE (Tris 40 mM, ácido acético glacial 20 mM y EDTA 2 mM). Para disolver la agarosa en el tampón se utilizó un microondas. Una vez disuelta la agarosa, y después de dejarla atemperar, se añadieron 3 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml) por cada 50 ml de gel y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Una vez preparado el gel se le colocó en la posición adecuada en la cubeta y se cargaron en sus pocillos las muestras mezcladas con tampón de carga 10X. La electroforesis se realizó a 100 V cuando se trataba de geles de 50 ml y a 175 V cuando eran de 150 ml, usando el tampón TAE como tampón de electroforesis. Las imágenes de los geles se obtuvieron sobre un transiluminador de luz ultravioleta acoplado a una cámara "Kodak GL 100", y se procesaron mediante el programa "Kodak Digital Science" v 3.0.

4.16. Experimentos de expresión ectópica y de ARN de interferencia.

4.16.1. Transformación, comprobación y amplificación de las construcciones.

4.16.1.1. Transformación.

Se utilizaron bacterias *E. Coli* DH5 α , proporcionadas por los técnicos de nuestro Departamento de Bioquímica y Biología Molecular obtenidas según el protocolo de Inoue *et al.* (Inoue et al, 1990).

Las bacterias competentes se descongelaron en hielo utilizándose una alícuota de 100 μ l para cada transformación. Se añadió la mezcla de ligación o el plásmido circular y se incubó en hielo durante 25 minutos, para después someter a las bacterias al choque térmico durante un minuto a 42 $^{\circ}$ C. Posteriormente, las bacterias se depositaron nuevamente en hielo durante 2 minutos y se pasaron a un tubo estéril con 1 ml de LB, incubándolas una hora a 30 $^{\circ}$ C ó 37 $^{\circ}$ C, dependiendo del tamaño del plásmido, con agitación suave (100 rpm). Generalmente, las bacterias se incuban en este paso a 37 $^{\circ}$ C. Sin embargo, para plásmidos de gran tamaño la incubación de las bacterias a esta temperatura favorece la pérdida del plásmido en este paso. Este proceso se minimiza cuando las bacterias se crecen a 30 $^{\circ}$ C. Tras la incubación las bacterias se transfirieron a un tubo tipo Eppendorf, se centrifugaron a 16.000 x g durante un minuto y se retiró todo el medio excepto unos 200 μ l, en los cuales se resuspendieron las bacterias, antes de plaquearlas en LB + Ampicilina y crecerlas durante toda la noche a 30 $^{\circ}$ C ó 37 $^{\circ}$ C.

4.16.1.2. Comprobación de las construcciones mediante el análisis del patrón de restricción.

Se pusieron 3 ml de LB + ampicilina en tubos estériles y en cada tubo se inoculó la colonia de *E. coli* cuyo ADN se quería extraer. Los tubos se incubaron a 30 $^{\circ}$ C ó 37 $^{\circ}$ C y 200 rpm durante una noche. Se pasaron los cultivos a tubos tipo Eppendorf y se centrifugaron a 16.000 x g durante 2 minutos, para retirar el

medio. Sobre el sedimento bacteriano se añadieron 200 μ l de tampón STET y 50 μ l de lisozima 5 mg/ml. Se resuspendieron los sedimentos por raspado contra la gradilla y se dejaron incubar las bacterias con el STET y la lisozima durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, hervimos las muestras durante un minuto y se dejaron en hielo durante 5 minutos. Centrifugamos durante 5 minutos a 16.000 x g y con un palillo estéril se retiraron los precipitados. A continuación, añadimos 250 μ l de isopropanol a los sobrenadantes, se mezclaron y se mantuvieron en hielo durante 5 minutos. Se centrifugaron durante 15 minutos a 13.000 rpm y se retiraron los sobrenadantes vigilando el precipitado. Después los dejamos secar y los resuspendimos en 50 μ l de TE + 0,3 μ l de RNAasa 20 mg/ml. Después las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37° C para permitir a la RNAasa degradar el ARN que quedaba en la muestra. Transcurrida la incubación, obtuvimos el ADN plasmídico de cada uno de los clones que se crecieron.

Este ADN plasmídico fue comprobado mediante digestión con endonucleasas de restricción y el resultado analizado en un gel de agarosa.

4.16.1.3. Comprobación de las construcciones mediante secuenciación.

Se realizó en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca, donde se emplea un secuenciador automático capilar “3100 Genetic Analyzer” de Applied Biosystems Hitachi. El equipo funciona de forma completamente automática, inyectando las muestras en un capilar, previamente cargado con un polímero, que permite separar fragmentos de ADN de cadena sencilla que se diferencian en una única base. El láser detecta la fluorescencia emitida por cada cadena sencilla de ADN a alturas determinadas, identificando por el color cada tipo de nucleótido: A, C, G o T, traduciendo esta emisión de fluorescencia en la secuencia correspondiente.

Las muestras se prepararon poniendo 600 ng de ADN, 3,2 pmol del oligonucleótido correspondiente y hasta 8 μ l de agua ultrapura.

4.12.1.3. Amplificación de las construcciones.

Una vez comprobamos que los clones que teníamos eran los correctos mediante el análisis del patrón de restricción y mediante secuenciación, los guardamos a -80° C en glicerol al 50% (v/v) con el fin de mantenerlos en stock indefinidamente.

Posteriormente, sacamos del stock de bacterias los clones deseados para crecerlos en placa y obtener una cantidad suficiente de los mismos para poder transfectar las células K562 y HEL. Así, lo que hicimos fue picar una colonia a partir de la estría en placa y ponerla a crecer en 3 ml LB+Amp a 37° C ó 30° C con agitación durante todo el día. Una vez que el cultivo bacteriano comenzó a enturbiarse, los 3 ml del tubo se pasaron a un matraz erlenmeyer con 100 ml de medio TB+Amp donde se crecieron cada uno de los clones durante toda la noche a 37° C ó 30° C con agitación. A la mañana siguiente, los cultivos bacterianos se precipitaron y el ADN plasmídico de cada una de las construcciones se purificó utilizando el sistema HiPure Plasmid MidiPrep de Invitrogen siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido mediante este sistema tenía la calidad suficiente para ser comprobado por secuenciación y se encontraba en cantidad suficiente para transfectar posteriormente las líneas celulares K562 y HEL.

4.16.2. Transfección por electroporación de las células K562 y HEL.

La transfección de las líneas celulares con las distintas construcciones de PTP-Bas se llevó a cabo por electroporación empleando un electroporador Gene Pulser de BioRad. Esta técnica consiste en aplicar externamente a las células un campo eléctrico con el fin de aumentar la conductividad eléctrica y la permeabilidad de la membrana plasmática celular. Así, cuando el voltaje que atraviesa una membrana plasmática excede su rigidez dieléctrica se forman poros. Si la fuerza del campo eléctrico aplicado y/o la duración de la exposición al mismo se eligen apropiadamente, los poros formados por el pulso eléctrico se sellan tras un corto período, durante el cual los compuestos extracelulares (ADN plasmídico) tienen la oportunidad de entrar en la célula.

Para realizar la electroporación se centrifugaron 10^7 células por muestra, se lavaron con medio RPMI 1640 libre de antibióticos, suero y glutamina y se resuspendieron posteriormente en 400 μ l de este mismo medio de cultivo. Los 400 μ l de células se traspasaron entonces a una cubeta de electroporación de 0,4 cm, en la que previamente habíamos depositado 25 μ g del plásmido con el que se iba a transfectar. Se mezclaron las células con el ADN por agitación de la cubeta con el dedo y se colocó ésta en la cámara del electroporador, donde se les dio a las células un pulso durante 10 milisegundos a 300 V, 60 Ohms y 960 μ F. Tras el pulso, se recogieron las células de la cubeta con cuidado de no coger los restos celulares (principalmente restos de membrana y cromatina, que aparecen en el medio como consecuencia de la muerte celular inducida por la electroporación) y se colocaron en una placa de cultivo de 60 mm de diámetro en la cual se habían pipeteado 6 ml de RPMI completo fresco y 4 ml de RPMI completo condicionado, es decir medio de cultivo en el cual habían estado creciendo previamente esas mismas células (esto favorece la recuperación de las células tras el choque eléctrico).

4.16.3. Selección de las células positivas por tratamiento con geneticina (G418).

A las 48 horas de llevarse a cabo la electroporación, las células se lavaron y cambiaron de placa para posteriormente iniciarse la selección de las células positivas (células que se habían transfectado) con G418, ya que tanto los vectores empleados para realizar la expresión ectópica (distintas construcciones del pHM6) como los vectores utilizados para realizar la interferencia (distintas construcciones del pSuper) presentan un gen de resistencia a geneticina. El G418 es un aminoglicósido relacionado con la gentamicina, el cual es frecuentemente empleado como agente seleccionador para células eucariotas. Al ser un análogo del sulfato de neomicina, su mecanismo de acción consiste en interferir la función de la subunidad 80S de los ribosomas y por lo tanto, también interfiere con la síntesis proteica de células eucariotas.

La concentración empleada de este antibiótico fue de 0,25 mg/ml para las K562 y de 0,125 mg/ml para las células HEL. Este proceso de selección se llevó a

cabo durante dos semanas, periodo durante el cual las células se centrifugaron, lavaron y cambiaron de placa cada dos días reañadiéndose G418 al medio.

4.16.4. Construcciones empleadas para la expresión ectópica de PTP-Bas.

Disponemos de tres plásmidos de expresión para PTP-Bas: uno expresa la versión silvestre de PTP-Bas (pHM6-PTP-Bas) y los otros dos codifican para dos versiones mutantes que carecen de actividad PTPásica: en uno de ellos se ha mutado el residuo de cisteína indispensable para la catálisis a serina (pHM6-PTP-BasC/S), mientras que en el otro se han mutado dos residuos importantes para la interacción con el sustrato: tirosina y fenilalanina, por aspártico y alanina (pHM6-PTP-BasYF/DA). Estos dos mutantes carecen de actividad catalítica pero aún son capaces de unirse a los sustratos, por lo que funcionarían como “mutantes atrapadores de sustratos” (Dromard et al, 2007). Estos plásmidos fueron amablemente proporcionados por el Dr. Freiss del IRCM (Institut de Reserche en Cancérologie de Montpellier), Montpellier (Francia).

4.16.5. Experimentos de ARN de interferencia de p22^{phox}.

4.16.5.1. Diseño de las parejas de oligonucleótidos para el silenciamiento.

Se diseñaron cuatro parejas de oligonucleótidos frente a p22^{phox} y una pareja de oligonucleótidos frente a la luciferasa de luciérnaga como control del silenciamiento empleando la ayuda para el diseño de las secuencias de la página Web de Dharmacon RNA Technologies y los criterios de diseño racional de ARNs de interferencia (Reynolds et al, 2004). Estos criterios son los siguientes:

1. Contenido en GC: 30-52%.
2. Al menos 3 A/U en posiciones 15-19.
3. Ausencia de repeticiones internas.
4. A en posición 19.
5. A en posición 3.
6. U en posición 10.
7. No G/C en posición 19.
8. No G en posición 13.

siRNA oligos para silenciar luciferasa. Hemos utilizado la secuencia de 19 nucleótidos descrita por Ohtsuka *et al.* (Ohtsuka et al, 2004):

Oligo sentido Luc:

gatccccCTGACGCGGAATACTTCGAttcaagagaTCGAAGTATTCCGCGTCAGtttttg
gaaa

Oligo antisentido Luc:

agcttttccaaaaaCTGACGCGGAATACTTCGAtctcttgaaTCGAAGTATTCCGCGTCA
Gggg

siRNA oligos para silenciar p22^{phox}.

Oligo sentido O-72:

gatccccCCATGTGGGCCAACGAACAttcaagagaTGTTTCGTTGGCCCACATGGtttttg
gaaa

Oligo antisentido O-73:

agcttttccaaaaaCCATGTGGGCCAACGAACAtctcttgaaTGTTTCGTTGGCCCACATG
Gggg

Oligo sentido O-74: (Kawahara et al, 2005)

gatccccACATGACCGCCGTGGTGAAttcaagagaTTCACCACGGCGGTCATGTtttttg
gaaa

Oligo antisentido O-75: (Kawahara et al, 2005)

agcttttccaaaaaACATGACCGCCGTGGTGAAtctcttgaaTTCACCACGGCGGTCATG
Tggg

Oligo sentido O-76:

gatccccTACTTTGGTGCCTACTCCAttcaagagaTGGAGTAGGCACCAAAGTAtttttg
aaa

Oligo antisentido O-77:

agcttttccaaaaaTACTTTGGTGCCTACTCCAtctcttgaaTGGAGTAGGCACCAAAGTA
ggg

Oligo sentido O-78:

```
gatccccAGATCGGAGGCACCATCAAttcaagagaTTGATGGTGCCTCCGATCTtttttg  
gaaa
```

Oligo antisentido O-79:

```
agcttttccaaaaaAGATCGGAGGCACCATCAAtctcttgaaTTGATGGTGCCTCCGATC  
Tggg
```

4.16.5.2. Clonaje de los siRNAs en el plásmido pSuper/Neo/eGFP.

Los oligonucleótidos diseñados se clonaron en todos los casos en el plásmido comercial pSuper/Neo/eGFP de Oligoengine. Se trata de un plásmido que permite llevar a cabo experimentos de interferencia de ARN mediante transfección celular. Así, los oligonucleótidos clonados en el pSuper quedan bajo el control del promotor H1 de la ARN polimerasa III, llevando a cabo un sistema de interferencia altamente específico y duradero (Figura III-1). Mediante este sistema se consiguen células estables en las cuales el silenciamiento puede llegar a durar hasta dos meses.

El procedimiento por el cual se llevó a cabo el clonaje de los siRNAs en pSuper fue el siguiente:

a) Preparación del pSuper.

La preparación del vector se llevó a cabo por digestión del mismo HindIII/BglII, ya que los oligos al anillarse dejan extremos HindIII/BglII. Se llevaron a cabo digestiones simples primero con HindIII y luego con BglII, tras lo cual se desfosforiló el vector mediante la reacción catalizada por una fosfatasa alcalina (Promega). La desfosforilación es un tratamiento importante ya que dificulta que el vector se pueda religar y por lo tanto favorece la posterior ligación de los oligos en el mismo.

El ADN fue purificado entre la primera reacción de digestión y la siguiente mediante fenolización. Este proceso permite eliminar las proteínas que tenemos con nuestro ADN y permite parar la reacción por desnaturalización de los enzimas para disponer del ADN purificado. A nuestras muestras se les añadió el mismo volumen de F/C/I que el

existente en la muestra. Se agitaron en el vortex y se centrifugaron durante 2 minutos a 16.000 x g. Recuperamos la fase acuosa y repetimos la extracción pero centrifugando 5 minutos. Volvimos a recuperar la fase acuosa y le añadimos 2,5 volúmenes de etanol 100%, 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 3 μ l de glucógeno 20 mg/ml para poder visualizar posteriormente el precipitado. Lo mezclamos bien y lo depositamos a -20° C entre 30 minutos y 24 horas. Tras ese tiempo centrifugamos la muestra durante 15 minutos a 4° C y 16.000 x g. Nos quedamos con el precipitado al que le añadimos 200 μ l de etanol 75% y volvimos a centrifugar 10 minutos. Retiramos el sobrenadante y dejamos secar el precipitado antes de resuspenderlo en agua ultrapura, para su posterior utilización en otras reacciones.

Finalmente el vector pSuper HindIII/BglIII desfosforilado se corrió en un gel de agarosa de bajo punto de fusión donde fue purificado empleando el kit comercial "DNA Extraction kit" de Fermentas siguiendo las instrucciones que marca el fabricante. Mediante esta purificación eliminamos el fragmento de ADN entre HindIII y BglIII, así como también cualquier resto del plásmido sin digerir, lo cual contribuye a disminuir el fondo en la ligación y la transformación.

b) Preparación de los oligos.

La preparación de los oligos se llevó a cabo en varios pasos:

- El primer paso consistió en el anillamiento de los cebadores, que se resuspendieron inicialmente en agua estéril libre de nucleasas a una concentración de 3 mg/ml. En un tubo tipo Eppendorf se pipeteó 1 μ l del oligo sentido y 1 μ l del oligo antisentido y se añadieron 48 μ l del tampón de anillamiento. El anillamiento de la pareja de oligos se llevó a cabo por calentamiento de la mezcla a 95° C durante 4 minutos en un recipiente hermético, de tal manera que al apagar la placa eléctrica que generaba el calor se produjo un enfriamiento lento y progresivo de la mezcla de oligonucleótidos durante toda una mañana. Transcurrido ese tiempo y cuando la muestra se encontraba a 37° C se sacó del recipiente hermético y se incubó a temperatura ambiente 5 minutos y después en hielo otros 5 minutos.
- El segundo paso consistió en la fosforilación de los oligos mediante el sistema de la T4 polinucleótido quinasa (Takara). Se cogieron 2 μ l de los oligos anillados y se pusieron en un tubo tipo Eppendorf junto a 1 μ l del tampón T4 polinucleótido

quinasa, 1 μ l de ATP 10 mM, 1 μ l de T4 polinucleótido quinasa (10 U) y 5 μ l de agua estéril libre de nucleasas. La mezcla resultante se incubó a 37° C durante 30 minutos, y luego a 70° C 10 minutos con el fin de inactivar la enzima. Finalmente la mezcla se puso 5 minutos en hielo.

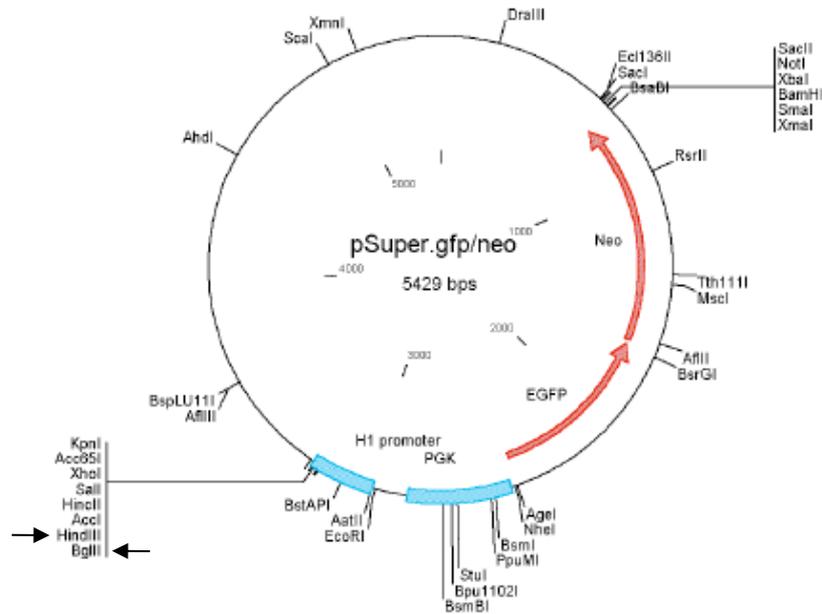


Fig. III-1. Estructura del vector pSuper.GFP/Neo.

c) Ligación en pSuper.

Para llevar a cabo la ligación de los oligonucleótidos en pSuper se tomaron 2 μ l de los oligos anillados y fosforilados y se pusieron en un tubo Eppendorf junto con 1 μ l del tampón de la ligasa, 1 μ l del pSuper preparado (digerido con HindIII y BglII y desfosforilado), un 1 μ l de T4 DNA ligasa (Promega) y 5 μ l de agua estéril libre de nucleasas. La mezcla de ligación resultante se incubó a 16° C durante toda la noche, tras lo cual se transformó en *E. coli* DH5 α tal y como se describe en el apartado 4.12.1.1. de esta sección de material y métodos.

d) Comprobación de los clones.

Se aisló el ADN plasmídico de los clones bacterianos mediante tratamiento con lisozima tal y como se describe en el apartado 4.12.1.2. de esta sección de Material y Métodos. La comprobación del ADN plasmídico

se realizó posteriormente mediante digestión doble del mismo con HindIII y BglII, de tal forma que los clones positivos tenían un tamaño de inserto de 300 pb frente al vector vacío que liberaba con esta digestión un fragmento de tan sólo 240 pb. Para poder discriminar ambas bandas en un gel de agarosa, éste se preparó a una concentración de agarosa de 1,5% (p/v) (lo cual favorece la separación de las bandas de menor tamaño en una muestra). Además, los clones positivos se volvieron a crecer para obtener ADN de suficiente calidad mediante el empleo del kit Plasmid Miniprep de Invitrogen para posteriormente secuenciar y así comprobar exactamente que el plásmido obtenido presentaba la secuencia de los oligonucleótidos del siRNA sin ningún tipo de modificación.

4.16.5.3. Silenciamiento de p22^{phox} en las líneas celulares K562 y HEL.

El silenciamiento de p22^{phox} en las líneas celulares K562 y HEL se llevó a cabo mediante transfección de las mismas con las distintas construcciones del pSuper (pSuper 72/73, 74/75, 76/77 y 78/79), igualmente se transfectó a las células control con el plásmido pSuper Luc, diseñado para el silenciamiento de la luciferasa de luciérnaga. La transfección en todos los casos se realizó por electroporación tal y como se describe en el apartado 4.16.2. de esta sección de Material y Métodos. La capacidad de silenciamiento de las distintas secuencias empleadas se analizó por transferencia de Western.

Para comprobar el efecto del silenciamiento de p22^{phox} sobre la diferenciación megacariocítica de células K562 y HEL, se trató a las células resultantes de la selección con G418 con PMA 20 nM durante 48 horas.

4.16.5.4. Silenciamiento de p22^{phox} en las células primarias UCB-CD34⁺.

El silenciamiento de p22^{phox} en las células humanas UCB-CD34⁺ se llevó a cabo tal y como se ha descrito anteriormente (Carcamo-Orive et al, 2008). Concretamente, lo que se hizo fue escindir el cassette de expresión H1-shRNA de las distintas construcciones del pSuper p22^{phox} (Figura III-1) y clonarlo en el vector de expresión de lentivirus pLVTHM usando sitios de corte EcoRI–ClaI (Figura III-2). Este vector lentiviral además presenta en su estructura la secuencia del gen que codifica GFP, la cual resulta

de gran utilidad para la posterior identificación de las células en las que se está llevando a cabo la interferencia.

Las partículas virales se produjeron en células humanas de riñón embrionario 293T (HEK 293T) crecidas en DMEM con alta concentración de glucosa y FBS al 10%. Los plásmidos empaquetadores pREV, phCMV-GALV-TR y el vector lentiviral pLVTHM se transfectaron en estas células HEK 293T mediante fosfato cálcico en presencia de cloroquina 25 μ M (este compuesto incrementa la eficiencia de la transfección).

Las células UCB-CD34⁺ se plaquearon en placas de 12 pocillos en el medio de cultivo Stem Cell Growth Medium suplementado con TPO 100ng/ml. Estas placas estaban recubiertas de retronectina (5 μ g/cm²) y habían sido previamente precargadas con los vectores de lentivirus pseudotipados GALV-TR. La multiplicidad media de la infección (MOI), determinada mediante el empleo de células HT1, fue de aproximadamente 10 partículas infecciosas/célula diana. Después de 24 horas las células fueron transferidas a un nuevo pocillo con medio fresco con TPO. La eficiencia de la infección se comprobó mediante citometría de flujo valorando la expresión de la GFP. Los análisis de diferenciación se realizaron a los 7 días de iniciarse el tratamiento con TPO utilizándose las células infectadas con el shRNA de la luciferasa como control de la diferenciación.

Estos experimentos se llevaron a cabo en colaboración con el laboratorio del Dr. César Trigueros (Fundación Inbiomed, Fundación para la Investigación de Células Madre, San Sebastián)

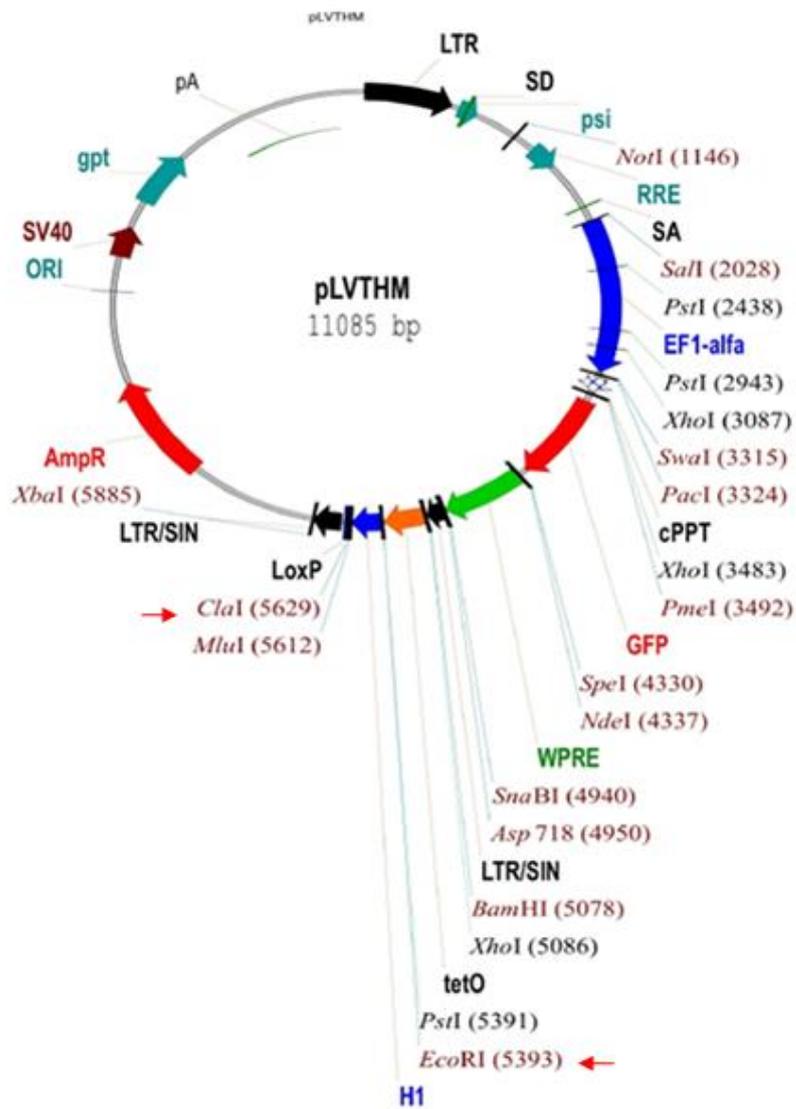


Fig. III-2. Estructura del vector lentiviral pLVTHM.

4.17. Análisis estadístico.

Los datos son expresados como la media \pm desviación estándar. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo empleando la prueba Student's *t*-test. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

CAPÍTULO IV: Resultados y Discusión

1. ESTUDIO DEL PAPEL DE LOS ROS EN LA DIFERENCIACIÓN MEGACARIOCÍTICA.

Recientemente, los ROS han despertado un gran interés dentro de la comunidad científica al descubrirse que son un importante mecanismo de regulación de la señalización celular. Por consiguiente, el papel de los ROS como segundos mensajeros (en inglés “redox signalling”), se ha convertido en un tema recurrente en el campo de la señalización en los últimos años. Sin embargo, son muy escasos los trabajos que relacionen los ROS con procesos biológicos relevantes, tales como la diferenciación celular (Yamamoto et al, 2009). De aquí, la importancia del estudio que nosotros hemos realizado que pone de manifiesto por primera vez que la producción de ROS por una NADPH oxidasa dependiente de $p22^{\text{phox}}$ es necesaria para la activación total de las vías de señalización implicadas en la diferenciación megacariocítica.

1.1. La producción de ROS es necesaria para la diferenciación megacariocítica de las líneas celulares eritroleucémicas K562 y HEL.

Se ha descrito previamente la producción de ROS en respuesta a ésteres de forbol en diferentes sistemas (Traore, 2007), incluyendo células K562 que sobreexpresaban la NADPH oxidasa (de, I y Leto, 1995). Sin embargo, no se ha descrito esta producción de ROS en respuesta a estos compuestos en células HEL.

En función de estos antecedentes decidimos analizar la producción de ROS por citometría de flujo tanto en células K562 como en células HEL tratadas con PMA 20 nM. Se pudo observar un rápido y significativo incremento de los niveles de ROS en células K562, con un máximo alrededor de los 60 minutos de inducción con PMA (Figura IV-1A). A tiempos más largos de incubación con el agente diferenciador (PMA), los niveles de ROS volvieron a los niveles basales (Figura IV-1B). Cuando las células K562 fueron pretratadas con el antioxidante Quercetina a una concentración 100 μM , los niveles de ROS fueron significativamente menores que en las células control sin el antioxidante (Figuras IV-1A y IV-1B).

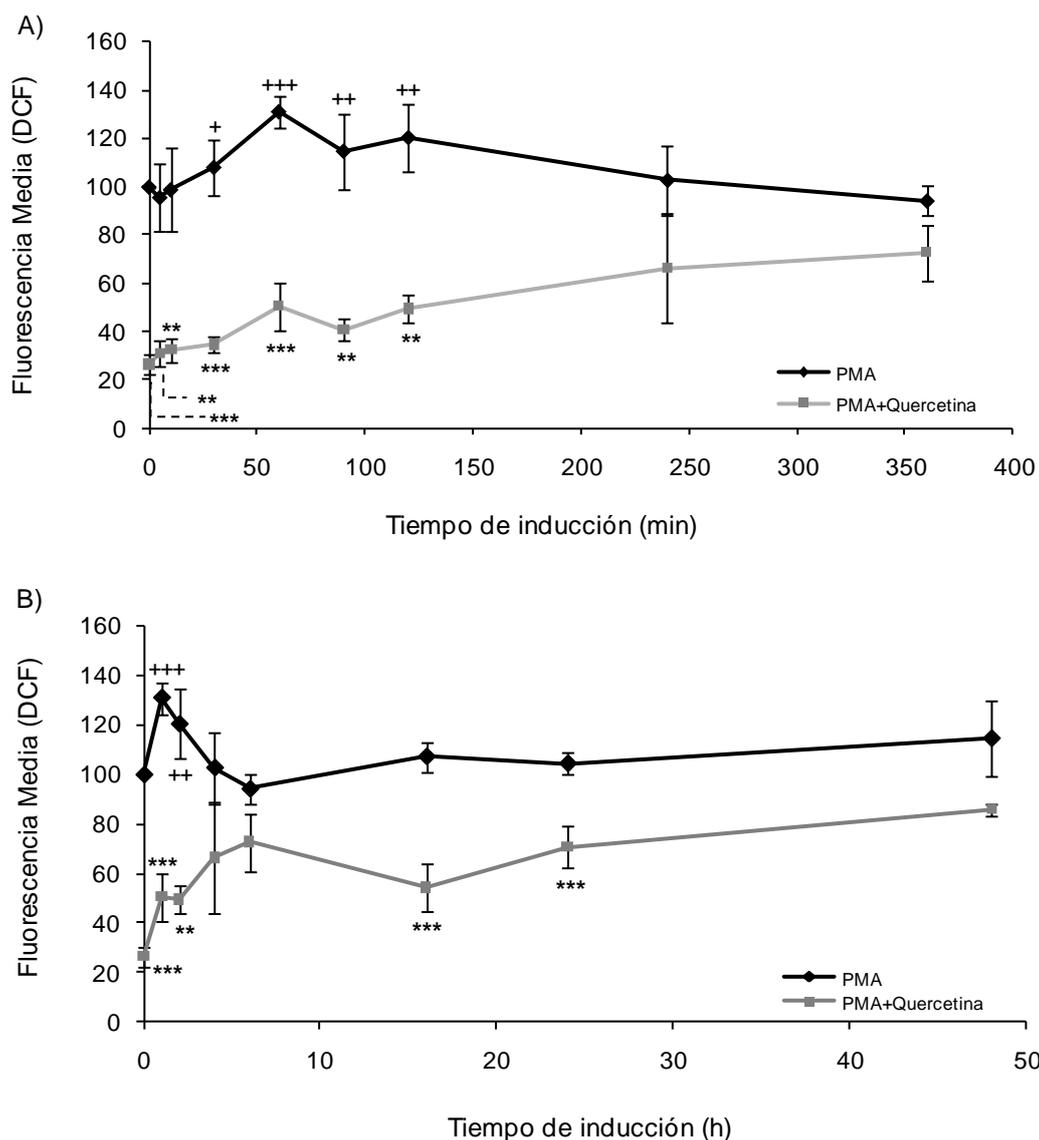


Fig. IV-1. Análisis de la producción de ROS en respuesta a PMA en presencia o ausencia de Quercetina en células K562. Se estimularon las células K562 con PMA 20 nM y se analizaron los niveles intracelulares de ROS por citometría de flujo en células marcadas con la sonda fluorescente DCFDA en ausencia o presencia de Quercetina a distintos tiempos. (A) tiempos cortos de inducción con PMA; (B) tiempos largos de inducción con PMA. Los resultados son la media aritmética \pm la desviación estándar de 4 experimentos diferentes. +++ $p < 0,001$; ++ $p < 0,01$; + $p < 0,05$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con PMA y las células no tratadas. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con PMA+Quercetina y las células tratadas sólo con PMA.

En el caso de las células HEL también se pudo observar un incremento rápido y sostenido de los niveles de ROS intracelulares. En estas células la inducción es todavía más rápida que en las células K562, ya que aparece un primer pico de ROS a los 30 minutos de inducción con PMA (Figura IV-2A). A tiempos largos se puede observar un progresivo incremento de los niveles de ROS, de tal modo que a partir de las 24 horas se observan de nuevo diferencias significativas con respecto a las células no tratadas. Por lo tanto, parece que el

PMA es capaz de inducir la producción de ROS en dos oleadas consecutivas en células HEL. Cuando las células HEL fueron pretratadas con el antioxidante Quercetina a una concentración 100 μ M, los niveles de ROS fueron significativamente menores que en las células control sin el antioxidante (Figuras IV-2A y IV-2B).

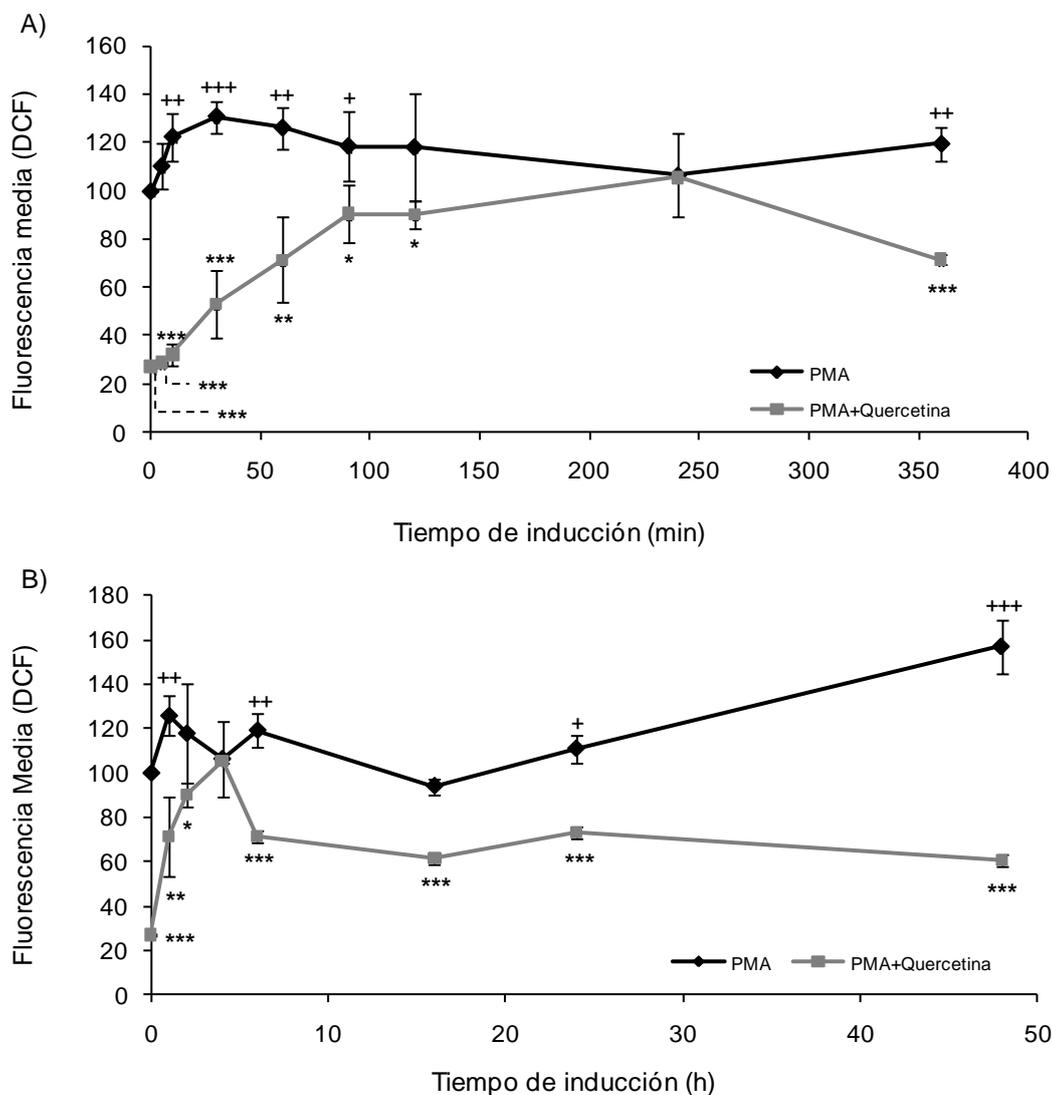


Fig. IV-2. Análisis de la producción de ROS en respuesta a PMA en presencia o ausencia de Quercetina en células HEL. Se estimularon las células HEL con PMA 20 nM y se analizaron los niveles intracelulares de ROS por citometría de flujo en células marcadas con la sonda fluorescente DCFDA en ausencia o presencia de Quercetina a distintos tiempos. (A) tiempos cortos de inducción con PMA, (B) tiempos largos de inducción con PMA. Los resultados son la media aritmética \pm la desviación estándar de 4 experimentos diferentes. +++ $p < 0,001$; ++ $p < 0,01$; + $p < 0,05$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con PMA y las células no tratadas. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con PMA+Quercetina y las células tratadas sólo con PMA.

Además de la Quercetina se pudo observar que otros antioxidantes (N-acetilcisteína y Trolox) eran capaces de reducir los niveles intracelulares de ROS en ambas líneas celulares (Figura IV-3).

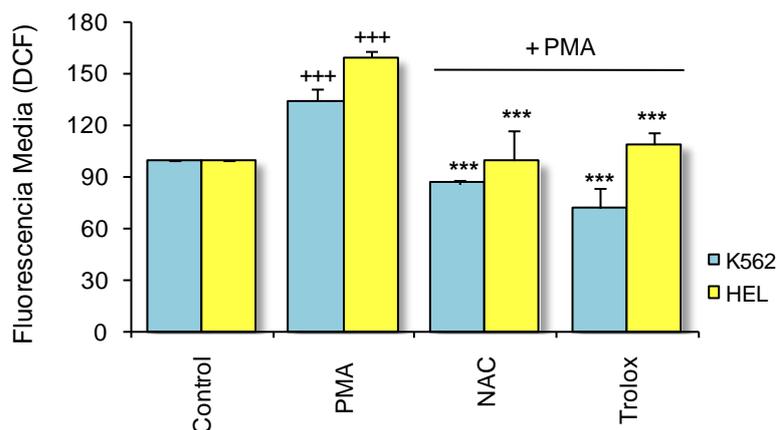


Fig IV-3. Análisis de la producción de ROS en respuesta a PMA en presencia o ausencia de otros antioxidantes en células K562 y HEL. Se midió la producción intracelular de ROS en células K562 y HEL marcadas con DCFDA en respuesta a la inducción durante 1 hora con PMA 20 nM en presencia o ausencia de NAC 100 μ M o Trolox 10 μ M. Los niveles intracelulares de ROS en respuesta a PMA o a PMA+antioxidante fueron normalizados frente a los niveles observados en células no tratadas o bien a los de células tratadas sólo con el antioxidante respectivamente. Los resultados son la media aritmética \pm la desviación estándar de 4 experimentos diferentes. +++ $p < 0,001$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con PMA y las células no tratadas. *** $p < 0,001$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con PMA+NAC ó PMA+Trolox y las células tratadas sólo con PMA.

Para poder determinar si los ROS son importantes en la diferenciación megacariocítica, se llevaron a cabo experimentos de diferenciación en presencia y ausencia de diferentes antioxidantes (N-acetilcisteína, Trolox y Quercetina). La diferenciación megacariocítica se evaluó en función de los niveles de expresión en la superficie de las células K562 y HEL de tres marcadores megacariocíticos (CD42b, CD41 y CD61), cuyos niveles de expresión aumentan a medida que transcurre la diferenciación megacariocítica, y del marcador eritrocítico GpA, cuyos niveles disminuyen a medida que avanza la diferenciación megacariocítica.

En células K562 se observó un fuerte efecto del tratamiento con Quercetina sobre la diferenciación megacariocítica (Tabla IV-1 y Figura IV-4), ya que el tratamiento con este antioxidante fue capaz de reducir los niveles de los marcadores megacariocíticos CD41 y CD61 y de atenuar la disminución en los niveles de GpA inducida por el PMA. El tratamiento con los otros dos antioxidantes, NAC y Trolox, únicamente produjo diferencias significativas sobre alguno de los marcadores de diferenciación (Tabla IV-1). Así, por ejemplo, en presencia de NAC los niveles de GpA observados fueron significativamente superiores a los observados en células diferenciadas únicamente en presencia de PMA, mientras que el tratamiento de las células con Trolox produjo una disminución en los niveles de CD61 y unos niveles de GpA significativamente superiores a los observados en su ausencia.

Tabla IV-3. Análisis del efecto de los antioxidantes sobre la expresión de marcadores de diferenciación en células K562.

TRATAMIENTO	CD42b	CD41	CD61	GpA
PMA	1,61±0,13 ⁺⁺⁺	2,16±0,18 ⁺⁺⁺	54,74±10,17 ⁺⁺	0,57±0,07 ⁺⁺⁺
NAC+PMA	1,53±0,18	2,07±0,36	53,05±16,86	0,76±0,09 ^{**}
Quercetina+PMA	1,51±0,11	1,18±0,29 ^{**}	2,72±0,90 ^{***}	1,12±0,18 ^{***}
Trolox+PMA	1,52±0,33	2,10±0,76	21,6±11,18 ^{**}	0,87±0,1 ^{**}

Las células K562 fueron tratadas con PMA 20 nM durante 48 horas en presencia o ausencia de NAC 100 μ M, Quercetina 100 μ M o Trolox 10 μ M. Los resultados muestran el número de veces de inducción en la expresión de los marcadores megacariocíticos (CD42b, CD41 y CD61) y el marcador eritrocítico (GpA) con respecto a las células control. Para las células diferenciadas con PMA se utilizaron como células control, células tratadas con el vehículo (DMSO) diluido 10^5 veces. En el caso de las células tratadas con PMA+antioxidantes se utilizaron como células control, células tratadas con DMSO+antioxidante. Los resultados son la media aritmética \pm la desviación estándar de 4 experimentos diferentes. ⁺⁺⁺ $p < 0,001$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con PMA y las células tratadas con DMSO. ^{***} $p < 0,001$; ^{**} $p < 0,01$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con PMA+NAC, PMA+Quercetina ó PMA+Trolox y las células tratadas sólo con PMA.

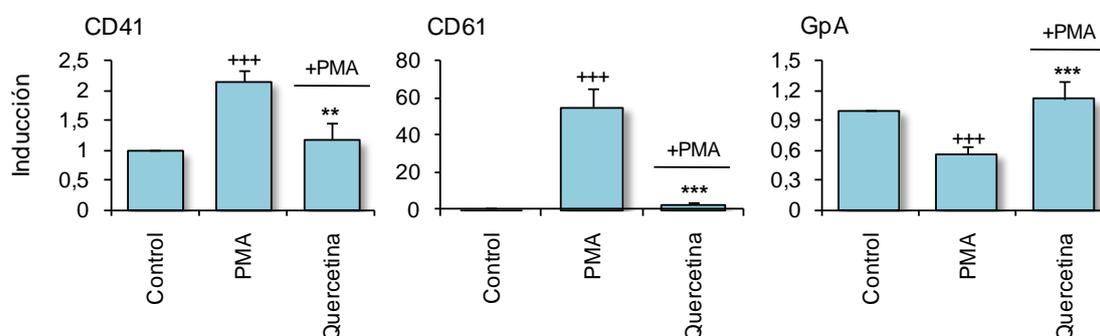


Fig IV-4. Análisis del efecto de la Quercetina sobre la expresión de marcadores de diferenciación en células K562. Las células K562 fueron tratadas con PMA 20 nM durante 48 horas en presencia o ausencia de Quercetina 100 μ M. Los histogramas muestran el número de veces de inducción en la expresión de los marcadores megacariocíticos (CD41 y CD61) y el marcador eritrocítico (GpA) con respecto a las células control. Para las células diferenciadas con PMA, se utilizaron como células control células tratadas con el vehículo (DMSO) diluido 10^5 veces. En el caso de las células tratadas con PMA+Quercetina, se utilizaron como células control células tratadas con DMSO+Quercetina. Los resultados son la media aritmética \pm la desviación estándar de 4 experimentos diferentes. ⁺⁺⁺ $p < 0,001$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con PMA y las células tratadas con DMSO. ^{***} $p < 0,001$; ^{**} $p < 0,01$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con PMA+Quercetina y las células tratadas sólo con PMA.

En células HEL también observamos el efecto del tratamiento con Quercetina sobre la diferenciación megacariocítica (Tabla IV-2 y Figura IV-5). Así, el tratamiento con este antioxidante fue capaz de reducir significativamente los niveles de los marcadores megacariocíticos CD41 y CD61 y de atenuar la disminución de los niveles GpA inducida por el PMA. También se observó un efecto parcial del tratamiento con NAC y Trolox (Tabla IV-2). El efecto de la NAC, consistió en la disminución de los niveles de los marcadores megacariocíticos

CD42b y CD61, mientras que el tratamiento con Trolox produjo una disminución de CD61 y un incremento de GpA.

Tabla IV-2. Análisis del efecto de los antioxidantes sobre la expresión de marcadores de diferenciación en células HEL.

TRATAMIENTO	CD42b	CD41	CD61	GpA
PMA	1,63±0,15 ⁺⁺⁺	1,62±0,01 ⁺⁺⁺	3,79±0,73 ⁺⁺⁺	0,34±0,04 ⁺⁺⁺
NAC+PMA	1,24±0,1 ^{**}	2,08±0,48	0,95±0,24 ⁺⁺⁺	0,60±0,38
Quercetina+PMA	1,54±0,54	1,33±0,17 [*]	0,96±0,25 ⁺⁺⁺	0,78±0,07 ⁺⁺⁺
Trolox+PMA	1,35±0,08 [*]	1,57±0,12	1,25±0,14 ^{**}	0,58±0,01 ⁺⁺⁺

Las células HEL fueron tratadas con PMA 20 nM durante 48 horas en presencia o ausencia de NAC 100 μ M, Quercetina 100 μ M o Trolox 10 μ M. Los resultados muestran el número de veces de inducción en la expresión de los marcadores megacariocíticos (CD42b, CD41 y CD61) y el marcador eritrocítico (GpA) con respecto a las células control. Para las células diferenciadas con PMA, se utilizaron como células control células tratadas con el vehículo (DMSO) diluido 10^5 veces. En el caso de las células tratadas con PMA+antioxidantes, se utilizaron como células control células tratadas con DMSO+antioxidante. Los resultados son la media aritmética \pm la desviación estándar de 4 experimentos diferentes. ⁺⁺⁺ $p < 0,001$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con PMA y las células tratadas con DMSO. ⁺⁺⁺ $p < 0,001$; ^{**} $p < 0,01$; ^{*} $p < 0,05$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con PMA+NAC, PMA+Quercetina ó PMA+Trolox y las células tratadas sólo con PMA.

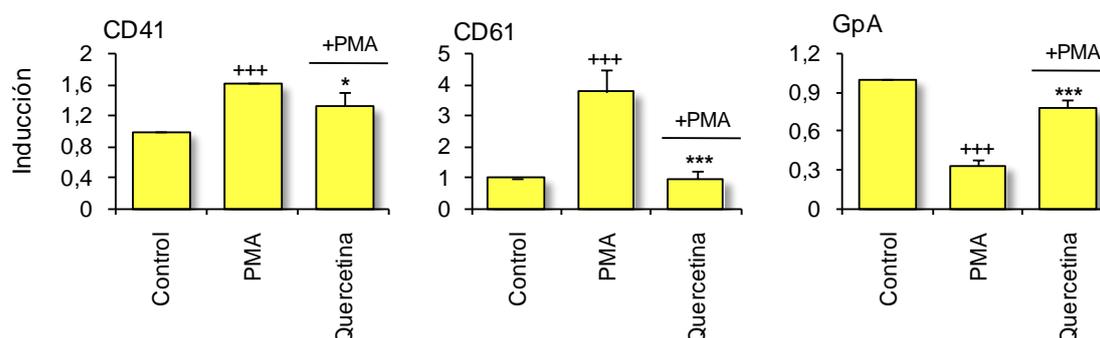


Fig IV-5. Análisis del efecto de la Quercetina sobre la expresión de marcadores de diferenciación en células HEL. Las células HEL fueron tratadas con PMA 20 nM durante 48 horas en presencia o ausencia de Quercetina 100 μ M. Los histogramas muestran el número de veces de inducción en la expresión de los marcadores megacariocíticos (CD41 y CD61) y el marcador eritrocítico (GpA) con respecto a las células control. Para las células diferenciadas con PMA, se utilizaron como células control células tratadas con el vehículo (DMSO) diluido 10^5 veces. En el caso de las células tratadas con PMA+Quercetina, se utilizaron como células control células tratadas con DMSO+Quercetina. Los resultados son la media aritmética \pm la desviación estándar de 4 experimentos diferentes. ⁺⁺⁺ $p < 0,001$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con PMA y las células tratadas con DMSO. ⁺⁺⁺ $p < 0,001$; ^{**} $p < 0,01$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con PMA+Quercetina y las células tratadas sólo con PMA.

Por lo tanto, estos resultados demuestran que el tratamiento con los distintos antioxidantes dificulta el proceso de diferenciación megacariocítica de células K562 y HEL inducido por PMA, resultando este efecto especialmente evidente para el tratamiento de estas células con Quercetina.

Otra manera de evaluar si los ROS son importantes en la diferenciación megacariocítica, consiste en analizar los cambios que tienen lugar en la morfología de estas células a lo largo del proceso de diferenciación y comparar estos cambios con los que tienen lugar en presencia de antioxidantes (NAC, Trolox y Quercetina). Después del tratamiento con PMA, ambas líneas celulares mostraron características morfológicas similares a las de los megacariocitos: se observaron células de mayor tamaño que las células indiferenciadas, las cuales además poseían un núcleo polilobulado o polisegmentado y un citoplasma basófilo (Figura IV-6A y IV-6B). Cuando la diferenciación megacariocítica de las células K562 y HEL se llevó a cabo en presencia de los distintos antioxidantes se observó que se producía una inhibición en la adquisición de estas características morfológicas. De este modo, las células diferenciadas en presencia de los antioxidantes presentaban una morfología muy similar a la de las células indiferenciadas (Figura IV-6A y IV-6B).

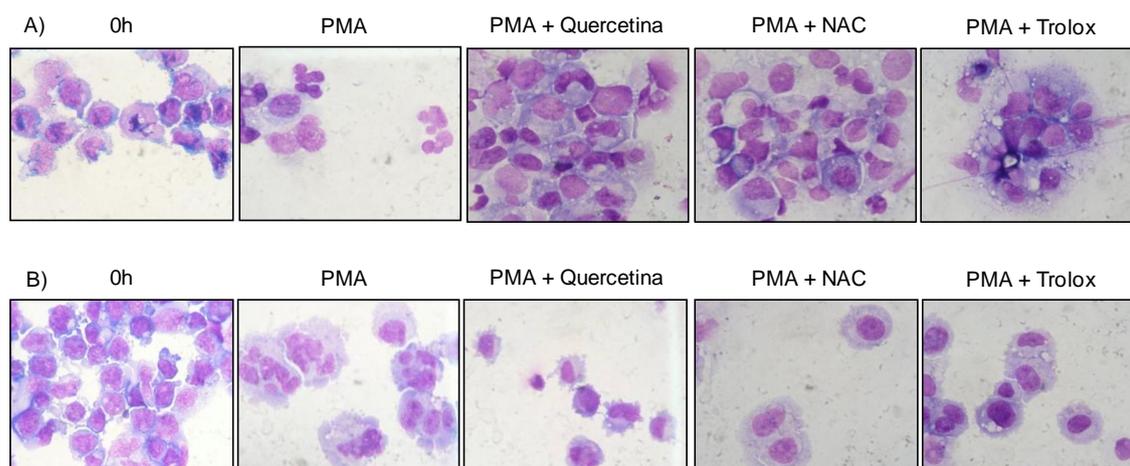


Fig. IV-6. Análisis de los cambios morfológicos durante la diferenciación megacariocítica de células K562 y HEL en presencia o ausencia de diferentes antioxidantes. Las células K562 (A) y HEL (B) se diferenciaron durante 96 h por tratamiento con PMA 20 nM en presencia o ausencia de Quercetina 100 μ M, NAC 100 μ M o Trolox 10 μ M y se tiñeron por el método de May-Grünwald-Giemsa.

Para determinar si el efecto observado de los ROS sobre la diferenciación es específico, y no se trata de un efecto indirecto sobre la viabilidad o la proliferación celular, analizamos ambos parámetros en presencia o ausencia de los diferentes antioxidantes empleados en el presente estudio. No se pudieron encontrar diferencias significativas entre las células tratadas sólo con PMA y las células tratadas con PMA+antioxidantes ni sobre la viabilidad celular (Figura IV-

7A), ni tampoco sobre la proliferación celular (Figura IV-7B) tanto para células K562 como para células HEL.

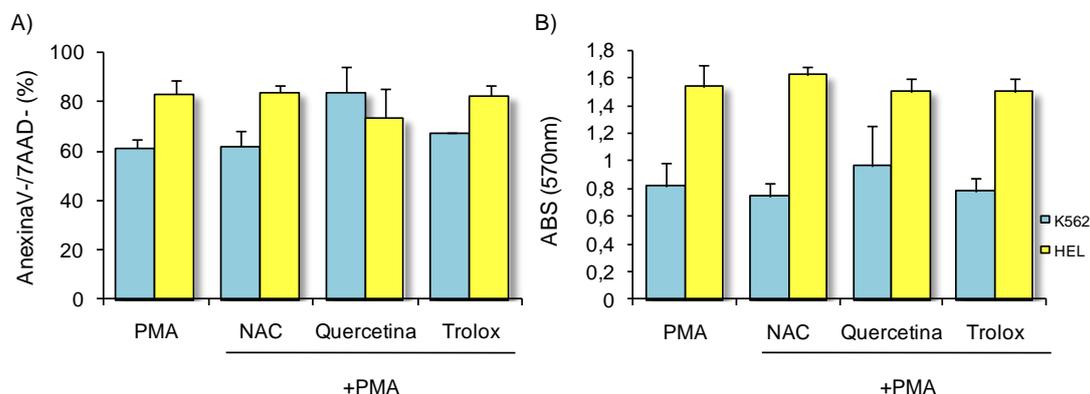


Fig. IV-7. Análisis del efecto del tratamiento con los diferentes antioxidantes sobre la viabilidad y la proliferación celular. Las células K562 y HEL fueron tratadas con PMA 20 nM durante 48 horas en presencia o ausencia de NAC 100 μ M, Quercetina 100 μ M o Trolox 10 μ M. (A) La viabilidad celular se analizó mediante el marcado de las células con AnexinaV/7AAD-. Los resultados son la media aritmética \pm la desviación estándar del porcentaje de células viables (AnexinaV-7AAD-) de 3 experimentos diferentes. (B) La proliferación celular se analizó mediante el ensayo del MTT. Los resultados son la media aritmética \pm la desviación estándar de 3 experimentos diferentes.

Los tres antioxidantes empleados en el presente estudio presentan diferencias en su mecanismo de acción. Los antioxidantes que contienen grupos tiol, como es el caso de la NAC, actúan como antioxidantes intracelulares eliminando radicales libres. Además, la NAC es un precursor del glutatión, el principal sistema de defensa celular frente al daño producido por el estrés oxidativo (Huber y Parzefall, 2007). La actividad antioxidante de los flavonoides, dentro de los cuales se incluye la Quercetina, se relaciona principalmente con tres procesos: i) incremento en los niveles de GSH intracelular, ii) bloqueo del flujo de Ca^{+2} y iii) eliminación de radicales libres, especies reactivas y quelación de metales de transición (Gitika et al, 2006). Por último, el Trolox es un análogo hidrofílico del tocoferol (vitamina E), el cual es un antioxidante secundario o "Chain-Breaking Antioxidant" que actúa rompiendo las reacciones en cadena de oxidación debido a su reactividad frente a radicales peroxilo (van Acker et al, 1993).

Por lo tanto, los antioxidantes que hemos utilizado, a pesar de tener diferentes mecanismos de acción, son capaces de disminuir significativamente los niveles de ROS y de dificultar la diferenciación megacariocítica, sin afectar a la viabilidad o a la proliferación celular en nuestras condiciones experimentales.

Sería muy poco probable que tres antioxidantes con tres mecanismos de acción diferentes llevaran a cabo un efecto sobre la diferenciación megacariocítica que fuera independiente de su función antioxidante. Por lo tanto, podemos afirmar que el incremento de ROS que hemos observado es necesario para la diferenciación megacariocítica de las líneas celulares K562 y HEL.

Con el fin de determinar la importancia del estallido inicial de ROS inducido por el PMA sobre la diferenciación megacariocítica, realizamos experimentos de diferenciación en ambas líneas celulares, en los cuales retiramos el PMA del medio de cultivo después de una corta inducción (2, 4 ó 6 horas). Así, el PMA se retiró del medio de cultivo tras una inducción inicial y las células se mantuvieron en cultivo sin PMA hasta 48 horas. Los resultados mostraron que incluso con tan sólo 2 horas de estimulación con PMA se producen incrementos significativos en los niveles de los marcadores megacariocíticos (CD41 y CD61) y una disminución significativa en los niveles del marcador eritrocítico GpA en ambas líneas celulares (Figura IV-7A/IV-7B). Además, los niveles de estos marcadores fueron muy similares a los alcanzados cuando las células se mantenían durante las 48 horas en presencia de PMA. Además, cuando llevamos a cabo los experimentos de detección de los niveles intracelulares de ROS, observamos que se producía un pico en ambas líneas celulares en torno una hora después del tratamiento con PMA (Figuras IV-1A y IV-1B). Este resultado sugiere que el estallido inicial de ROS es fundamental para la diferenciación, de modo que una vez que se ha producido, las células K562 y HEL se verían comprometidas hacia la diferenciación megacariocítica.

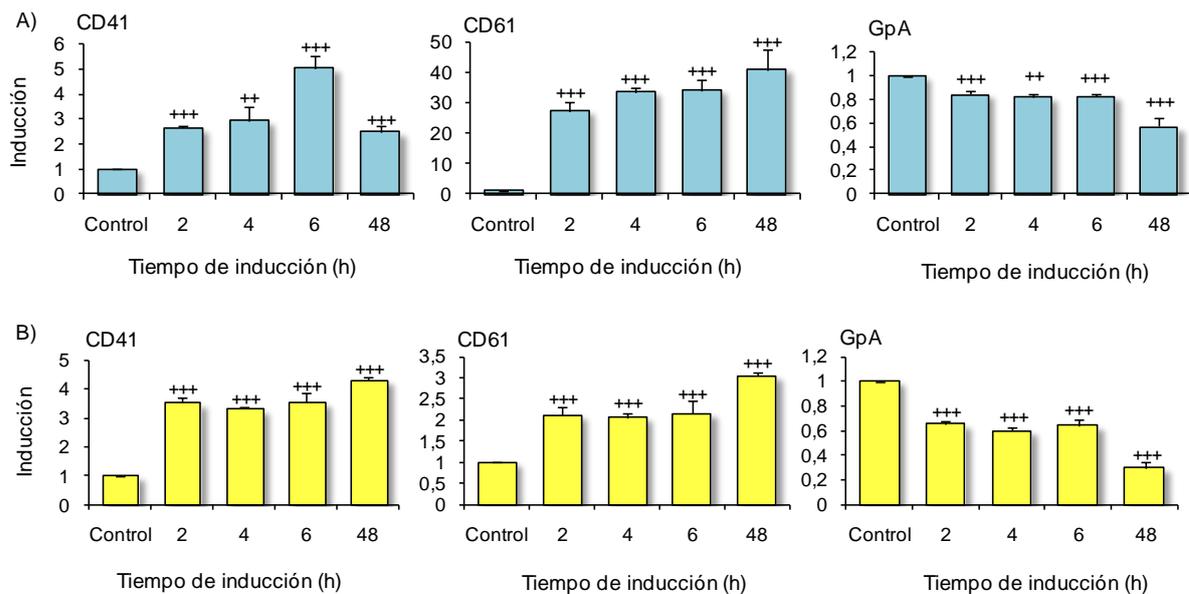


Fig. IV-7. El estallido de ROS es importante para la diferenciación megacariocítica de células K562 y HEL. Las células K562 y HEL se estimularon con PMA 20 nM, el cual se retiró del medio a las 2, 4 o 6 horas después del estímulo inicial o bien se mantuvo durante todo el tiempo de la diferenciación (48 horas). La diferenciación se analizó a las 48 horas de producirse la inducción inicial con PMA en todos los casos. En los histogramas se muestra la media del número de veces de inducción para cada uno de los marcadores \pm la desviación estándar de tres experimentos diferentes para K562 (A) y HEL (B). +++ $p < 0.001$, ++ $p < 0.01$, + $p < 0.05$ muestran diferencias significativas cuando se comparan los niveles de marcadores en las células tratadas a diferentes tiempos con PMA con los niveles de los marcadores en las células control no tratadas.

1.2. La producción de ROS es necesaria para la diferenciación megacariocítica de las células madre hematopoyéticas CD34⁺.

Con el fin de determinar si nuestras observaciones tenían relevancia desde un punto de vista fisiológico, llevamos a cabo experimentos de diferenciación megacariocítica con células primarias hematopoyéticas humanas CD34⁺ aisladas a partir de sangre periférica.

En primer lugar analizamos si se producía en estas células un incremento de ROS en respuesta a la estimulación de las mismas con TPO. Sattler *et al.* describieron en 1999 (Sattler *et al.*, 1999) la inducción de ROS en respuesta a TPO en la línea celular megacarioblástica MO7e. Sin embargo, hasta donde nosotros conocemos, no se ha descrito todavía la producción de ROS en células primarias hematopoyéticas CD34⁺ en respuesta a TPO. Los resultados obtenidos en estos experimentos muestran como la TPO es capaz de inducir un rápido incremento en los niveles de ROS intracelulares. Además, cuando estos

experimentos se llevaron a cabo en presencia del antioxidante Trolox, se pudieron observar unos niveles de ROS significativamente inferiores a los observados en las células que habían sido tratadas sólo con TPO (Figura IV-8).

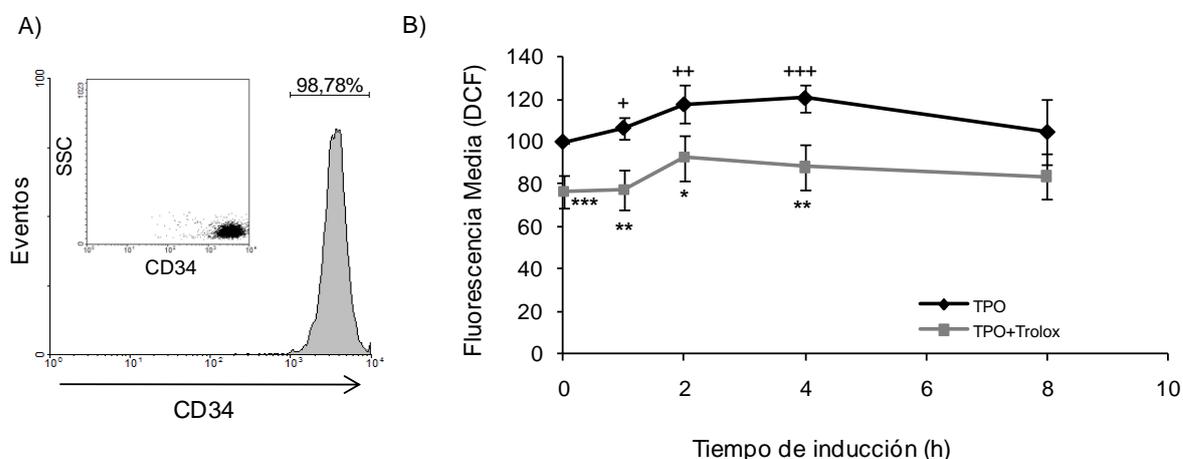


Fig. IV-8. Análisis de la producción de ROS en respuesta a TPO en ausencia o presencia de Trolox en células CD34⁺. Las células humanas CD34⁺ fueron aisladas a partir de sangre periférica. (A) La pureza alcanzada para las CD34⁺ fue de alrededor del 98%. (B) La producción de ROS en respuesta a TPO 100 ng/ml fue medida en células CD34⁺ marcadas con la sonda DCFDA en presencia o ausencia de Trolox 10 μ M. Los niveles de ROS se normalizaron con respecto a los niveles observados en las células no tratadas. Los resultados son la media aritmética \pm la desviación estándar de 4 experimentos diferentes. +++ $p < 0,001$; ++ $p < 0,01$; + $p < 0,05$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con TPO y las células no tratadas. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con TPO+Trolox y las células tratadas sólo con TPO.

Para determinar si los ROS son importantes en la diferenciación megacariocítica de las células humanas CD34⁺ se llevaron a cabo experimentos de diferenciación en presencia o ausencia de dos antioxidantes (NAC y Trolox). La diferenciación megacariocítica se evaluó en función de los niveles de expresión en la superficie de estas células de tres marcadores megacariocíticos (CD42b, CD41 y CD61). La estimulación con TPO 100 ng/ml durante 7 días fue suficiente para inducir un incremento significativo en los niveles de los tres marcadores megacariocíticos. En presencia de los antioxidantes NAC y Trolox, los niveles observados de estos marcadores fueron siempre inferiores a los observados en las células diferenciadas únicamente en presencia de TPO (Figura IV-9).

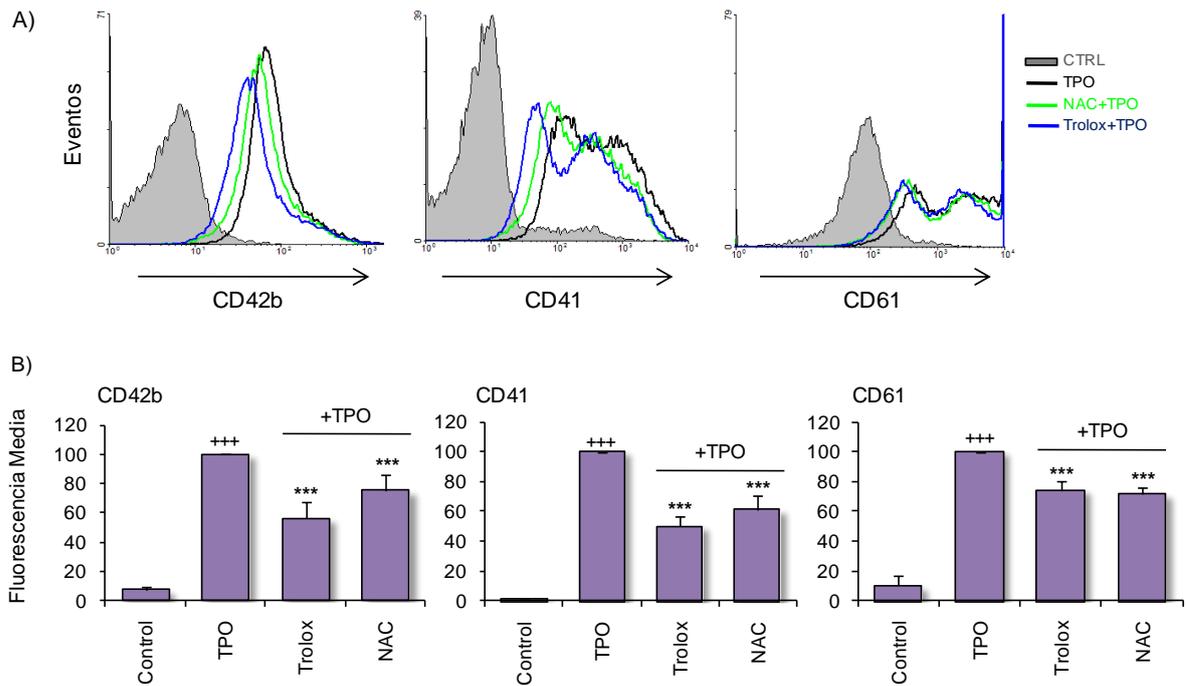


Fig. IV-9. Análisis del efecto de los antioxidantes sobre la expresión de marcadores de diferenciación megacariocítica en células $CD34^+$. Las células $CD34^+$ se diferenciaron por tratamiento con TPO 100 ng/ml en presencia o ausencia de Trolox $10\mu M$ o NAC $100\mu M$ durante 7 días. (A) Los histogramas muestran un experimento representativo para cada uno de los marcadores megacariocíticos. (B) Se muestra la media de los niveles de expresión de los marcadores megacariocíticos (CD42b, CD41 y CD61) \pm la desviación estándar de 4 experimentos diferentes normalizados a TPO. +++ $p < 0,001$ representan diferencias significativas cuando se comparan las células diferenciadas con TPO con respecto a las células no diferenciadas. *** $p < 0,001$ representan diferencias significativas cuando se comparan células diferenciadas con TPO+antioxidantes con células diferenciadas sólo con TPO.

Se analizó la morfología de las células $CD34^+$ a lo largo del proceso de diferenciación megacariocítica mediada por TPO mediante tinción con el método de May-Grünwald-Giemsa igual que habíamos realizado previamente para las líneas celulares. Tras 7 días de diferenciación se pudieron observar características morfológicas de megacariocitos. Así las células $CD34^+$ diferenciadas con TPO presentaban un mayor tamaño que las células indiferenciadas, núcleos polilobulados o polisegmentados y un citoplasma predominantemente basófilo. Cuando la diferenciación se llevó a cabo en presencia de antioxidantes, no se observaron ninguna de dichas características morfológicas (Figura IV-10).

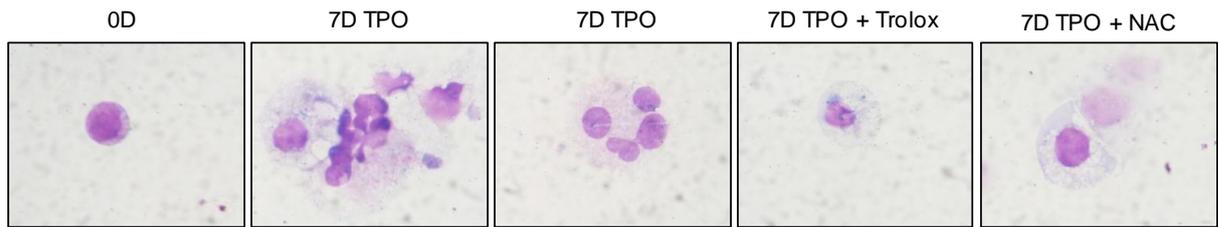


Fig. IV-10. Análisis de los cambios morfológicos durante la diferenciación megacariocítica de células humanas CD34⁺ en presencia o ausencia de diferentes antioxidantes. Las células CD34⁺ se diferenciaron durante 7 días por tratamiento con TPO 100 ng/ml en presencia o ausencia de NAC 100 μ M o Trolox 10 μ M y teñidas por el método de May-Grünwald-Giemsa.

Además, analizamos el efecto del tratamiento con los diferentes antioxidantes sobre la viabilidad celular de las CD34⁺. Ninguno de ellos mostró un efecto significativo sobre la viabilidad de las células CD34⁺ (Figura IV-11). Por lo tanto, el efecto de los antioxidantes observado sobre la diferenciación megacariocítica de las células CD34⁺ no se puede atribuir a un efecto indirecto sobre la viabilidad celular.

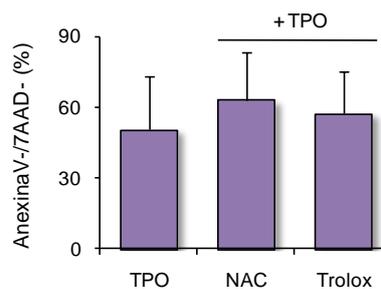


Fig. IV-11. Análisis del efecto del tratamiento con los diferentes antioxidantes sobre la viabilidad celular de las células humanas CD34⁺. Las células CD34⁺ se trataron con TPO 100 ng/ml durante 7 días en presencia o ausencia de NAC 100 μ M o Trolox 10 μ M. La viabilidad celular se analizó mediante el marcado de las células con AnexinaV/7AAD. Los resultados son la media aritmética \pm la desviación estándar del porcentaje de células viables (AnexinaV-/7AAD-) de 3 experimentos diferentes.

Los datos obtenidos tanto en las líneas celulares como en las células humanas CD34⁺ apoyan la idea de que la producción de ROS es necesaria para la diferenciación megacariocítica, por lo que pensamos que la producción de ROS ha de estar implicada en el mecanismo de megacariopoyesis *in vivo*.

2. ORIGEN DE LOS ROS IMPLICADOS EN MEGACARIOPOYESIS.

A continuación estudiamos el origen de los ROS implicados en la diferenciación megacariocítica. Está descrito que la actividad de las NADPH oxidasas es la principal fuente de ROS extramitocondrial (Nauseef, 2008). Por lo tanto, es probable que estos ROS procedan de la actividad de alguna NADPH oxidasa activada específicamente a lo largo del proceso de diferenciación.

2.1. Implicación de la actividad de una NADPH oxidasa en la diferenciación megacariocítica.

Para comprobar si los ROS implicados en la diferenciación megacariocítica procedían de una NADPH oxidasa, lo primero que hicimos fue medir dicha actividad en nuestras células en respuesta a PMA. El tratamiento con PMA induce un incremento de la actividad NADPH oxidasa que parece dosis-dependiente (Figura IV-12).

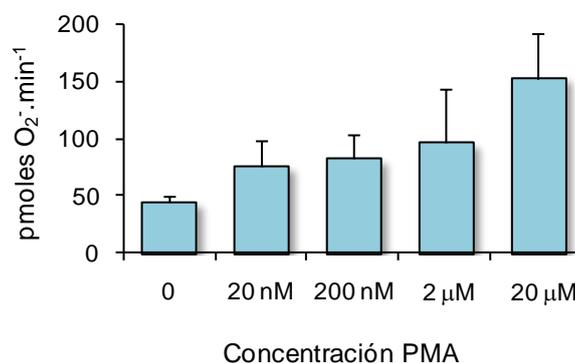


Fig. IV-12. Análisis de la actividad NADPH oxidasa en respuesta a distintas concentraciones de PMA. Se midió la actividad NADPH oxidasa en función de la producción de anión superóxido extracelular (O₂⁻) en células K562 estimuladas con distintas concentraciones de PMA. El histograma muestra la media ± la desviación estándar de tres experimentos diferentes llevados a cabo por triplicado.

Puesto que el PMA era capaz de estimular la actividad NADPH oxidasa, es posible que dicha actividad esté implicada en la diferenciación megacariocítica. Para comprobarlo decidimos inhibir dicha actividad y analizar el efecto sobre los parámetros de diferenciación. Uno de los inhibidores químicos de la actividad NADPH oxidasa más utilizados es el difenil iodonium (DPI). Debido a su estructura molecular (Figura IV-13) el DPI actúa como un inhibidor no competitivo de la actividad de muchas flavoenzimas. Cross y Jones observaron en el año

1986 que el DPI era capaz de inhibir la producción de O_2^- mediada por la actividad de una NADPH oxidasa en neutrófilos de cerdo (Cross y Jones, 1986). Así, Cross y Jones pudieron observar que a concentraciones de DPI a partir de $10 \mu M$ se producía una inhibición total de la enzima. También se ha descrito previamente que el DPI es capaz de inhibir la producción de O_2^- inducida en respuesta a PMA, en macrófagos aislados a partir del peritoneo de rata después de unos pocos minutos de preincubación con el DPI (Hancock y Jones, 1987).

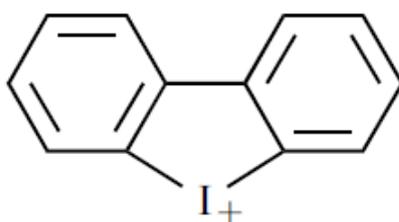


Fig. IV-13. Estructura molecular del DPI.

En primer lugar medimos la actividad NADPH oxidasa en respuesta a PMA en presencia o ausencia de DPI para asegurarnos que este compuesto conseguía inhibir la producción de O_2^- que se produce en respuesta al tratamiento con PMA (Figura IV-12). Observamos una disminución en la producción de anión superóxido extracelular cuando tanto las células K562 como las células HEL se pretrataron con DPI (Figura IV-14). En ambos casos, la disminución fue estadísticamente significativa. Sin embargo, en células K562 la disminución resultó más evidente ya que la producción de O_2^- en respuesta a PMA se estimulaba en mayor medida en esta línea celular que en las células HEL.

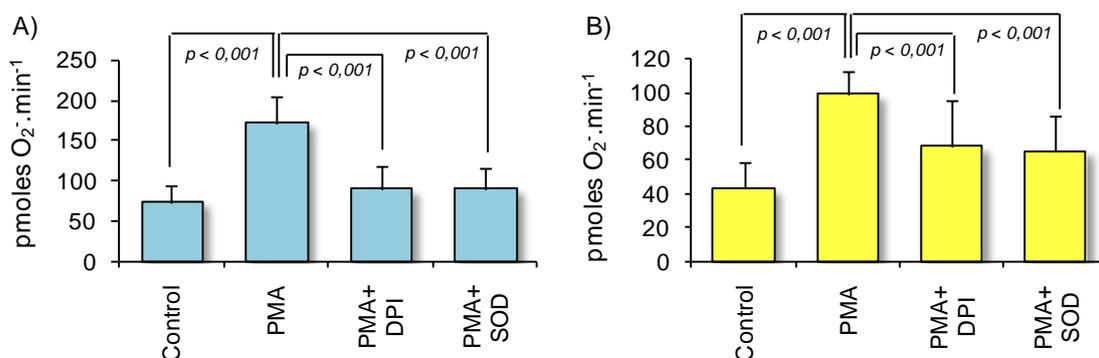


Fig. IV-14. Análisis de la actividad NADPH oxidasa inducida por PMA en presencia o ausencia de DPI. Se midió la actividad NADPH oxidasa en función de la producción extracelular de anión superóxido (O_2^-) en células K562 (A) o HEL (B) estimuladas PMA $20 \mu M$ en presencia o

ausencia de superóxido dismutasa (SOD) 50 U o DPI 50 μ M. El histograma muestra la media \pm la desviación estándar de tres experimentos diferentes llevados a cabo por triplicado.

Una vez confirmado mediante estos experimentos que el tratamiento de las líneas celulares K562 y HEL con DPI disminuía la producción de O_2^- en respuesta a PMA, se analizaron los niveles de ROS a lo largo de la diferenciación megacariocítica en presencia o ausencia de DPI en ambas líneas celulares.

En células K562 (al igual que ya habíamos descrito en la Figura IV-1A) se observó un rápido incremento en los niveles intracelulares de ROS. Los niveles máximos de ROS se alcanzaban en torno a la hora de inducción con PMA. Cuando se realizó la medida en presencia de DPI no se observó un incremento en los niveles de ROS a tiempos cortos de diferenciación (Figura IV-15A). Por lo tanto, parece que el tratamiento de las células K562 con DPI evita el estallido de ROS inducido por PMA a tiempos cortos. Además, los niveles de ROS en presencia de DPI se mantuvieron de forma constante inferiores a los de las células tratadas sólo con PMA hasta las 16 horas de inducción con PMA, momento en el cual ya no se apreciaban diferencias significativas entre los niveles de ROS en células tratadas sólo con PMA y células tratadas con PMA+DPI (Figura IV-15B).

En células HEL, a diferencia de lo observado en células K562, sí que se produjo un incremento de ROS en presencia de DPI (Figura IV-16A). Por lo tanto, en esta línea celular el DPI no es capaz de inhibir el estallido de ROS a tiempos cortos. Sin embargo, el tratamiento de las células HEL con este compuesto mantuvo los niveles de ROS significativamente inferiores a los de las células tratadas sólo con PMA a lo largo de todo el proceso de diferenciación (Figura IV-16A y IV-16B). En consecuencia, el DPI estaría inhibiendo el estallido de ROS que se produce en las células HEL a tiempos largos de diferenciación, concretamente a partir de 24 horas (Figura IV-16B).

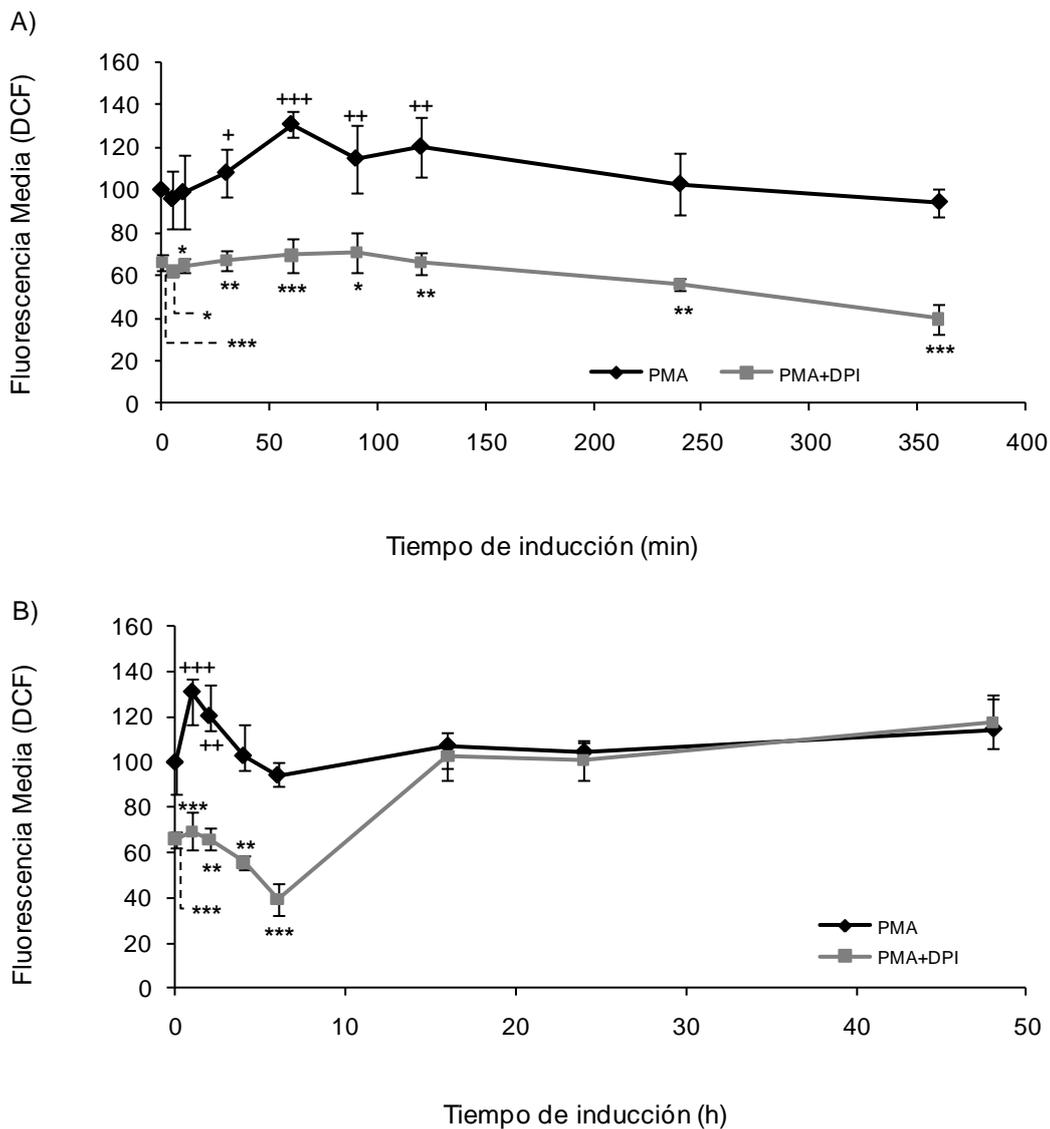


Fig. IV-15. Análisis de la producción de ROS en respuesta a PMA en presencia o ausencia de DPI en células K562. Se estimularon las células K562 con PMA 20 nM y se analizaron los niveles intracelulares de ROS por citometría de flujo en células marcadas con la sonda fluorescente DCFDA en ausencia o presencia de DPI 5 μ M a distintos tiempos. (A) tiempos cortos de inducción con PMA; (B) tiempos largos de inducción con PMA. Los resultados son la media aritmética \pm la desviación estándar de 4 experimentos diferentes. +++ $p < 0,001$; ++ $p < 0,01$; + $p < 0,05$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con PMA y las células no tratadas. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con PMA+DPI y las células tratadas sólo con PMA.

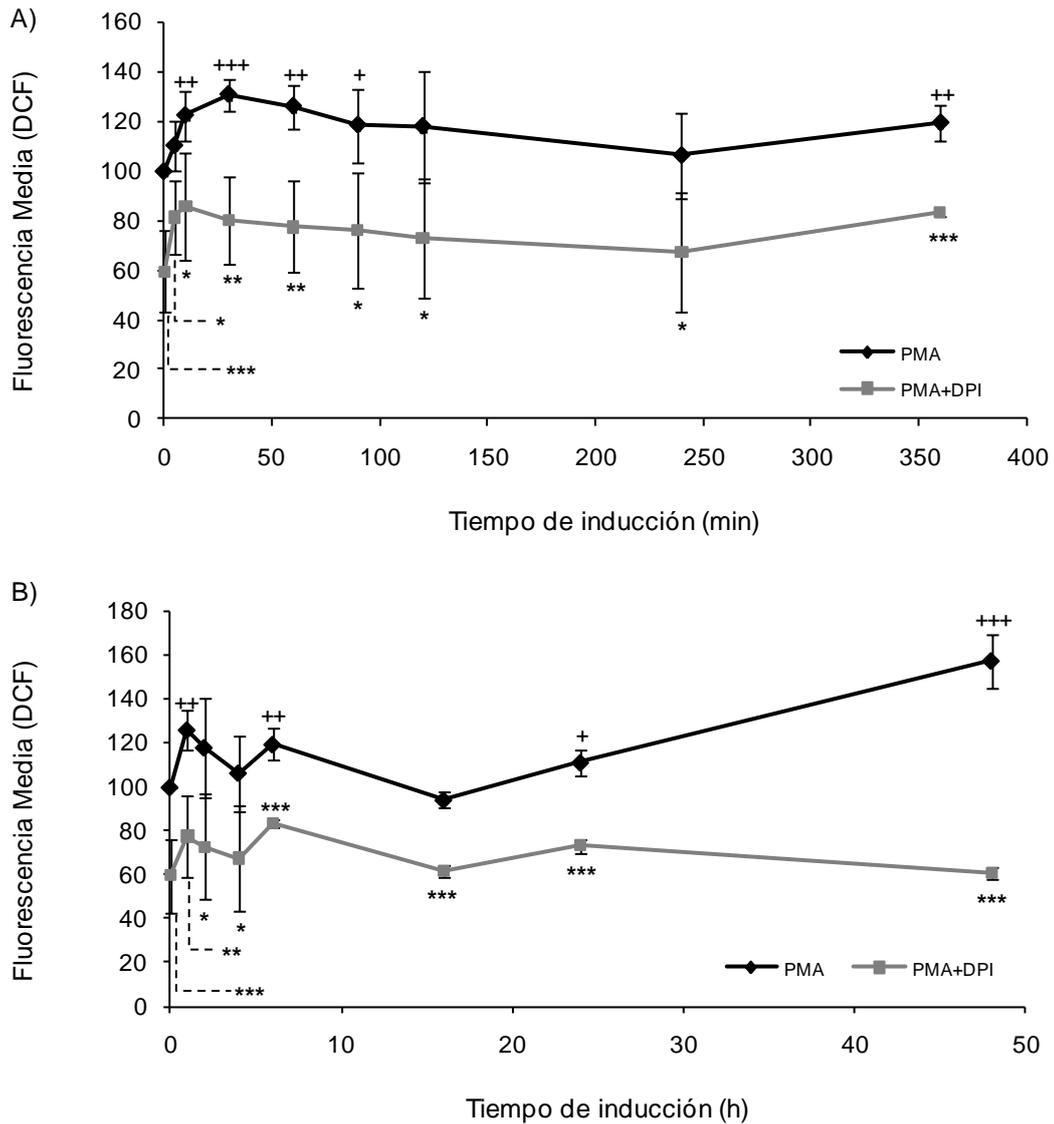


Fig. IV-16. Análisis de la producción de ROS en respuesta a PMA en presencia o ausencia de DPI en células HEL. Se estimularon las células HEL con PMA 20 nM y se analizaron los niveles intracelulares de ROS por citometría de flujo en células marcadas con la sonda fluorescente DCFDA en ausencia o presencia de DPI 5 μ M a distintos tiempos. (A) tiempos cortos de inducción con PMA; (B) tiempos largos de inducción con PMA. Los resultados son la media aritmética \pm la desviación estándar de 4 experimentos diferentes. +++ $p < 0,001$; ++ $p < 0,01$; + $p < 0,05$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con PMA y las células no tratadas. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con PMA+DPI y las células tratadas sólo con PMA.

Con el fin de determinar la relevancia de los ROS derivados de la actividad NADPH oxidasa sobre la diferenciación megacariocítica, llevamos a cabo experimentos de diferenciación tanto en células K562 como en células HEL en presencia o ausencia de DPI 5 μ M. La diferenciación megacariocítica se evaluó en primer lugar en función de los niveles de expresión en la superficie de las

células K562 y HEL de dos marcadores megacariocíticos (CD41 y CD61), y del marcador eritrocítico GpA.

En células K562 se comprobó que la diferenciación de las células en presencia de DPI producía cambios significativos en los niveles de expresión de los tres marcadores de superficie analizados. Así, las células tratadas con DPI presentaban niveles significativamente inferiores de los marcadores megacariocíticos (CD41 y CD61) y niveles significativamente superiores del marcador eritrocítico (GpA), cuando se comparaban con los niveles observados en células diferenciadas sólo en presencia de PMA (Figura IV-17).

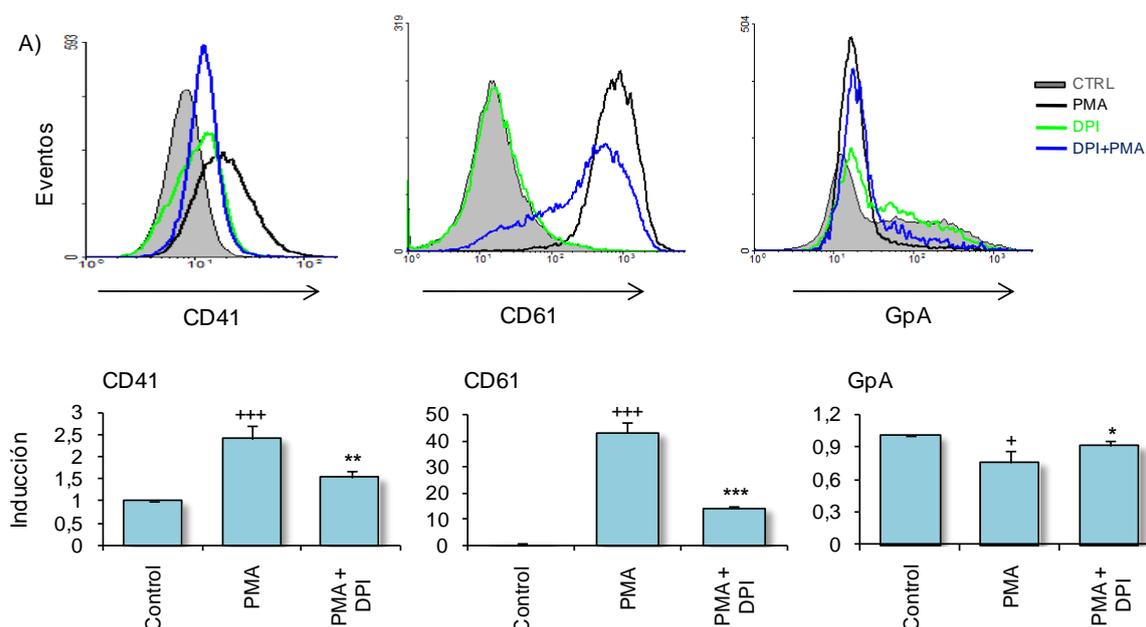


Fig. IV-17. Análisis del efecto del DPI sobre la expresión de marcadores de diferenciación en células K562. Las células K562 se diferenciaron por tratamiento con PMA 20 nM en presencia o ausencia de DPI 5 μ M durante 48 horas. (A) Los histogramas muestran un experimento representativo para cada uno de los marcadores analizados. (B) Se muestra el número de veces de inducción de la expresión de los marcadores (CD41, CD61 y GpA) con respecto a las células control. Para las células diferenciadas con PMA, se utilizaron como células control células tratadas con el vehículo (DMSO) diluido 10^5 veces. En el caso de las células tratadas con PMA+DPI, se utilizaron como células control células tratadas con DMSO+DPI. Los resultados son la media aritmética \pm la desviación estándar de 4 experimentos diferentes. +++ $p < 0,001$; + $p < 0,05$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con PMA y las células tratadas con DMSO. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con PMA+DPI y las células tratadas sólo con PMA.

En este caso, en células HEL se obtuvieron los mismos resultados que previamente hemos descrito en células K562 (Figura IV-18). Ya que las células HEL presentan unos niveles basales de marcadores megacariocíticos superiores a los de las células K562 (Papayannopoulou et al, 1983), se pudo observar en

esta línea celular la disminución del marcador eritrocítico GpA con mayor claridad que el incremento de los marcadores megacariocíticos. Esto hace que resulte más fácil encontrar diferencias en células HEL en presencia de DPI cuando se analiza la GpA, al contrario de lo que ocurre en células K562.

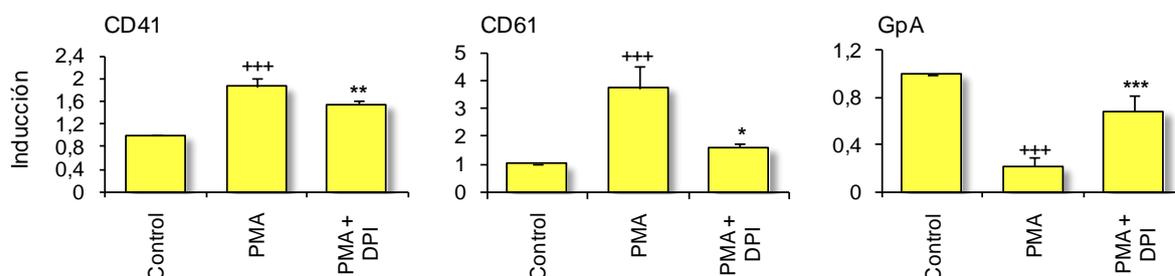


Fig. IV-18. Análisis del efecto del DPI sobre la expresión de marcadores de diferenciación en células HEL. Las células HEL se diferenciaron por tratamiento con PMA 20 nM en presencia o ausencia de DPI 5 μ M durante 48 horas. Se muestra el número de veces de inducción de la expresión de los marcadores (CD41, CD61 y GpA) con respecto a las células control. Para las células diferenciadas con PMA, se utilizaron como células control células tratadas con el vehículo (DMSO) diluido 10^5 veces. En el caso de las células tratadas con PMA+DPI, se utilizaron como células control células tratadas con DMSO+DPI. Los resultados son la media aritmética \pm la desviación estándar de 4 experimentos diferentes. +++ $p < 0,001$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con PMA y las células tratadas con DMSO. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con PMA+DPI y las células tratadas sólo con PMA.

Otra manera de evaluar si los ROS derivados de la actividad NADPH oxidasa son importantes en la diferenciación megacariocítica consiste en analizar los cambios que tienen lugar en la morfología de estas células a lo largo del proceso de diferenciación, y comparar estos cambios con los que tienen lugar en presencia de DPI. Así, comprobamos que el DPI evita el incremento de tamaño celular que típicamente acompaña a la diferenciación megacariocítica mediada por PMA (Figuras IV-19, IV-20A y IV-20B). Además, el tratamiento con DPI previno la adquisición del resto de las características morfológicas de los megacariocitos: núcleo polilobulado o polisegmentado y citoplasma basófilo (Figuras IV-20A y IV-20B).



Fig. IV-19. Análisis morfológico del efecto del DPI sobre la diferenciación megacariocítica mediante microscopía óptica. Las células HEL se diferenciaron por tratamiento con PMA 20 nM en presencia o ausencia de DPI 5 μ M. Se realizaron fotografías a distintos tiempos de diferenciación. El aumento final de las imágenes es de 40 veces.

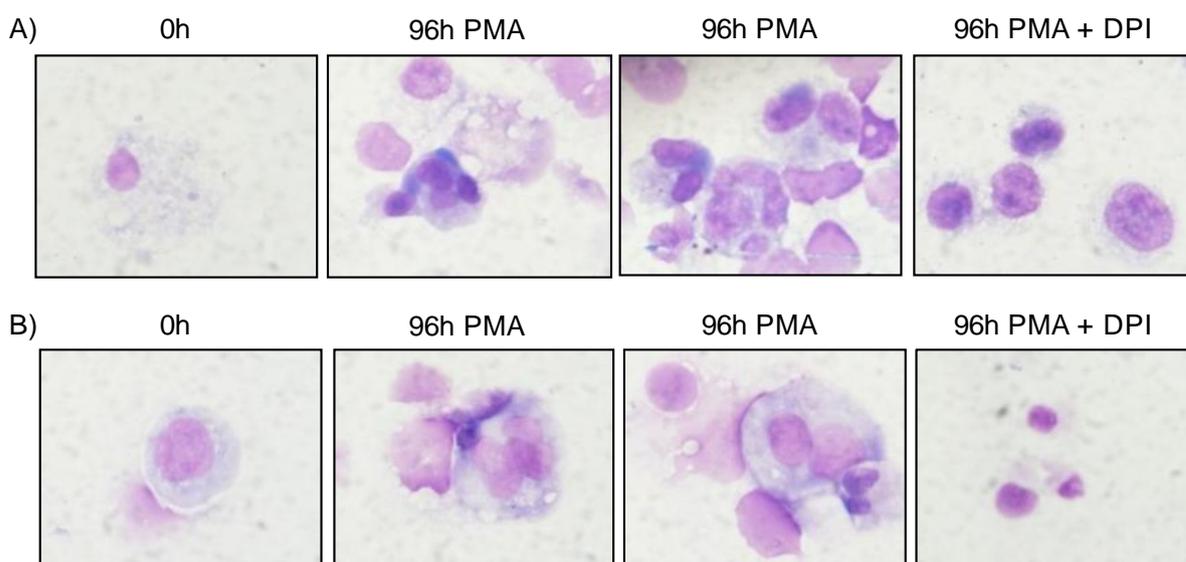


Fig. IV-20. Análisis morfológico del efecto del DPI sobre la diferenciación megacariocítica. Las células K562 (A) y HEL (B) se diferenciaron durante 96 h por tratamiento con PMA 20 nM en presencia o ausencia de DPI 5 μ M y teñidas por el método de May-Grünwald-Giemsa.

Otro parámetro morfológico que se puede analizar durante la diferenciación megacariocítica es la aparición de células poliploides. El tratamiento con PMA de células K562 (Leary et al, 1987) y HEL (Bermejo et al, 2002) induce la aparición de células poliploides. Cuando llevamos a cabo la diferenciación con PMA comprobamos la aparición de células poliploides en ambas líneas celulares (Figura IV-21). Estas células poliploides se pueden distinguir del resto de células diploides ya que emiten una mayor intensidad de fluorescencia cuando son teñidas con yoduro de propidio (Figuras IV-21A y IV-21B). Cuando las células se pretrataron con DPI, la aparición de células poliploides se inhibió por completo. La forma de los picos en los histogramas además sugiere que el DPI podría inducir la acumulación de las células en la fase G₂-M del ciclo celular, como ha sido propuesto recientemente (Yamaura, 2009). Estos resultados, sugieren que los ROS probablemente estarían implicados en la

progresión del ciclo celular. En este sentido, se ha publicado recientemente un artículo que apoya nuestros resultados, ya que sus autores McCrann *et al.* (McCrann, 2009) describen en este trabajo el papel potencial de las NADPH oxidasas en la poliploidización de los megacariocitos.

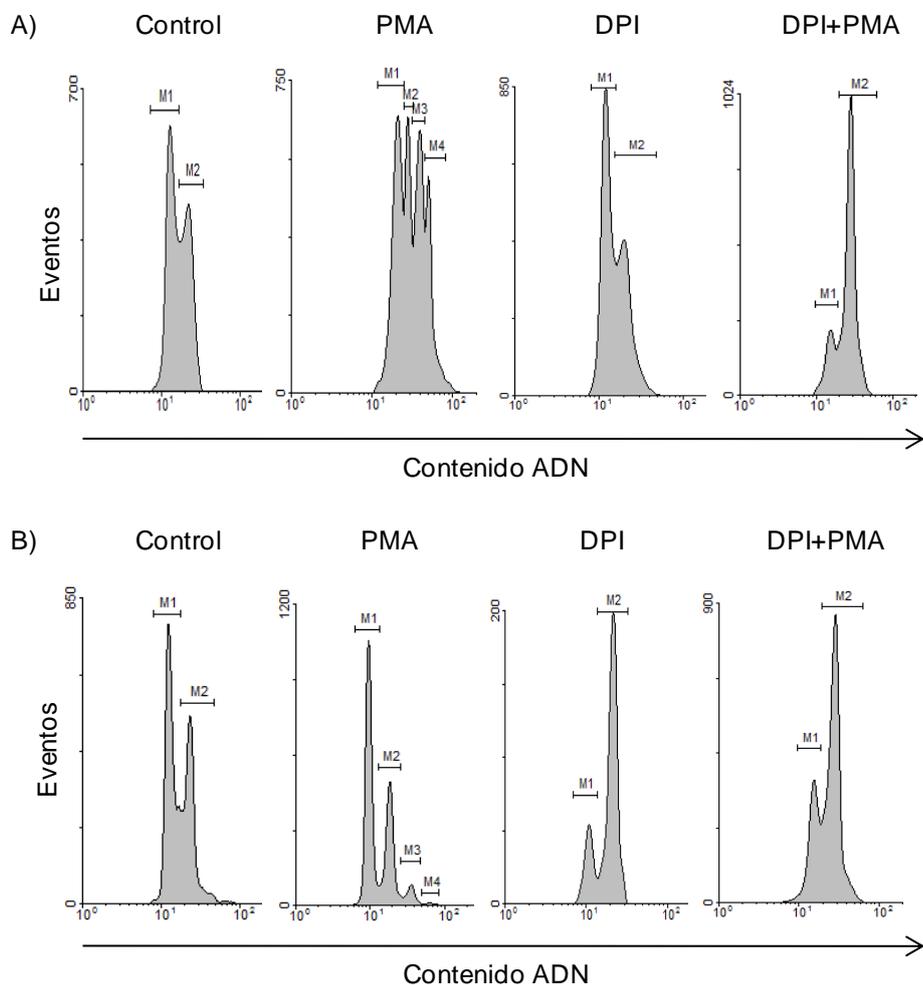


Fig IV-21. Análisis del efecto del DPI sobre el contenido de ADN durante la diferenciación megacariocítica. Se analizó el contenido de ADN en células diferenciadas por tratamiento con PMA 20 nM durante 48 horas en presencia o ausencia de DPI 5 μ M y marcadas con yoduro de propidio (IP). Se muestra un experimento representativo para células K562 (A) y para células HEL (B).

Como describimos anteriormente para los antioxidantes, se analizó la viabilidad de las células K562 y HEL también en presencia de DPI. No se detectaron diferencias significativas en cuanto a la viabilidad celular entre las células tratadas sólo con PMA y las células tratadas con PMA+DPI bajo nuestras condiciones experimentales (Figura IV-22). Por lo tanto, el efecto del tratamiento con DPI sobre la diferenciación megacariocítica no se produce por un efecto indirecto del DPI sobre la viabilidad celular.

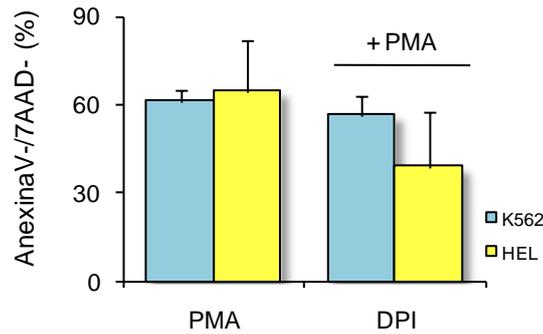


Fig. IV-22. Análisis del efecto del tratamiento con DPI sobre la viabilidad celular. Las células K562 y HEL se trataron con PMA 20 nM durante 48 horas en presencia o ausencia de DPI 5 μ M. La viabilidad celular se analizó mediante el marcado de las células con AnexinaV/7AAD. Los resultados son la media aritmética \pm la desviación estándar del porcentaje de células viables (AnexinaV-/7AAD-) de 3 experimentos diferentes.

En función de los resultados obtenidos mediante el empleo del DPI sobre las líneas celulares K562 y HEL, se puede concluir que el DPI reduce los niveles de ROS y dificulta la diferenciación megacariocítica (tanto a nivel de la expresión de marcadores de superficie como a nivel de la expresión de las características morfológicas típicas de los megacariocitos) sin afectar a la viabilidad celular. Sin embargo, como ya hemos comentado anteriormente, el DPI es un inhibidor inespecífico de la actividad de flavoproteínas. Dependiendo de la concentración de DPI utilizada, distintas enzimas pueden resultar inhibidas. A la concentración de DPI a la que hemos realizado nuestros experimentos (5 μ M), *a priori* sólo debería resultar inhibida la actividad NADPH oxidasa. Para corroborar esta hipótesis, se llevaron a cabo experimentos de medida del potencial respiratorio mitocondrial en células marcadas con la sonda fluorescente TMRE, ya que una de las enzimas que se puede estar inhibiendo con mayor probabilidad de manera indirecta por la acción del DPI es la NADH deshidrogenasa mitocondrial. La acumulación de esta sonda en las células es un indicativo del estado de las mitocondrias. Estos experimentos no arrojaron diferencias significativas entre la acumulación de TMRE en células tratadas sólo con PMA y células tratadas con PMA+DPI. Por lo tanto, puede considerarse que el efecto sobre la diferenciación observado en los diferentes experimentos realizados con el DPI se debe a una inhibición específica de la actividad NADPH oxidasa.

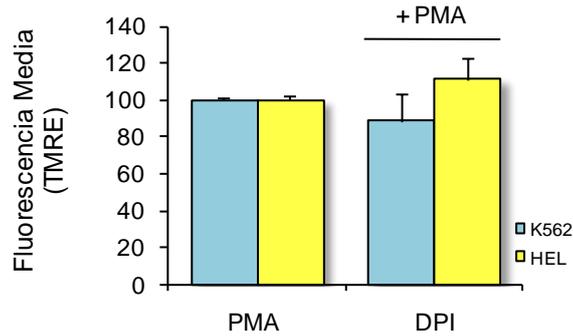


Fig. IV-23. Análisis del efecto del DPI sobre el potencial respiratorio de la mitocondria. Las células K562 y HEL se trataron con PMA 20 nM durante 48 horas en presencia o ausencia de DPI 5 μ M. El potencial respiratorio de las células se analizó mediante el marcado de las células con la sonda fluorescente TMRE 10 nM. Los resultados son la media aritmética \pm la desviación estándar de la fluorescencia media para la TMRE. Los valores de fluorescencia media se normalizaron con respecto a los valores observados en células tratadas con PMA 20 nM.

Con el fin de apoyar aún más la hipótesis de que los ROS derivados de la actividad NADPH oxidasa eran necesarios para la diferenciación megacariocítica, decidimos realizar experimentos de diferenciación en presencia de otro inhibidor de la actividad NADPH oxidasa, la apocinina. La apocinina, al igual que ocurre con el DPI, no lleva a cabo una inhibición totalmente específica de la actividad de las NADPH oxidasas (Aldieri et al, 2008). A pesar de esto, se trata de un compuesto ampliamente utilizado ya que a día de hoy no existen inhibidores totalmente específicos para este grupo de enzimas (Aldieri et al, 2008). La apocinina o acetovanilona (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona) es un catecol sustituido en posición orto con un grupo metoxilo (Figura IV-24). Stolk *et al.* describieron por primera vez la inhibición de la actividad NADPH oxidasa en neutrófilos y eosinófilos tras 7 minutos de tratamiento con apocinina 300 μ M (Stolk et al, 1994). Estos investigadores descubrieron que la inhibición de la actividad NADPH oxidasa inducida por la apocinina, se debía a que este compuesto era capaz de interferir con la translocación intracelular a la membrana de varias subunidades del complejo enzimático de la NOX2 (p47^{phox} y p67^{phox}). Sin embargo, según se ha descrito, la apocinina como tal no es capaz de llevar a cabo su función inhibitoria sobre NOX2, sino que tiene que sufrir una serie de transformaciones químicas para convertirse en su forma activa. Se ha propuesto que las peroxidasas serían capaces de convertir a la apocinina en un dímero simétrico: la diapocinina, a través de la formación de un enlace 5,5' carbono-

carbono (Figura IV-24) (Johnson et al, 2002). La diapocinina sería en consecuencia la forma activa del compuesto y evitaría el ensamblaje correcto del complejo NOX2, y por lo tanto su activación, a través de la reacción de la diapocinina con grupos tioles en p47^{phox} esenciales para el ensamblaje del complejo.

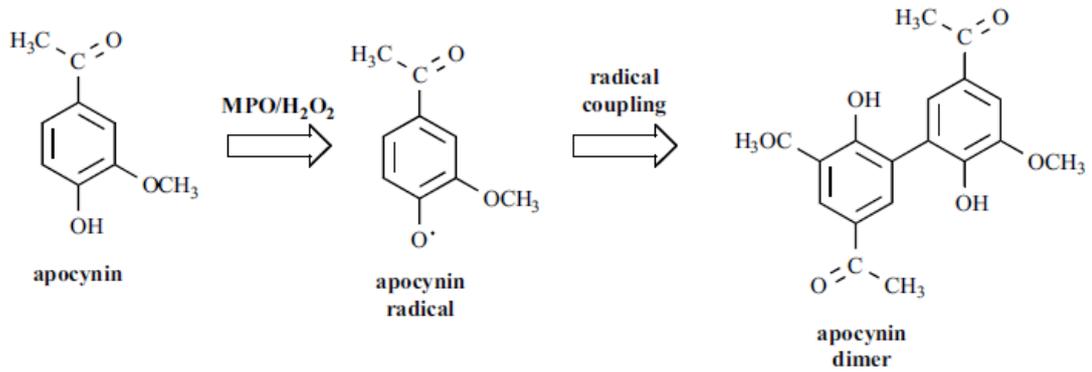


Figura IV-24. Reacción de dimerización de la apocinina mediada por una peroxidasa. (Tomado de Aldieri, 2008).

Para determinar el efecto del tratamiento con apocinina sobre la diferenciación megacariocítica, se realizaron experimentos de diferenciación en presencia de apocinina procesada (el procesamiento de la apocinina se explica en apartado 4.2. de la sección de Materiales y Métodos). Comprobamos un ligero efecto del tratamiento con apocinina sobre la diferenciación megacariocítica para ambas líneas celulares. En células K562 los niveles de los marcadores megacariocíticos (CD41 y CD61) fueron inferiores en las células tratadas con apocinina (Figura IV-25A), mientras que en las células HEL el nivel de expresión del marcador megacariocítico CD41 era inferior y el nivel de expresión del marcador eritrocítico GpA era superior en las células tratadas con apocinina (Figura IV-25B).

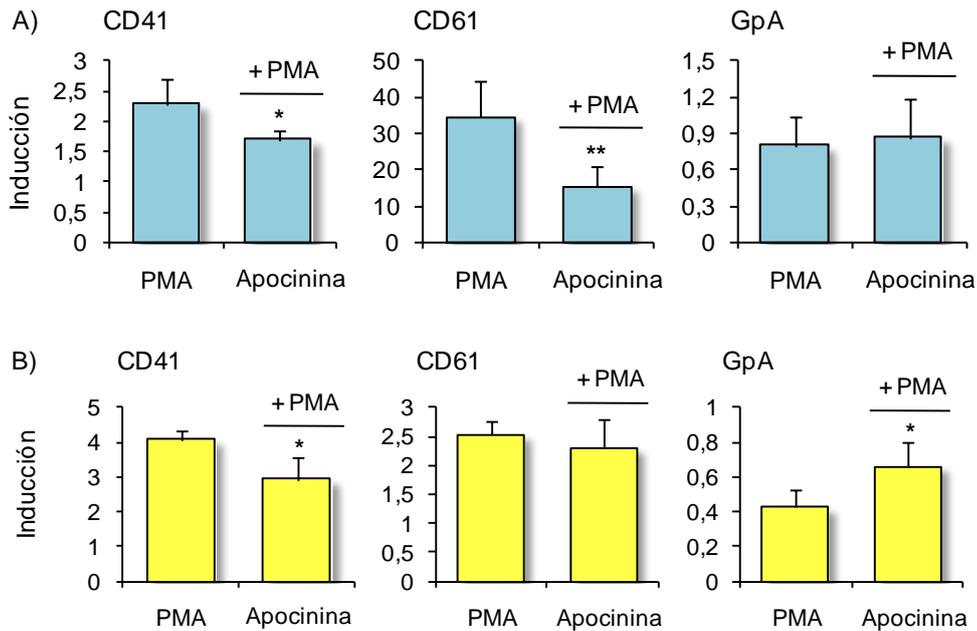


Fig. IV-25. Análisis del efecto de la apocinina sobre la diferenciación megacariocítica. Las células K562 (A) o HEL (B) fueron diferenciadas por tratamiento con PMA 20 nM en presencia o ausencia de apocinina 12,8 μ M durante 48 horas. Se muestra el número de veces de inducción de la expresión de los marcadores (CD41, CD61 y GpA) con respecto a las células control. Para las células diferenciadas con PMA se utilizaron como células control, células no tratadas. En el caso de las células tratadas con PMA+Apocinina se utilizaron como células control, células tratadas sólo con apocinina. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con PMA+Apocinina y las células tratadas sólo con PMA.

Asimismo, se evaluó el efecto de la apocinina sobre la viabilidad y la proliferación celular. No se encontraron diferencias significativas entre las células tratadas sólo con PMA y las células tratadas con PMA+apocinina ni sobre la viabilidad celular (Figura IV-26A) ni sobre la proliferación celular, tanto para células K562 como para células HEL (Figura IV-26B). Por lo tanto, se puede descartar que el efecto de la apocinina sobre la diferenciación megacariocítica se deba a un efecto indirecto sobre la viabilidad o la proliferación celular.

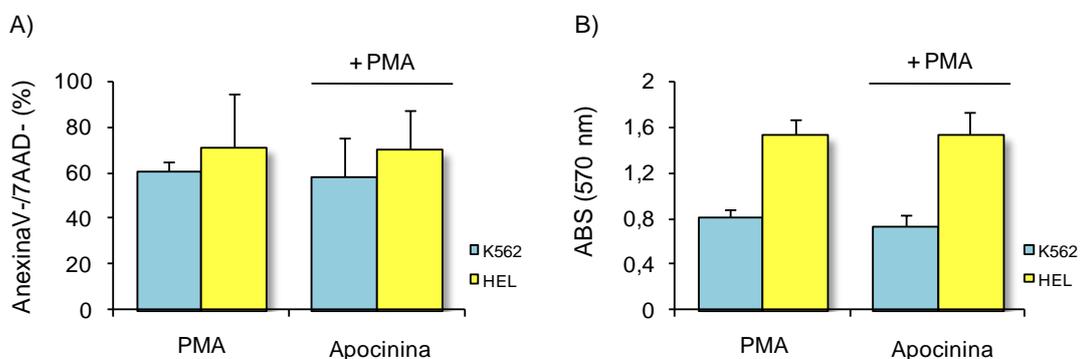


Fig. IV-26. Análisis del efecto de la apocinina sobre la viabilidad y la proliferación celular. Las células K562 y HEL se trataron con PMA 20 nM durante 48 horas en presencia o ausencia de

apocinina 12,8 μM . (A) La viabilidad celular se analizó mediante el marcado de las células con AnexinaV/7AAD. Los resultados son la media aritmética \pm la desviación estándar del porcentaje de células viables (AnexinaV-/7AAD-) de 3 experimentos diferentes. (B) La proliferación celular se analizó mediante el ensayo del MTT. Los resultados son la media aritmética \pm la desviación estándar de 3 experimentos diferentes.

Los efectos que produce el tratamiento con apocinina parecen ser más sutiles que los observados cuando las células eran tratadas con el DPI. Probablemente, esto se deba a que la apocinina actúa inhibiendo el correcto ensamblaje y actividad de la NOX2, mientras que el DPI es capaz de inhibir la actividad NADPH oxidasa en general, debido a su mecanismo de acción. Los resultados obtenidos con ambos tratamientos sugieren, por lo tanto, que el origen de los ROS implicados en diferenciación la megacariocítica residiría no sólo en la actividad de NOX2, sino que podría haber otras isoenzimas implicadas.

2.2. Una NADPH oxidasa dependiente de p22^{phox} está implicada en el proceso de diferenciación megacariocítica de las líneas celulares K562 y HEL.

p22^{phox} es una proteína de membrana necesaria para mantener la integridad de los complejos de la NADPH oxidasa (Bedard y Krause, 2007). p22^{phox} tiene dos funciones principales: 1) unirse a las subunidades catalíticas de las proteínas NOX, produciendo la estabilización de las mismas, y 2) unirse a subunidades organizadoras (Bedard y Krause, 2007). Concretamente, p22^{phox} es esencial para el correcto ensamblaje y actividad de cuatro de las siete isoformas de la NADPH oxidasa conocidas (NOX1, NOX2, NOX3 y NOX4), de tal manera que el ensamblaje de NOX5 parece independiente de esta proteína estructural (ver Tabla IV-3). Así, se ha descrito previamente que la interferencia del ARN mensajero de p22^{phox} conlleva una disminución en la función de NOX1, NOX2, NOX3 y NOX4 (Kawahara et al, 2005; Martyn et al, 2006), pero no de la de NOX5 (Brar et al, 2003; Kawahara et al, 2005). Este efecto estabilizador de p22^{phox} sobre las subunidades catalíticas de las NOXs parece deberse a que estas proteínas únicamente son estables en forma de heterodímero, de tal modo que en forma de monómeros estas proteínas se degradarían rápidamente vía proteasoma (DeLeo et al, 2000). La interacción de p22^{phox} con otras subunidades reguladoras del complejo de la NADPH oxidasa se lleva a cabo a través del dominio carboxilo terminal de esta proteína, el cual contiene regiones ricas en prolina (DeLeo et al,

1995; Leto et al, 1994), y es capaz de interaccionar con dominios SH3 de las subunidades reguladoras del complejo como p47^{phox} o NOXO1 (ver Tabla IV-3).

Tabla IV-3. Subunidades funcionales y reguladoras de las diferentes isoformas de la NADPH oxidasa.

Dominio catalítico	Dominio estabilizador	Subunidades reguladoras adicionales	Referencias
Nox1	p22 ^{phox}	Noxo1, NoxA1 y Rac1	(Miyano y Sumimoto, 2007)
Nox2	p22 ^{phox}	p47 ^{phox} , p67 ^{phox} , p40 ^{phox} y Rac1 o Rac2	(Ago et al, 1999; Babior, 2004; Ellson et al, 2001; Perisic et al, 2004)
Nox3	p22 ^{phox}	Noxo1	(Kiss et al, 2006; Paffenholz et al, 2004)
Nox4	p22 ^{phox}	Desconocidos	(Ambasta et al, 2004; Martyn et al, 2006)
Nox5	Desconocidos	Ca ²⁺	(Tirone y Cox, 2007)
Duox1 y Duox2	Desconocidos	Ca ²⁺	(Donko et al, 2005)

Puesto que, por el momento, desconocemos cuál o cuáles son las NADPH oxidasas implicadas en megacariopoyesis, decidimos interferir la expresión de p22^{phox} (lo cual afectaría a la actividad de cuatro de las siete NADPH oxidasas existentes). Para ver si esto tenía algún efecto sobre la megacariopoyesis llevamos a cabo experimentos de diferenciación en células K562 y células HEL en las cuales habíamos realizado previamente la interferencia del mensajero de p22^{phox} (ver apartado 4.16.5. de la sección de Material y Métodos). En primer lugar analizamos los niveles de p22^{phox} por transferencia de Western en ambas líneas celulares para poder determinar si habíamos conseguido interferir exitosamente los niveles de p22^{phox}. Comprobamos que las cuatro secuencias utilizadas fueron capaces de disminuir los niveles de p22^{phox} tanto en células K562 (Figura IV-27A) como en células HEL (Figura IV-27B).

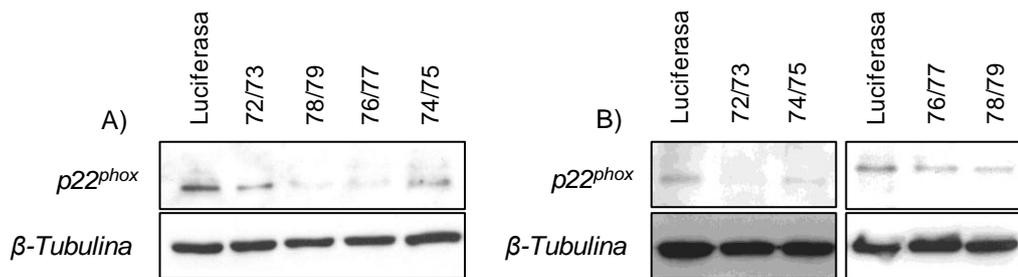


Fig. IV-27. Análisis de los niveles de p22^{phox} mediante transferencia de Western. Se analizaron los niveles de p22^{phox} en células K562 (A) y HEL (B) transfectadas con distintas construcciones del pSuper (pSuperLuc, pSuper72/73, pSuper 74/75, pSuper 76/77 y pSuper 78/79) y seleccionadas durante 14 días con G418. Se utilizaron como control de los niveles de p22^{phox} las células transfectadas con el shRNA de la luciferasa de luciérnaga. Se cargaron 25 µg de proteína por carril. Como control de carga se analizaron los niveles de β-tubulina.

Respecto a la actividad NADPH oxidasa confirmamos que en las células que se había interferido p22^{phox}, la actividad NADPH oxidasa se encontraba significativamente disminuida. Este resultado se observó en ambas líneas celulares (Figura IV-28).

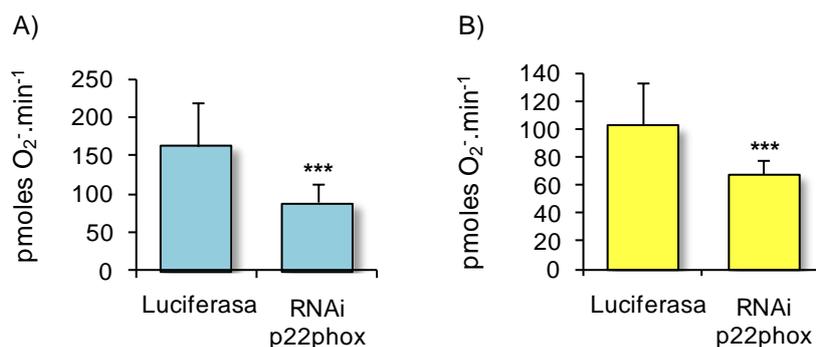


Fig. IV-28. Análisis de la actividad NADPH oxidasa en células con los niveles de p22^{phox} disminuidos por interferencia de ARN. Se midió la actividad NADPH oxidasa en función de la producción extracelular de anión superóxido (O₂⁻) en células K562 (A) o HEL (B), en las cuales se habían interferido los niveles de p22^{phox}. Los histogramas muestran la media ± la desviación estándar de tres experimentos diferentes llevados a cabo por triplicado. *** p<0,001 representa diferencias significativas entre las células con p22^{phox} interferida y las células control que llevan una secuencia para la interferencia de la luciferasa.

Estos resultados permiten proponer diferencias en cuanto a la diferenciación megacariocítica entre las células con p22^{phox} interferida y las células con unos niveles de esta proteína normales, ya que las células con unos niveles de p22^{phox} normales presentan una mayor actividad NADPH oxidasa (Figura IV-28) y, por lo tanto, cabría esperar también niveles de ROS intracelulares mayores. Comprobamos esta hipótesis llevando a cabo experimentos de diferenciación megacariocítica en células con p22^{phox} interferida y

como control células que expresaban una secuencia de interferencia para la luciferasa.

Tanto en células K562 como en células HEL los niveles de los marcadores megacariocíticos (CD41 y CD61) fueron significativamente inferiores en las células en las que se había interferido $p22^{phox}$ (Figura IV-29A, IV-29B y IV-29C). En cuanto al marcador eritrocítico GpA, se cuantificaron niveles significativamente superiores en las células K562 con $p22^{phox}$ interferida (Figura IV-29A, IV-29B y IV-29C).

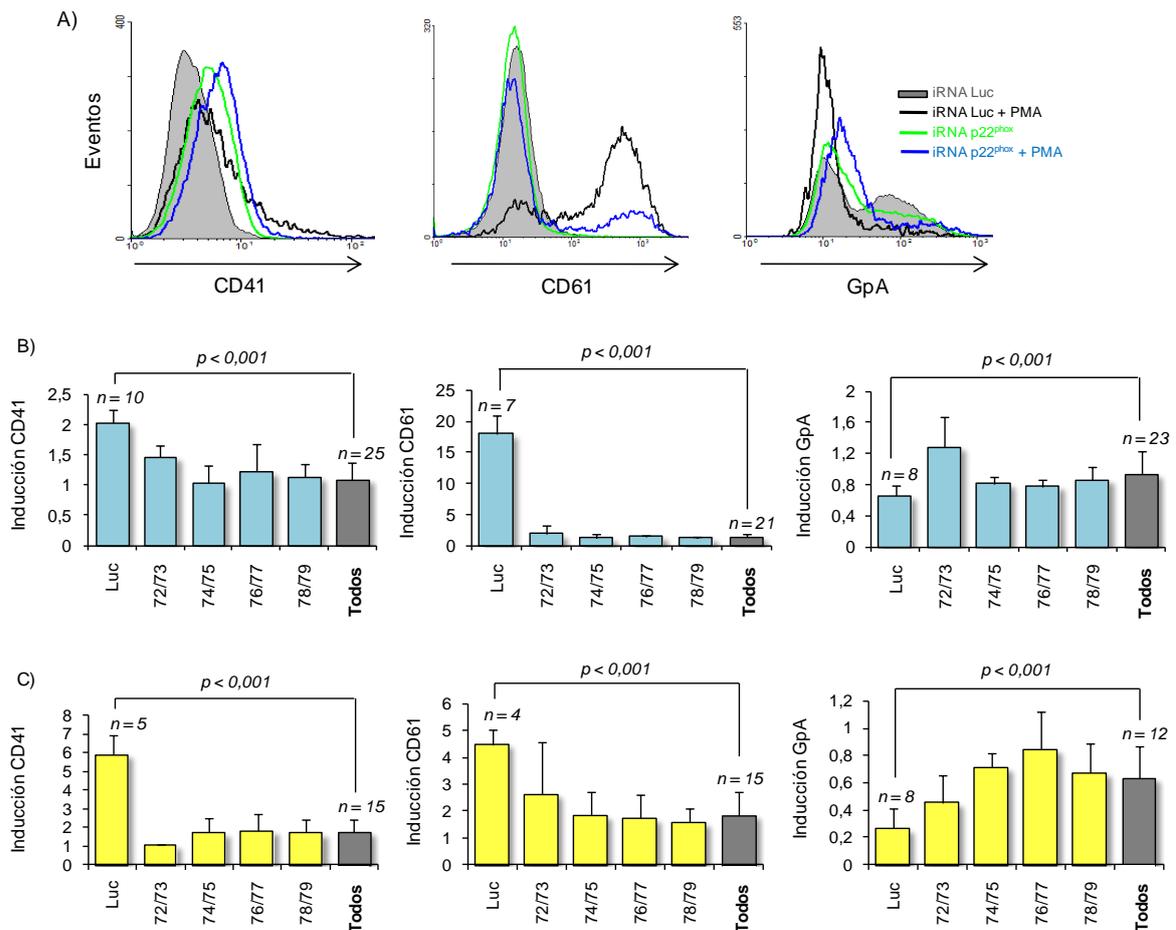


Fig. IV-29. Análisis del efecto de la interferencia de $p22^{phox}$ sobre la expresión de marcadores de diferenciación. Las células K562 o HEL transfectadas con distintas construcciones del pSuper (pSuperLuc, pSuper72/73, pSuper 74/75, pSuper 76/77 y pSuper 78/79) y seleccionadas durante 14 días con G418 se diferenciaron con PMA 20 nM durante 48 horas. (A) Los histogramas muestran un experimento representativo en células K562 para cada uno de los marcadores analizados. (B) Se muestra el número de veces de inducción de la expresión de los marcadores (CD41, CD61 y GpA) en las células K562 transfectadas con las distintas construcciones del pSuper+PMA con respecto a las mismas células sin PMA. (C) Se muestra el número de veces de inducción de la expresión de los marcadores (CD41, CD61 y GpA) en las células HEL transfectadas con las distintas construcciones del pSuper+PMA con respecto a las mismas células sin PMA. Los resultados son la media aritmética \pm la desviación estándar de al menos 7 experimentos diferentes.

A continuación, analizamos el efecto de la interferencia de p22^{phox} sobre la viabilidad y la proliferación celular. En células K562 se observó un efecto de la interferencia de p22^{phox} sobre la viabilidad celular, de tal modo que parece que la interferencia de esta proteína protege a las células K562 de la muerte celular por apoptosis (Figura IV-30A). Sin embargo, no se observó ningún efecto sobre la viabilidad de las células HEL (Figura IV-30A), ni tampoco sobre la proliferación celular en ninguna de las dos líneas celulares estudiadas (Figura IV-30B).

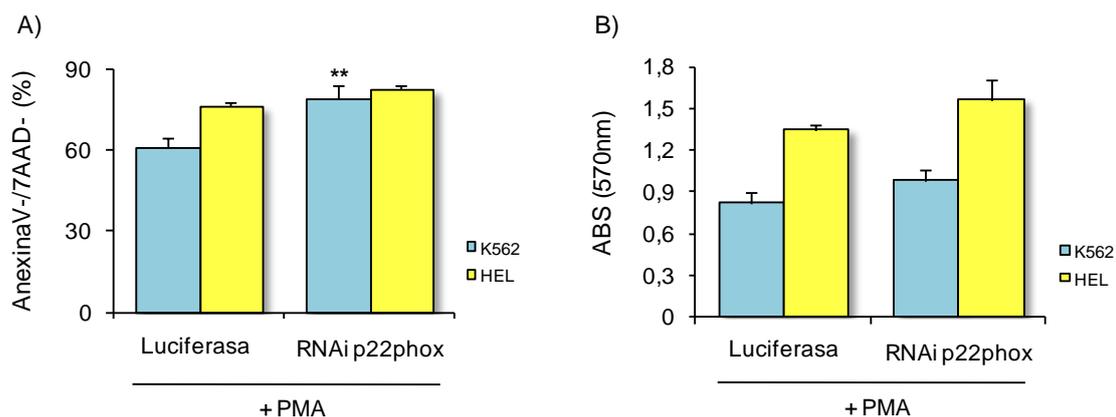


Fig. IV-30. Análisis del efecto de la interferencia de p22^{phox} sobre la viabilidad y la proliferación celular. Las células K562 y HEL transfectadas con distintas construcciones del pSuper (pSuperLuc, pSuper72/73, pSuper 74/75, pSuper 76/77 y pSuper 78/79) y seleccionadas durante 14 días con G418 se diferenciaron con PMA 20 nM durante 48 horas. (A) La viabilidad celular se analizó mediante el marcado de las células con AnexinaV/7AAD. Los resultados son la media aritmética \pm la desviación estándar del porcentaje de células viables (AnexinaV-/7AAD-) de 3 experimentos diferentes. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ representan diferencias significativas en cuanto a la viabilidad celular entre las células con p22^{phox} interferida y las células control que llevan una secuencia para la interferencia de la luciferasa. (B) La proliferación celular se analizó mediante el ensayo del MTT. Los resultados son la media aritmética \pm la desviación estándar de 3 experimentos diferentes.

En resumen, la interferencia de p22^{phox} produce una menor actividad NADPH oxidasa y, por lo tanto, la diferenciación megacariocítica se ve dificultada en ambas líneas celulares. No obstante, menores niveles de p22^{phox} no conllevan una disminución en la viabilidad ni en la proliferación celular en ninguna de las dos líneas celulares utilizadas. Todo esto pone de manifiesto que los ROS necesarios para llevar a cabo la diferenciación megacariocítica proceden de al menos una NADPH oxidasa dependiente de p22^{phox}. Esta NADPH oxidasa podría ser NOX1, NOX2, NOX3 o NOX4 ya que todas ellas son dependientes de p22^{phox} (ver Tabla IV-3). Por lo tanto, serán necesarios futuros experimentos para poder determinar con exactitud el origen de los ROS implicados en la diferenciación megacariocítica.

2.3. Una NADPH oxidasa dependiente de p22^{phox} está implicada en el proceso de diferenciación megacariocítica de las células madre hematopoyéticas CD34⁺.

Asímismo, realizamos experimentos de interferencia de p22^{phox} en células humanas CD34⁺ aisladas a partir de sangre de cordón umbilical, empleando las mismas secuencias diana utilizadas en las líneas celulares.

En primer lugar comprobamos si las células CD34⁺ de cordón umbilical (UCB-CD34⁺ del inglés "Umbilical Cord Blood-CD34⁺") eran capaces de diferenciarse hacia el linaje megacariocítico correctamente con el mismo tratamiento que habíamos empleado en el caso de las CD34⁺ de sangre periférica. Mediante el análisis de los marcadores megacariocíticos CD42b, CD41 y CD61, pudimos observar que tras 7 días de tratamiento con TPO 100 ng/ml se producía un incremento notable en el porcentaje de células positivas para los tres marcadores, comparado con el porcentaje de células positivas a día 0 del tratamiento (Figura IV-31B). Por lo tanto, nuestro tratamiento inducía exitosamente la diferenciación megacariocítica de las células UCB-CD34⁺ bajo nuestras condiciones experimentales.

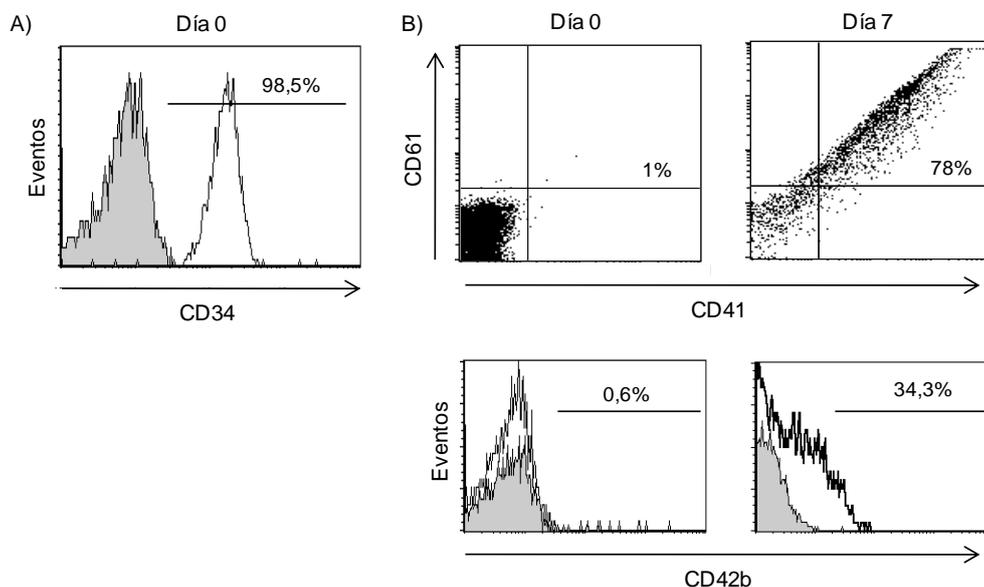


Fig. IV-31. Análisis de la diferenciación megacariocítica de células UCB-CD34⁺. Las células humanas CD34⁺ se aislaron a partir de sangre de cordón umbilical. (A) La pureza alcanzada para las UCB-CD34⁺ fue de alrededor del 98%. (B) Las células UCB-CD34⁺ fueron diferenciadas por tratamiento con TPO 100 ng/ml durante 7 días. Se analizó la diferenciación megacariocítica de las células UCB-CD34⁺ en función de la proporción de células dobles positivas CD61⁺/CD41⁺ y de la proporción de células CD42b⁺ a día 0 y a día 7 de diferenciación.

A continuación se analizó el efecto de la interferencia de p22^{phox} sobre la diferenciación megacariocítica de las células UCB-CD34⁺. Se realizaron

experimentos de diferenciación megacariocítica en paralelo en células que expresaban la secuencia necesaria para interferir $p22^{phox}$ y en células que expresaban la secuencia necesaria para interferir la luciferasa. Con estos experimentos se comprobó que tanto el porcentaje de células dobles positivas $CD61^+/CD41^+$ como el de células positivas para CD42b era significativamente inferior en las células que se habían infectado con el shRNA (Figura IV-32A). El mismo efecto se observó cuando se analizaron los niveles de fluorescencia media para los tres marcadores megacariocíticos (Figura IV-32B).

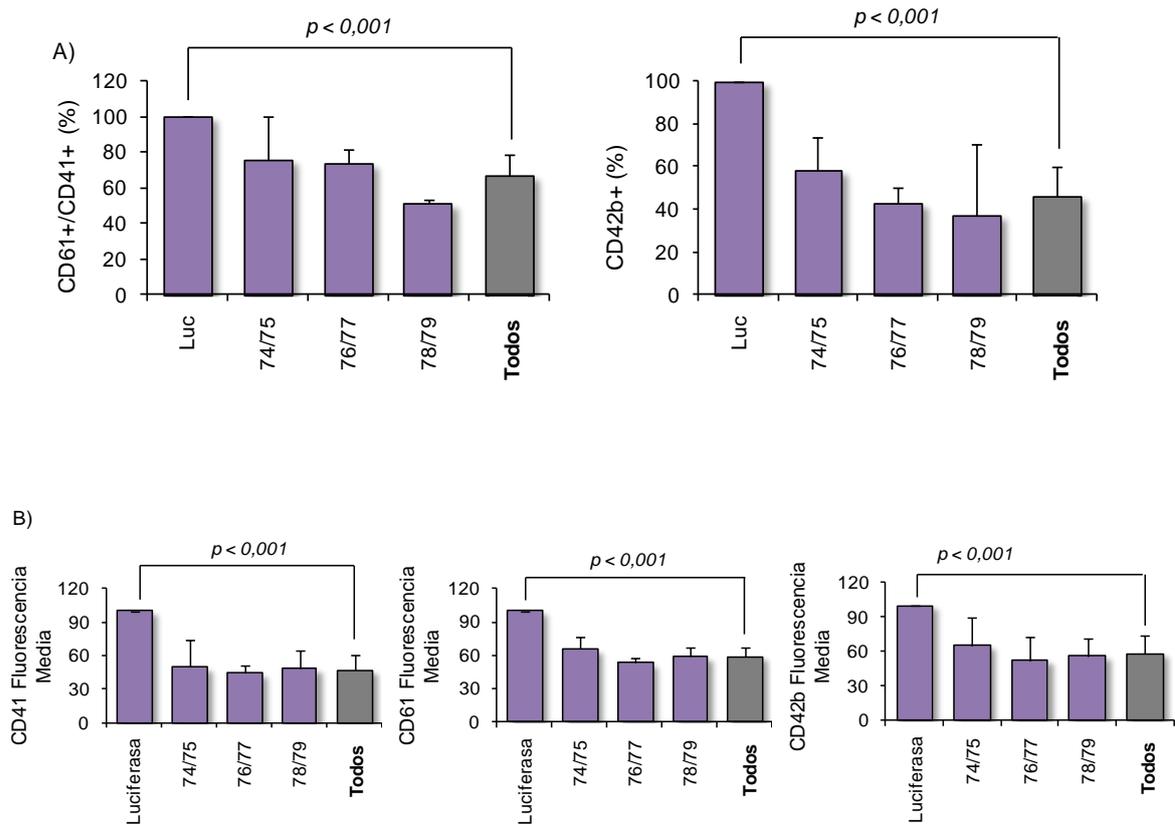


Fig. IV-32. Análisis del efecto de la interferencia de $p22^{phox}$ sobre la expresión de marcadores de diferenciación megacariocíticos en células UCB-CD34⁺. Las células UCB-CD34⁺ infectadas con las distintas construcciones del pLVTHM (Luciferasa, 74/75, 76/77 y 78/79) fueron diferenciadas por tratamiento con TPO 100 ng/ml durante 7 días. (A) Los histogramas muestran la media \pm desviación estándar de la proporción de células dobles positivas $CD61^+/CD41^+$ y de la proporción de células $CD42b^+$. (B) Los histogramas muestran la media \pm desviación estándar de los niveles de los tres marcadores megacariocíticos (CD41, CD61 y CD42b). En ambos casos los valores observados fueron normalizados con respecto a los observados en las células control infectadas con la secuencia destinada a interferir la luciferasa. Se llevaron a cabo 2 experimentos diferentes con cada una de las secuencias (74/75, 76/77 y 78/79).

Estos últimos resultados junto con los resultados obtenidos mediante el empleo de inhibidores químicos de la actividad NADPH oxidasa, y los obtenidos

mediante la interferencia de p22^{phox} en líneas celulares, sugieren que una o más NADPH oxidasas serían las responsables de la producción de ROS necesaria para la diferenciación megacariocítica tanto de las líneas celulares como de las células humanas CD34⁺. Asimismo, lo anterior sugiere que los ROS producidos en respuesta a la actividad de una NADPH oxidasa dependiente de p22^{phox}, podrían ser importantes en el fenómeno de megacariopoyesis *in vivo*.

En resumen, se siguieron dos aproximaciones experimentales con el fin de determinar la implicación de una NADPH oxidasa en el proceso de la diferenciación megacariocítica: 1) tratamiento de las células con inhibidores químicos de la actividad NADPH oxidasa (DPI y apocinina) y 2) experimentos de ARN de interferencia para p22^{phox}. Como las NADPH oxidasas parecen estar implicadas en la producción de ROS en respuesta a la citoquina GM-CSF (Zhu et al, 2006), podría ser que la producción de ROS a través de la actividad NADPH oxidasa fuera un mecanismo común para todas las citoquinas hematopoyéticas. Por lo tanto, sería interesante averiguar si las distintas citoquinas señalizan a través de diferentes NADPH oxidasas o no.

3. ANÁLISIS DE LAS PRINCIPALES RUTAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA DIFERENCIACIÓN MEGACARIOCÍTICA Y SU REGULACIÓN POR ROS.

También hemos investigado cuál podría ser el papel específico de los ROS en el proceso de diferenciación megacariocítica. Ya que los ROS afectan a las rutas de señalización tanto de manera directa como de manera indirecta, en primer lugar analizamos las principales rutas de señalización activadas durante este proceso de diferenciación. Jacquet *et al.* describieron en el año 2006 que la activación de las rutas de señalización de ERK1/2 y JNK junto con la inhibición de la ruta de la MAP quinasa p38, mediada por la PKC, era fundamental para la diferenciación megacariocítica de las células K562 (Jacquet, 2006). En el presente estudio no nos hemos limitado a estudiar las rutas de señalización activadas durante la diferenciación de células K562 en respuesta a PMA, sino que también hemos estudiado las rutas que se activan en células HEL en respuesta a PMA y TPO.

Comprobamos la fosforilación, y en consecuencia la activación, de ERK y JNK en ambas líneas celulares en respuesta PMA (Figura IV-33).

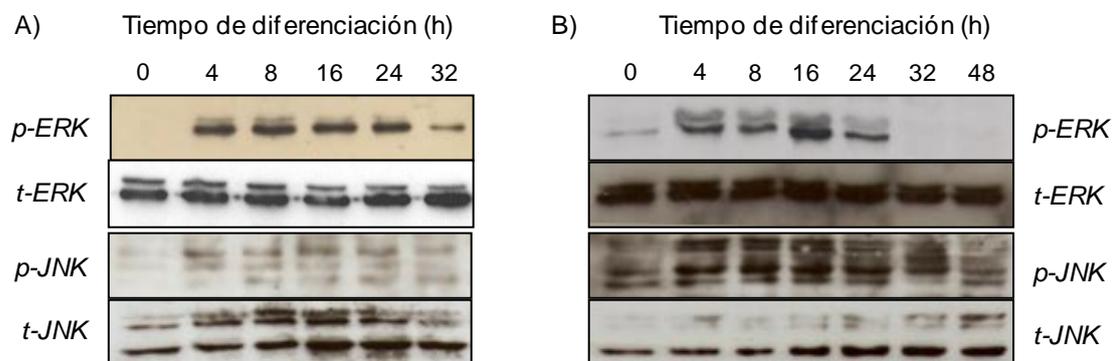


Fig. IV-33. Análisis de las rutas de señalización activadas en células K562 y HEL en respuesta a PMA. Las células K562 (A) y HEL (B) se estimularon con PMA 20 nM. Se recogieron muestras a distintos tiempos de inducción con PMA y se analizó la expresión de la forma activa/fosforilada de ERK y JNK mediante transferencia de Western utilizando anticuerpos específicos. Se cargaron 30 µg de proteína por carril. Las mismas membranas se sometieron a eliminación de los anticuerpos unidos y rehibridación con los anticuerpos correspondientes a las formas totales de dichas proteínas como control de carga.

Sin embargo, no fuimos capaces de detectar la activación de AKT en respuesta a este tratamiento en ninguna de las líneas celulares empleadas. Teniendo en cuenta que las células HEL presentan en superficie el receptor para la TPO (Salgado et al, 1995), decidimos estudiar si este tratamiento en células HEL era capaz de inducir la activación de AKT. Así comprobamos que la

inducción con TPO en esta línea celular era capaz no sólo de activar a AKT, sino que también los factores de transcripción STAT3 y STAT5 resultaban fosforilados/activados (Figura IV-34).

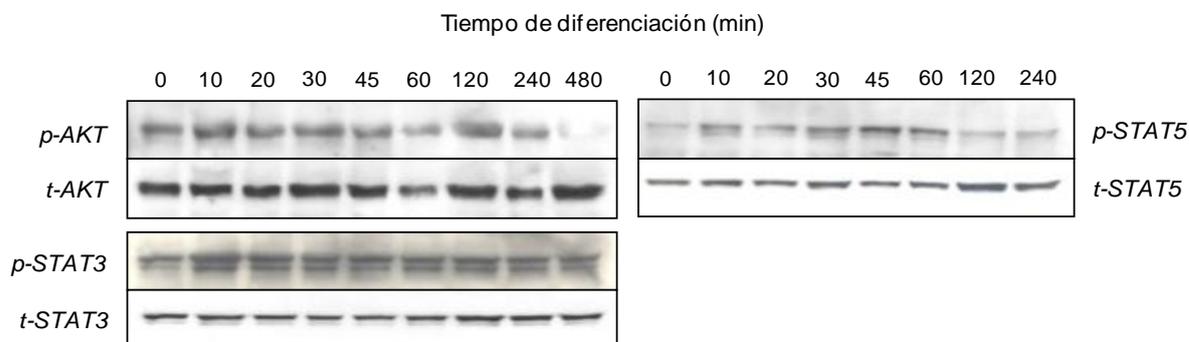


Fig. IV-34. Análisis de las rutas de señalización activadas en células HEL en respuesta a TPO. Las células HEL se estimularon con TPO 100 ng/ml. Se recogieron muestras a distintos tiempos de inducción con TPO y se analizó la expresión de la forma activa/fosforilada de AKT, STAT3 y STAT5 mediante transferencia de Western utilizando anticuerpos específicos. Se cargaron 30 µg de proteína por carril. Las mismas membranas se sometieron a eliminación de los anticuerpos unidos y posterior rehibridación con los anticuerpos correspondientes a las formas totales de dichas proteínas como control de carga.

Por lo tanto, las rutas de señalización que se activan durante la megacariopoyesis son: la ruta de las MAP quinasas ERK y JNK, la ruta PI3K/AKT y la ruta JAK/STAT.

3.1. Análisis de las rutas de señalización importantes en la megacariopoyesis de células K562 y HEL mediante el empleo de inhibidores específicos.

Con el fin de determinar la contribución de cada una de estas rutas de señalización a la diferenciación megacariocítica, llevamos a cabo experimentos de diferenciación en las líneas celulares en presencia o ausencia de inhibidores específicos (Tabla IV-4). En células K562 se comprobó que el tratamiento con el inhibidor de MEK (U0126) y el tratamiento con el inhibidor de AKT (AKT inhibitor X.) dificultaba la diferenciación megacariocítica. Se observó también un efecto del inhibidor de JNK (SP600125) y del inhibidor de JAK2 (AG490), aunque este efecto quedó restringido únicamente a alguno de los marcadores analizados. Finalmente, no se detectó ningún efecto sobre la expresión de los marcadores de diferenciación megacariocíticos en células K562 cuando se empleó el inhibidor de PI3K (LY294002). Sin embargo, sí se comprobó que el tratamiento de las células con este inhibidor prevenía la disminución de los niveles de GpA que típicamente acompaña a la diferenciación megacariocítica.

Tabla IV-4. Análisis del efecto de los inhibidores de las rutas de señalización sobre la expresión de marcadores de diferenciación en células K562.

TRATAMIENTO	CD42b	CD41	CD61	GpA
PMA	1,55±0,05 ⁺⁺⁺	2,15±0,32 ⁺⁺⁺	61,12±4,30 ⁺⁺⁺	0,64±0,07 ⁺⁺⁺
U0126+PMA	1,04±0,51	0,99±0,06 ^{***}	3,50±1,44 ^{***}	0,49±0,17
LY294002+PMA	1,52±0,03	1,89±0,17	34,50±29,59	1,49±0,02 ^{***}
AKT Inh.X+PMA	1,09±0,27	1,55±0,21 [*]	14,65±1,12 ^{***}	1,15±0,12 ^{***}
SP600125+PMA	1,12±0,07	1,87±0,26	31,18±19,61 [*]	1,98±0,08 ^{***}
AG490+PMA	1,35±0,13	1,32±0,05 ^{**}	5,38±1,49 ^{***}	0,62±0,33

Las células K562 se trataron con PMA 20 nM durante 48 horas en presencia o ausencia de U0126 10 μ M, LY294002 10 μ M, AKT Inh.X 10 μ M, SP600125 10 μ M o AG490 50 μ M. Los resultados muestran el número de veces de inducción en la expresión de los marcadores megacariocíticos (CD42b, CD41 y CD61) y el marcador eritrocítico (GpA) con respecto a las células control. Para las células diferenciadas con PMA, se utilizaron como células control células tratadas con el vehículo (DMSO) diluido 10⁵ veces. En el caso de las células tratadas con PMA+inhibidores, se utilizaron como células control células tratadas con DMSO+inhibidores. Los resultados son la media aritmética \pm la desviación estándar de 4 experimentos diferentes. +++ $p < 0,001$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con PMA y las células tratadas con DMSO. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con PMA+inhibidores y las células tratadas sólo con PMA.

En el caso de las células HEL, también el tratamiento con los inhibidores de MEK y AKT produjo el efecto más claro sobre la diferenciación megacariocítica, de tal modo que ambos tratamientos consiguieron reducir de forma significativa los niveles de los tres marcadores megacariocíticos estudiados. Además, el tratamiento con el inhibidor de MEK consiguió prevenir la disminución de los niveles de GpA que típicamente acompaña a la diferenciación megacariocítica. Al igual que describimos para las células K562, en células HEL se detectó también un efecto sutil sobre los niveles de expresión de los marcadores analizados cuando la células se trataron con el inhibidor de JNK o con el inhibidor de JAK2. Finalmente, no se observó ningún efecto sobre la diferenciación megacariocítica de células HEL cuando se empleó el inhibidor de PI3K (Tabla IV-5).

Estos resultados ponen de manifiesto que la ruta de señalización más importante en la diferenciación megacariocítica es la ruta de las MAP quinasas MEK/ERK, de tal modo que el empleo del inhibidor de MEK prácticamente inhibía por completo la diferenciación megacariocítica mediada por PMA en ambas líneas celulares (Tablas IV-4 y IV-5). La ruta de AKT también jugaría un papel importante en la diferenciación megacariocítica. Sin embargo, considerando los resultados del inhibidor de PI3K, parece que la activación de AKT durante este proceso

podría ser independiente de PI3K. Finalmente, las rutas de señalización de JNK y de JAK/STATs estarían implicadas en este proceso sólo de forma parcial.

Tabla IV-5. Análisis del efecto de los inhibidores de las rutas de señalización sobre la expresión de marcadores de diferenciación en células HEL.

TRATAMIENTO	CD42b	CD41	CD61	GpA
PMA	2,18±0,06 ⁺⁺⁺	2,10±0,27 ⁺⁺⁺	4,09±0,41 ⁺⁺⁺	0,33±0,10 ⁺⁺⁺
U0126+PMA	0,84±0,01 ^{***}	1,09±0,11 ^{***}	3,21±0,21 ^{**}	0,71±0,19 [*]
LY294002+PMA	1,88±0,01	2,27±0,55	3,72±0,49	0,27±0,05
AKT Inh.X+PMA	1,69±0,01 ^{***}	1,39±0,21 ^{**}	1,48±0,11 ^{***}	0,28±0,06
SP600125+PMA	2,17±0,04	1,59±0,38	3,08±0,03 ^{**}	0,78±0,18 ^{**}
AG490+PMA	1,84±0,32	2,08±0,04	1,93±0,35 ^{***}	0,72±0,12 ^{**}

Las células HEL se trataron con PMA 20 nM durante 48 horas en presencia o ausencia de U0126 10 µM, LY294002 10 µM, AKT Inh.X 10 µM, SP600125 10 µM o AG490 50 µM. Los resultados muestran el número de veces de inducción en la expresión de los marcadores megacariocíticos (CD42b, CD41 y CD61) y el marcador eritrocítico (GpA) con respecto a las células control. Para las células diferenciadas con PMA, se utilizaron como células control células tratadas con el vehículo (DMSO) diluido 10⁵ veces. En el caso de las células tratadas con PMA+inhibidores, se utilizaron como células control células tratadas con DMSO+inhibidores. Los resultados son la media aritmética ± la desviación estándar de 4 experimentos diferentes. ⁺⁺⁺ $p < 0,001$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con PMA y las células tratadas con DMSO. ^{***} $p < 0,001$; ^{**} $p < 0,01$; ^{*} $p < 0,05$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con PMA+inhibidores y las células tratadas sólo con PMA.

Posteriormente analizamos la viabilidad y la proliferación celular en K562 y HEL en presencia o ausencia de los diferentes inhibidores de las rutas de señalización.

En células K562 se manifestó un efecto sobre la viabilidad celular con dos de los inhibidores utilizados (el inhibidor de MEK y el inhibidor de AKT). Concretamente, se comprobó que el tratamiento de las células K562 con el inhibidor de MEK producía un incremento significativo en la viabilidad celular (Figura IV-35A). Sin embargo, con el inhibidor de AKT se constató el efecto opuesto, de tal modo que el tratamiento con este inhibidor produjo un claro descenso en la viabilidad celular (Figura IV-35A). Sin embargo, ninguno de los inhibidores empleados producía efecto sobre la proliferación celular (Figura IV-35B).

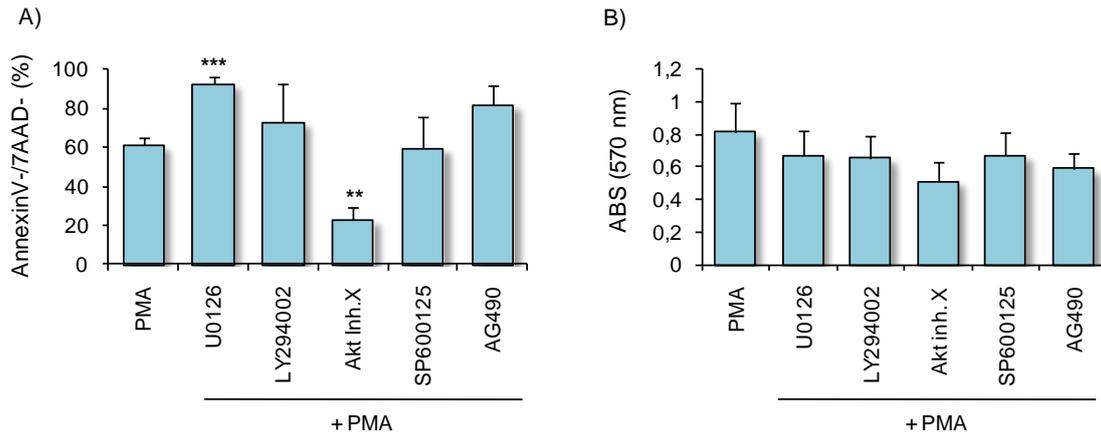


Fig. IV-35. Análisis del efecto de los diferentes inhibidores de las rutas de señalización sobre la viabilidad y la proliferación celular en células K562. Las células K562 se trataron con PMA 20 nM durante 48 horas en presencia o ausencia de U0126 10 μ M, LY294002 10 μ M, AKT Inh.X 10 μ M, SP600125 10 μ M o AG490 50 μ M. (A) La viabilidad celular se analizó mediante el marcado de las células con AnexinaV/7AAD. Los resultados son la media aritmética \pm la desviación estándar del porcentaje de células viables (AnexinaV-7AAD-) de 3 experimentos diferentes. (B) La proliferación celular se analizó mediante el ensayo del MTT. Los resultados son la media aritmética \pm la desviación estándar de 3 experimentos diferentes. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; representan diferencias significativas en cuanto a la viabilidad o a la proliferación celular entre las células tratadas con PMA+inhibidores con respecto a las células tratadas únicamente con PMA.

En células HEL se detectó una clara disminución de la viabilidad celular en respuesta al tratamiento con el inhibidor de AKT (Figura IV-36A). Sobre la proliferación celular, sólo se manifestó un efecto con el inhibidor de JAK2. Por lo tanto, el tratamiento con este compuesto disminuye la capacidad de proliferación de las células HEL.

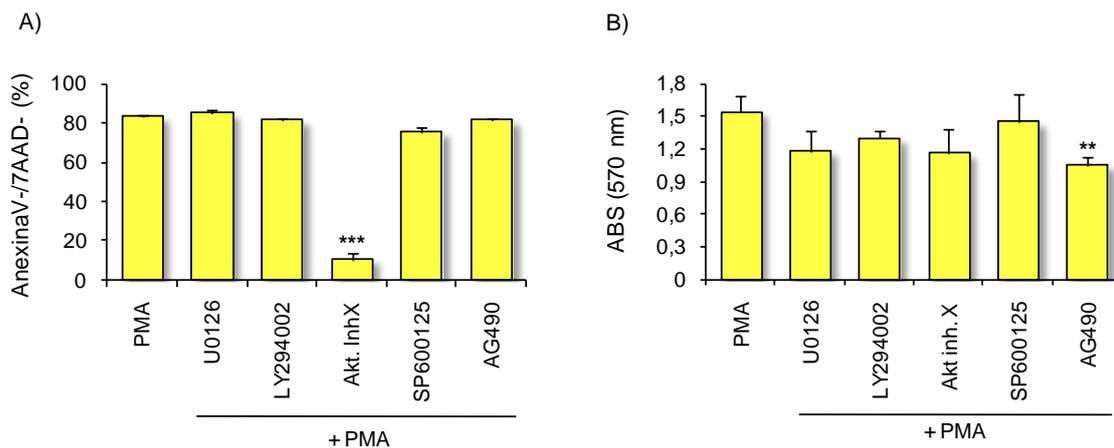


Fig. IV-36. Análisis del efecto de los diferentes inhibidores de las rutas de señalización sobre la viabilidad y la proliferación celular en células HEL. Las células HEL fueron tratadas con PMA 20 nM durante 48 horas en presencia o ausencia de U0126 10 μ M, LY294002 10 μ M, AKT Inh.X 10 μ M, SP600125 10 μ M o AG490 50 μ M. (A) La viabilidad celular fue analizada mediante el marcaje de las células con AnexinaV/7AAD. Los resultados son la media aritmética \pm la desviación estándar del porcentaje de células viables (AnexinaV-7AAD-) de 3 experimentos diferentes. (B) La proliferación celular fue analizada mediante el ensayo del MTT. Los resultados son la media aritmética \pm la desviación estándar de 3 experimentos diferentes. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

$p < 0,01$; representan diferencias significativas en cuanto a la viabilidad o a la proliferación celular entre las células tratadas con PMA+inhibidores con respecto a las células tratadas únicamente con PMA.

En conjunto, los resultados (obtenidos mediante el uso de los inhibidores de las rutas de señalización) nos permiten predecir que la ruta de las MAP quinasas MEK/ERK es la ruta fundamental implicada en la diferenciación megacariocítica, mientras que la ruta de señalización de AKT (independiente de PI3K) estaría implicada principalmente en la supervivencia celular (en función de los resultados obtenidos de los experimentos de viabilidad celular). La implicación del resto de rutas de señalización analizadas en la diferenciación megacariocítica de las líneas celulares sería secundaria o colateral.

3.2. Análisis de las rutas de señalización importantes en la megacariopoyesis de células CD34⁺ mediante el empleo de inhibidores específicos.

La TPO es probablemente la citoquina más importante en cuanto a su capacidad para mantener la diferenciación megacariocítica (Guerriero et al, 2006). La unión de la TPO a su receptor c-Mpl desencadena la activación de diferentes rutas de señalización: como la ruta JAK2/STAT, PI3K/AKT, MEK/ERK y la ruta de JNK (Abe, 2002).

En función de estos antecedentes decidimos estudiar el efecto de los inhibidores de las rutas de señalización empleados anteriormente en las líneas celulares sobre la diferenciación megacariocítica de células CD34⁺. Se aislaron células CD34⁺ de sangre periférica alcanzándose una pureza superior al 99% (Figura IV-37A). Una vez purificadas, las células CD34⁺ se sometieron a diferenciación megacariocítica por tratamiento con TPO 100 ng/ml en presencia o ausencia de los diferentes inhibidores de las rutas de señalización. Los resultados obtenidos fueron muy similares a los vistos en el caso de las líneas celulares (Figura IV-37B). La inhibición de MEK, AKT y JAK2 produjo una disminución significativa de los niveles de los marcadores megacariocíticos analizados. La inhibición de PI3K produjo un incremento significativo en los niveles de CD42b. Sin embargo, no se pudo observar ningún efecto de este tratamiento sobre los niveles de expresión de CD41 o CD61. Finalmente, la inhibición de JNK produjo un incremento significativo en los niveles de todos los marcadores analizados.

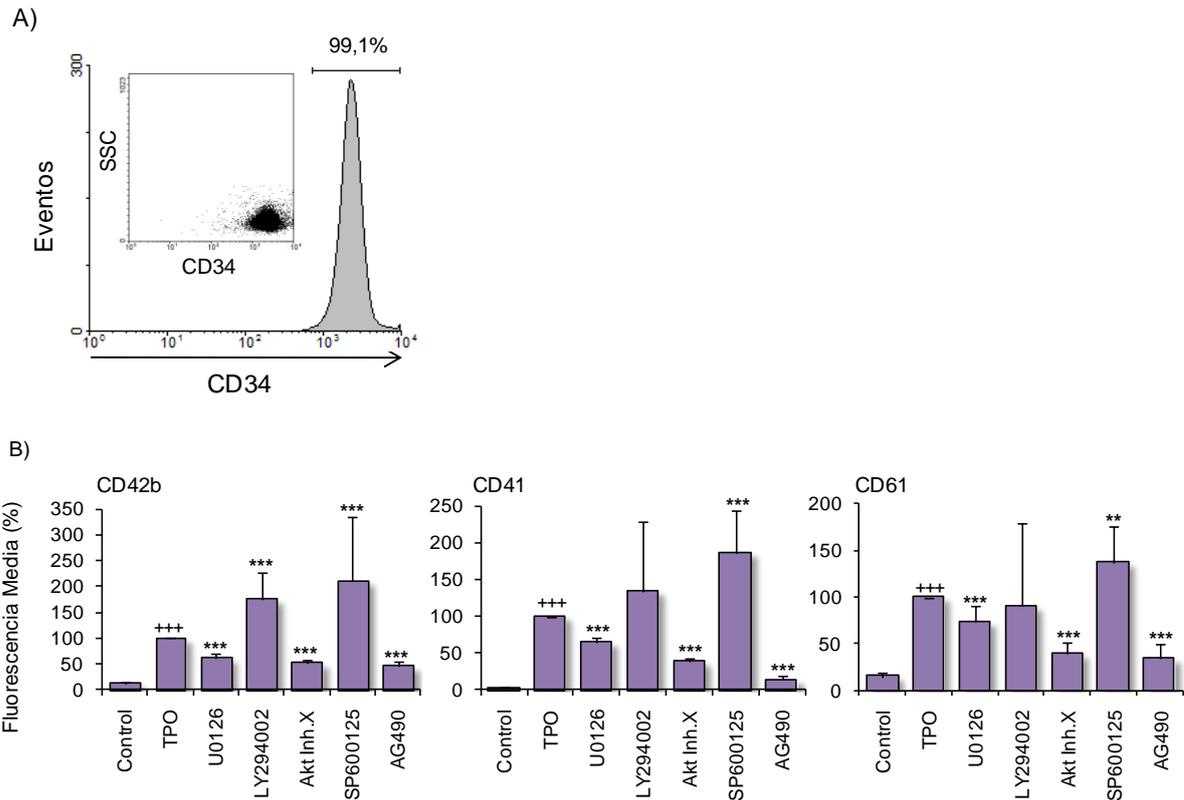


Fig. IV-37. Análisis del efecto de los inhibidores de las rutas de señalización sobre la expresión de marcadores de diferenciación megacariocítica en células CD34⁺. Las células humanas CD34⁺ se aislaron a partir de sangre periférica. (A) La pureza alcanzada para las CD34⁺ fue de alrededor del 99%. (B) Las células CD34⁺ se diferenciaron por tratamiento con TPO 100 ng/ml en presencia o ausencia de U0126 10 μ M, LY294002 10 μ M, AKT Inh.X 10 μ M, SP600125 10 μ M o AG490 50 μ M durante 7 días. Se muestra la media de los niveles de expresión de los marcadores megacariocíticos (CD42b, CD41 y CD61) \pm la desviación estándar de 4 experimentos diferentes normalizados a TPO. +++ $p < 0,001$ representan diferencias significativas cuando se comparan las células diferenciadas con TPO con respecto a las células no diferenciadas. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ representan diferencias significativas cuando se comparan células diferenciadas con TPO+inhibidores con células diferenciadas sólo con TPO.

Los mismos efectos de los inhibidores sobre la diferenciación megacariocítica de células CD34⁺ analizados mediante la valoración de los marcadores de diferenciación, también se manifestaron cuando se analizó la morfología celular. Así, el incremento de tamaño celular que típicamente acompaña a la diferenciación megacariocítica detectó cuando las células se diferenciaron en presencia de los inhibidores de MEK o de AKT. Sin embargo, la inhibición de JNK no produjo ningún efecto sobre el tamaño celular (Figura IV-38).

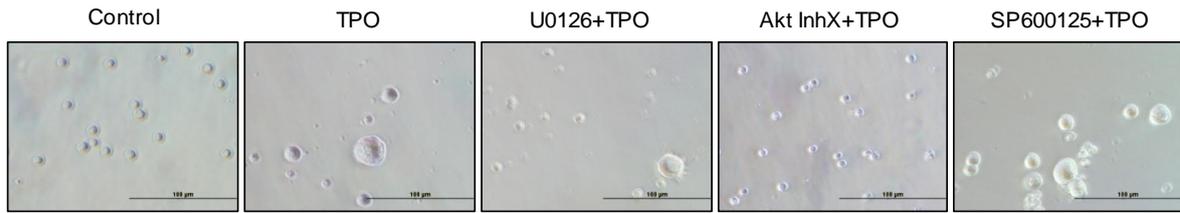


Fig. IV-38. Análisis morfológico del efecto de diferentes inhibidores de rutas de señalización sobre la diferenciación megacariocítica. Las células CD34⁺ se diferenciaron por tratamiento con TPO 100 ng/ml en presencia o ausencia de U0126 10 µM, AKT Inh.X 10 µM o SP600125 10 µM. Se realizaron fotografías de las células CD34⁺ con los diferentes tratamientos. El aumento final de las imágenes es de 40 veces.

Los datos obtenidos mediante el empleo de estos inhibidores tanto en las líneas celulares como en las células CD34⁺ apoyan fuertemente la idea de la importancia de la ruta de las MAP quinasas en megacariopoyesis (Whalen, 1997). La inhibición de MEK evitaba la diferenciación megacariocítica de una manera casi total en todos los tipos celulares estudiados. Un efecto muy similar se detectó cuando se inhibió AKT y JAK2. En cuanto a la implicación de JNK en la diferenciación, en un estudio previo se describió que era necesaria una activación mínima de JNK para que se llevase a cabo la diferenciación megacariocítica de células K562, aunque también se comprobó que una activación excesiva de esta proteína puede tener efectos negativos sobre la diferenciación (Jacquel, 2006). En función del débil efecto que hemos observado mediante el uso del inhibidor de JNK sobre la diferenciación, en función de nuestros datos, JNK podría estar llevando a cabo un efecto en este proceso pero este efecto nunca sería tan importante como el observado para ERK o AKT. En cuanto a la ruta de PI3K/AKT Jacquel *et al.* señalaron en su estudio, anteriormente mencionado, que no está implicada en la diferenciación megacariocítica de las células K562 (Jacquel, 2006). Sin embargo, en trabajos posteriores se relaciona esta ruta con el proceso de endomitosis en células CD34⁺ (Guerriero, 2006). Nosotros comprobamos aquí, mediante el uso de inhibidores específicos, que mientras que la inhibición de PI3K no tiene prácticamente ningún efecto sobre la diferenciación, la inhibición de AKT produce a su vez una fuerte inhibición de la diferenciación en todos los tipos celulares estudiados. Por lo tanto, es probable que la activación de AKT en el proceso de diferenciación megacariocítica no fuera dependiente de PI3K.

3.3. Los ROS derivados de la actividad de una NADPH oxidasa dependiente de p22^{phox} son necesarios para la completa activación de las rutas de señalización que desencadenan la diferenciación megacariocítica.

Una vez determinadas las principales rutas de señalización implicadas en la diferenciación megacariocítica, investigamos si estas rutas podrían estar de algún modo reguladas por ROS. Para probar esta hipótesis analizamos estas rutas de señalización en presencia o ausencia de DPI.

En primer lugar analizamos el efecto del DPI sobre las rutas de señalización activadas por PMA. Así, comprobamos que la activación de ERK disminuía de manera significativa tanto en células K562 como en células HEL en presencia de DPI (Figura IV-39A y IV-39B). Además, en células se reveló que el tratamiento con DPI dificultaba también la activación mediada por PMA de los factores de transcripción STAT3 y STAT5 (Figura IV-39B).

Anteriormente en este trabajo hemos descrito que en células HEL las rutas de AKT y STAT3/STAT5 se activan en respuesta a TPO (Figura IV-24). Cuando la inducción de estas células con TPO se llevó a cabo en presencia de DPI, ambas rutas de señalización disminuyeron significativamente (Figura IV-40).

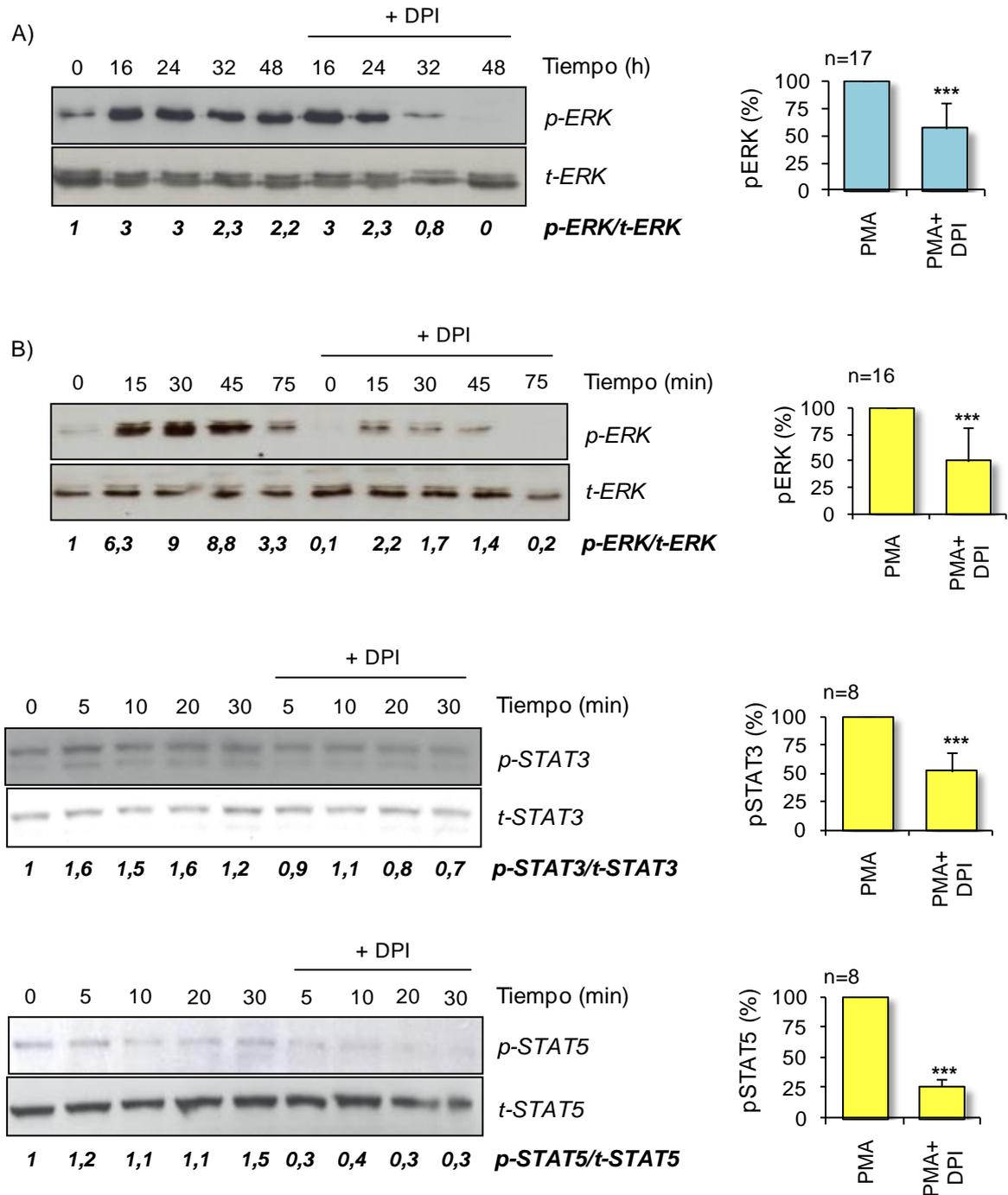


Fig. IV-39. Análisis del efecto de los ROS derivados de una NADPH oxidasa sobre las rutas de señalización activadas en células K562 y HEL en respuesta a PMA. Las células K562 y HEL se estimularon con PMA 20 nM en presencia o ausencia de DPI 5 μ M. Se recogieron muestras a distintos tiempos de inducción con PMA+/-DPI. (A) En células K562 se analizó la expresión de la forma activa/fosforilada de ERK mediante transferencia de Western utilizando anticuerpos específicos. (B) En células HEL se analizó la expresión de la forma activa/fosforilada de ERK, STAT3 y STAT5 mediante transferencia de Western utilizando anticuerpos específicos. Se cargaron 30 μ g de proteína por carril. Las mismas membranas se sometieron a eliminación de los anticuerpos unidos y rehibridación con los anticuerpos correspondientes a las formas totales de dichas proteínas como control de carga. Los histogramas muestran la media \pm la desviación estándar del porcentaje de activación para las distintas proteínas analizadas. *** $p < 0,001$ representan diferencias significativas en cuanto al porcentaje de activación de las distintas proteínas analizadas cuando se comparan células estimuladas con PMA+DPI con respecto a células estimulas sólo con PMA.

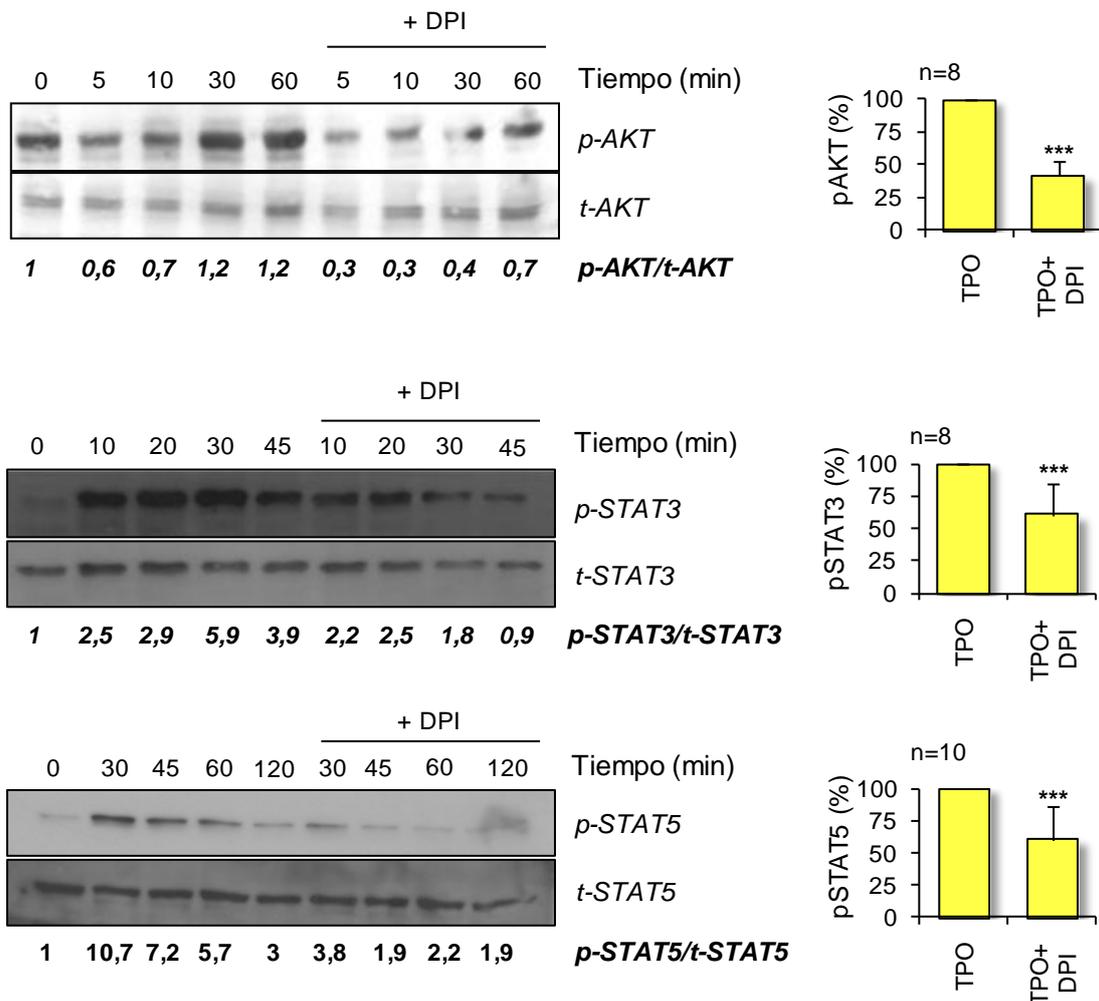


Fig. IV-40. Análisis del efecto de los ROS derivados de una NADPH oxidasa sobre las rutas de señalización activadas en células HEL en respuesta a TPO. Las células HEL se estimularon con TPO 100 ng/ml en presencia o ausencia de DPI μ M. Se recogieron muestras a distintos tiempos de inducción con TPO+/-DPI y se analizó la expresión de la forma activa/fosforilada de AKT, STAT3 y STAT5 mediante transferencia de Western utilizando anticuerpos específicos. Se cargaron 30 μ g de proteína por carril. Las mismas membranas se sometieron a eliminación de los anticuerpos unidos y rehibridación con los anticuerpos correspondientes a las formas totales de dichas proteínas como control de carga. Los histogramas muestran la media \pm la desviación estándar del porcentaje de activación para las distintas proteínas analizadas. *** $p < 0,001$ representan diferencias significativas en cuanto al porcentaje de activación de las distintas proteínas analizadas cuando se comparan células estimuladas con TPO+DPI con respecto a células estimulas sólo con TPO.

Finalmente, se analizó la activación de estas rutas de señalización en células K562 y HEL en las que se había interferido p22^{phox}. Comprobamos una disminución significativa en la activación de ERK, AKT y STAT5 en las células donde se había reducido la expresión de p22^{phox} y por lo tanto con una actividad NADPH oxidasa disminuida (Figura IV-41).

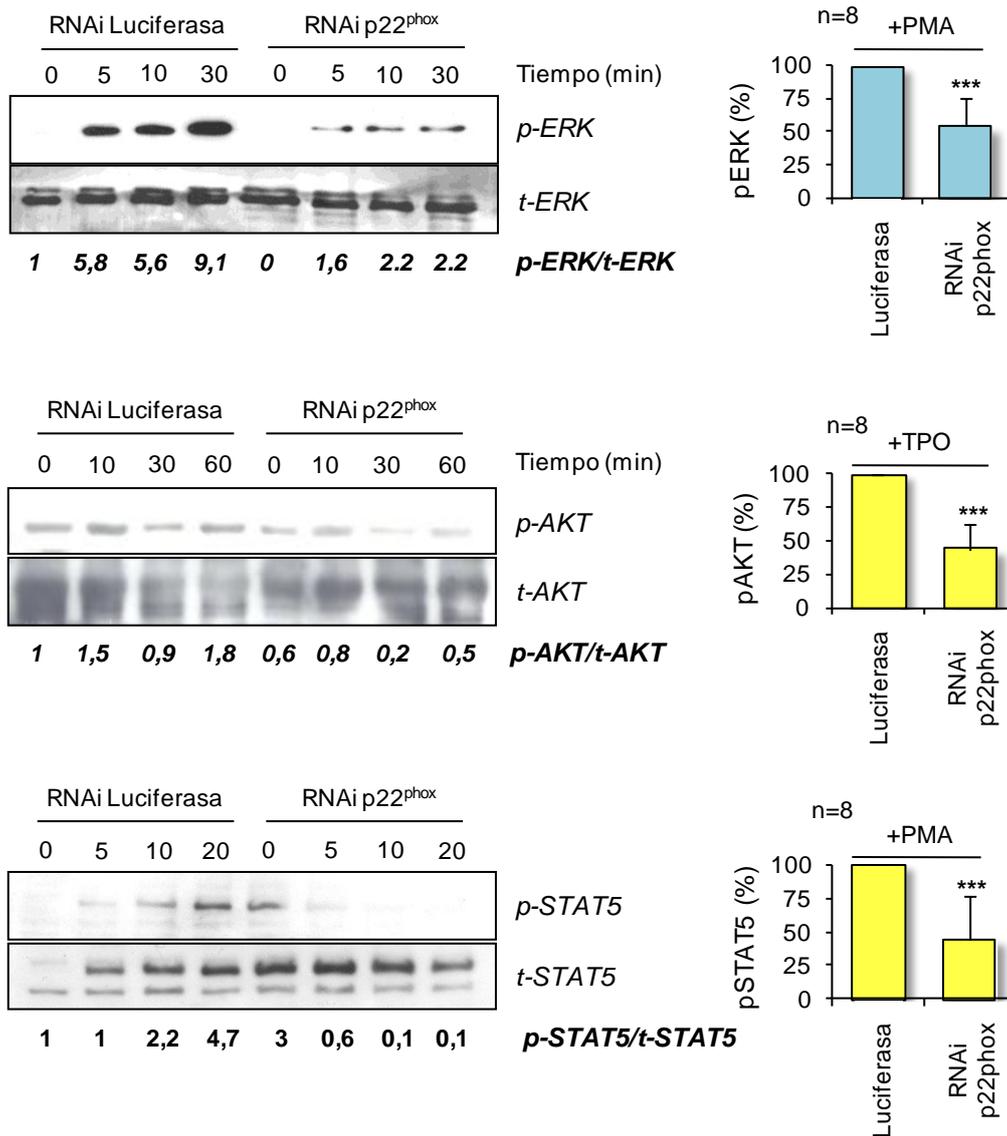


Fig. IV-40. Análisis del efecto de los ROS derivados de una NADPH oxidasa sobre las rutas de señalización activadas en células donde se había interferido la expresión de p22^{phox}. Las células K562 y HEL transfectadas con distintas construcciones del pSuper (pSuper Luc, pSuper 72/73, pSuper 74/75, pSuper 76/77 y pSuper 78/79) y seleccionadas durante 14 días con G418 se estimularon con PMA 20 nM o TPO 100 ng/ml. Se recogieron muestras a distintos tiempos de inducción y se analizó la expresión de la forma activa/fosforilada de ERK, AKT y STAT5 mediante transferencia de Western utilizando anticuerpos específicos. Se cargaron 30 µg de proteína por carril. Las mismas membranas se sometieron a eliminación de los anticuerpos unidos y rehibridación con los anticuerpos correspondientes a las formas totales de dichas proteínas como control de carga. Los histogramas muestran la media ± la desviación estándar del porcentaje de activación para las distintas proteínas analizadas. *** $p < 0,001$ representan diferencias significativas en cuanto al porcentaje de activación de las distintas proteínas analizadas cuando se comparan células estimuladas con PMA/TPO+DPI con respecto a células estimulas sólo con PMA/TPO.

Mediante análisis cuantitativos se comprobó que la activación de todas las rutas de señalización importantes para la diferenciación megacariocítica estaba disminuida en presencia de DPI o en células en las cuales se había interferido la

expresión de p22^{phox}. Estos resultados nos permiten proponer que la producción de ROS a través de una NADPH oxidasa dependiente de p22^{phox} es necesaria para la activación completa de las rutas de señalización importantes para la diferenciación megacariocítica. Por lo tanto, los ROS podrían estar actuando aguas arriba de todas estas rutas de señalización. Sin embargo, también es posible la existencia de un mecanismo tipo bucle de retroalimentación. Así, el ensamblaje de los diferentes componentes de la(s) NADPH oxidasa(s) implicadas en la diferenciación podría estar bajo el control de algunas de las rutas de señalización activadas durante el proceso y la subsecuente producción de ROS tendría un efecto positivo produciendo la activación completa de las cascadas de señalización. En este sentido es importante destacar que el ensamblaje del complejo NADPH oxidasa de la NOX2 depende de la fosforilación de p47^{phox}, lo cual permite a esta subunidad interactuar con p22^{phox} (Bedard y Krause, 2007). Se ha descrito que p47^{phox} se fosforila en respuesta a distintas quinasas entre las que se encuentran PKC, PKA, ERK1/2, la quinasa activada p21 (PAK del inglés "p21 activated Kinase"), AKT o la quinasa Src (El Benna et al, 2009). Algunas de estas quinasas son importantes para la megacariopoyesis. Por lo tanto, es tentador especular con la posibilidad de que el ensamblaje de las NADPH oxidasas en la superficie celular podría ser dependiente de la activación de alguna de las rutas de señalización implicadas en este proceso de diferenciación.

La activación de diferentes rutas de señalización en respuesta a ROS ha sido descrita previamente (Iiyama *et al.*, 2006). Sin embargo, el mecanismo molecular mediante el cual se lleva a cabo esta activación sigue sin conocerse completamente. Los ROS son capaces de activar cascadas de señalización dependiendo del contexto. Así, por ejemplo, la producción de ROS en respuesta a G-CSF se ha relacionado con la activación de AKT pero no con la activación de ERK (Zhu, 2006), mientras que en nuestro sistema, los ROS parecen estar implicados en la activación de ambas rutas. Por lo tanto, conocer cómo la señalización por ROS es capaz de producir estos efectos específicos es una cuestión de gran interés. Una posibilidad sería que la diferente compartimentalización de las NADPH oxidasas activaría diferentes señales (Ushio-Fukai, 2009). Otra posibilidad es que las dianas moleculares de los ROS fueran distintas dependiendo de la situación. Una de las hipótesis más aceptadas sobre el mecanismo de acción de los ROS es la inhibición de las fosfatasa

encargadas de la regulación de las rutas de señalización. En este sentido, recientemente se ha visto que la inhibición de PP1 α por ROS conlleva la activación constitutiva de la ruta PI3K/AKT en células leucémicas (Naughton et al, 2009).

4. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD PTPásica A LO LARGO DE LA DIFERENCIACIÓN MEGACARIOCÍTICA.

La diferenciación de los progenitores hematopoyéticos hacia la línea megacariocítica es un proceso complejo, aún no bien entendido, que en la actualidad está recibiendo mucha atención (Zheng et al, 2008). Los procesos de fosforilación y desfosforilación en residuos de tirosina son fundamentales para que se lleve a cabo la diferenciación. Sin embargo, a pesar de que estos procesos están regulados por PTKs y PTPs, la mayor atención se ha dirigido siempre a las quinasas y no a las fosfatasas (Avraham y Price, 1999). No obstante, la implicación de las PTPs en la diferenciación hematopoyética parece clara, puesto que la expresión de determinadas PTPs se induce durante el proceso de diferenciación, como por ejemplo SHP-1 (Bruecher-Encke et al, 2001) y PTP-RO (Taniguchi et al, 1999). Sin embargo, hemos de destacar que esto no es un fenómeno común a todas las PTPs, ya que se ha descrito que la expresión de SHP-2 y PTP1B permanece constante durante la diferenciación a megacariocitos (Bruecher-Encke et al, 2001). Uno de los principales mecanismos mediante el cual se regula la actividad de las PTPs es la oxidación del residuo de cisteína indispensable para la catálisis de estas enzimas. La oxidación de proteínas y de otras macromoléculas se produce como consecuencia del incremento en los niveles de ROS, que tiene lugar en determinadas condiciones fisiopatológicas. Por esta razón nos decidimos a comenzar a estudiar las PTPs, ya que este grupo de proteínas podría actuar como una de las principales dianas moleculares de los ROS regulando la activación de determinadas rutas de señalización durante el proceso de diferenciación megacariocítica.

4.1. Dinámica de la actividad PTPásica durante la diferenciación megacariocítica.

Durante la megacariopoyesis se activan numerosas vías de señalización que conducen a la activación de gran número de quinasas (Avraham y Price, 1999). Por lo tanto, se podría esperar un incremento en la actividad PTK o lo que es lo mismo, un incremento de la fosforilación en tirosina de proteínas concretas. Nosotros hemos querido saber qué sucede durante este proceso con la actividad PTPásica (Fig IV-41). Para ello, las células K562 y HEL se han sometido a diferenciación megacariocítica mediante estimulación con PMA. En ambos casos observamos una dinámica similar aunque con ciertas particularidades. En el caso de las células K562 (Figura IV-41A) comprobamos un descenso brusco de la actividad una vez se activa la diferenciación que se mantiene durante las primeras

8 horas, para, a continuación, producirse un aumento sostenido de la actividad que lleva a un nivel de actividad superior al que se observa en células indiferenciadas. En el caso de las células HEL (Figura IV-41B) el perfil es similar, aunque en este caso observamos un descenso rápido seguido de un incremento de la actividad en torno a las 10 horas de diferenciación, para, posteriormente, producirse de nuevo un descenso seguido de un incremento sostenido, que finalmente conduce a niveles de actividad superiores a los que se ven en células indiferenciadas.

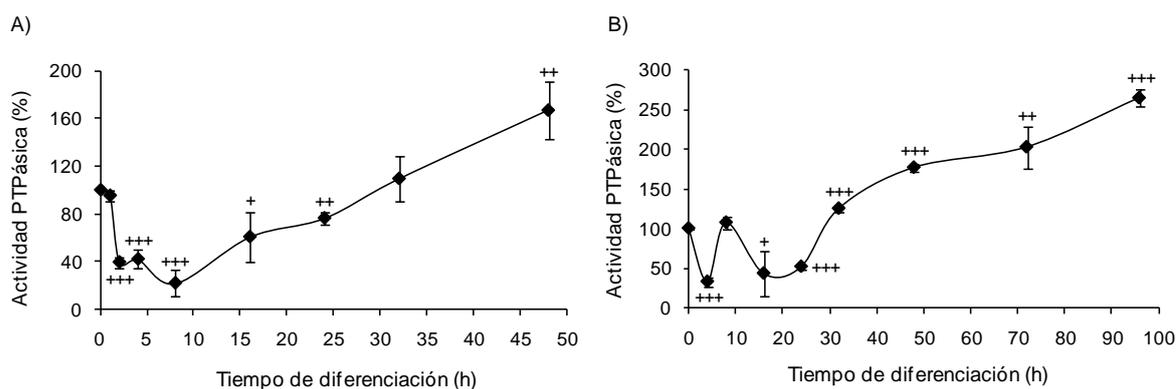


Fig. IV-41: Análisis de la actividad proteína tirosina fosfatasa de células K562 y HEL. Las células se diferenciaron con PMA 20 nM, recolectadas a diferentes tiempos en tampón RIPA y posteriormente fue evaluada su actividad PTPásica. (A) células K562; (B) células HEL. Los valores de actividad PTPásica se normalizaron con respecto a los valores observados en las células indiferenciadas. Los datos son la media del porcentaje de actividad \pm la desviación estándar de tres experimentos diferentes. +++ $p < 0,001$; ++ $p < 0,01$; + $p < 0,05$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con PMA y las células no tratadas.

Es posible que el descenso inicial en la actividad PTPásica sea necesario para facilitar la fosforilación de determinadas proteínas, comenzándose, de esta manera, el programa de diferenciación. Posteriormente, parece plausible que se necesite un aumento en la actividad PTPásica para que estas mismas proteínas se desfosforilen una vez hayan cumplido su función. Un efecto similar del PMA ya ha sido descrito con anterioridad en células mesangiales humanas (Kiyomoto et al, 1994) donde, al igual que en nuestro caso, se produce una inhibición de la actividad PTPásica a tiempos cortos de tratamiento (20-30 minutos).

La cinética de la actividad PTPásica en células K562 y HEL se puede correlacionar con los niveles de ROS intracelulares, ya que como hemos descrito anteriormente, a tiempos cortos de inducción con PMA se produce un incremento rápido y significativo de los ROS en ambas líneas (Figuras IV-1 y IV-2). Este incremento de ROS se podría traducir en un descenso en la actividad PTPásica a tiempos cortos. Posteriormente, los niveles de ROS vuelven a los niveles basales

en ambas líneas celulares a la vez que se observa un incremento en la actividad PTPásica que llega incluso a superar los niveles basales. Además, en células HEL observamos un incremento de los ROS a tiempos largos de diferenciación, concretamente a partir de las 16 horas de inducción con PMA, lo cual coincide con el segundo descenso en la actividad PTPásica observado para estas células. Por lo tanto, la existencia del doble pico de ROS en células HEL podría explicar la cinética bifásica observada para la actividad PTPásica en esta línea celular.

4.2. Análisis del efecto de diferentes inhibidores de PTPs sobre la diferenciación megacariocítica.

Para comprobar si este descenso inicial de la actividad PTPásica era importante para la diferenciación, decidimos tratar las células con distintos inhibidores de dicha actividad y evaluar que sucedía con los parámetros de la diferenciación.

Uno de los inhibidores de la actividad de las PTPs más empleados es el **ortovanadato sódico** (Na_3VO_4). Este compuesto contiene en su estructura un grupo VO_4^{3-} que le permite actuar como un análogo del grupo fosfato, razón por la cual es capaz de unirse a los sitios activos de las proteína tirosina fosfatasas y por lo tanto, inhibir reversiblemente su actividad (Swarup et al, 1982). El tratamiento de las células K562 y HEL con distintas concentraciones de ortovanadato sódico produjo un débil efecto sobre la expresión de los marcadores de diferenciación típicamente estudiados (CD42b, CD61 y GpA). Únicamente se observó un efecto estadísticamente significativo sobre algunos de los marcadores cuando se emplearon las concentraciones más altas del inhibidor. Concretamente, cuando ambas líneas celulares fueron tratadas con ortovanadato a una concentración de 50 ó 100 μM se observó un incremento o una disminución sobre la expresión de CD42b y GpA respectivamente (Figura IV-42).

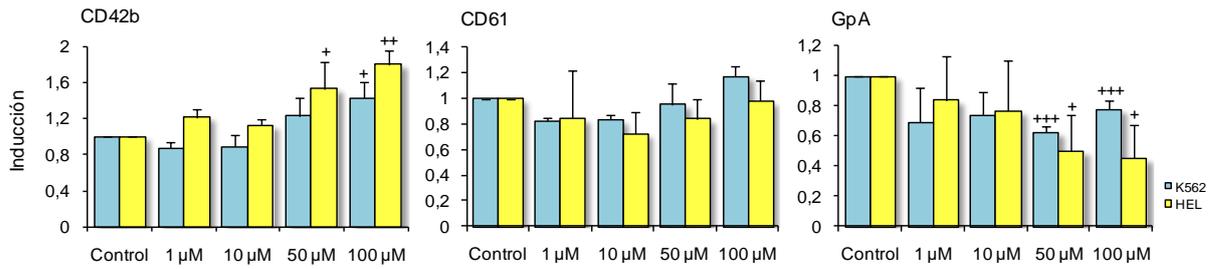


Fig. IV-42. Análisis del efecto del ortovanadato sódico sobre la diferenciación megacariocítica de células K562 y HEL. Las células K562 y HEL se trataron con distintas concentraciones de ortovanadato sódico durante 48 horas. Los histogramas muestran el número de veces de inducción en la expresión de los marcadores megacariocíticos (CD42b y CD61) y el marcador eritrocítico (GpA) con respecto a las células control no tratadas. Los datos son la media \pm la desviación estándar de tres experimentos diferentes. +++ $p < 0,001$; ++ $p < 0,01$; + $p < 0,05$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con ortovanadato sódico y las células no tratadas.

En función de estos resultados, no pudimos concluir que la inhibición de la actividad PTPásica por parte del ortovanadato sódico sea suficiente para inducir la diferenciación megacariocítica, ya que el efecto de este tratamiento era muy débil, sobre todo si se compara con el efecto del tratamiento con PMA (ver tablas IV-1 y IV-2). Por esta razón nos decidimos a estudiar el efecto de otro inhibidor de la actividad de las PTPs, el **peróxido de hidrógeno**. El mecanismo de acción del H_2O_2 consiste en la inhibición reversible o irreversible (lo cual depende de la concentración del compuesto) de la actividad de las PTPs como consecuencia de la oxidación reversible o irreversible del residuo de cisteína indispensable para la catálisis de estas enzimas. En ambas líneas celulares se pudo observar un incremento significativo de los niveles de CD42b a todos los tiempos estudiados. Sin embargo, sólo se pudo observar estimulación de la expresión de CD61 en células K562 tratadas con H_2O_2 y los niveles de GpA únicamente se redujeron con el tratamiento con H_2O_2 en células HEL (Figura IV-43).

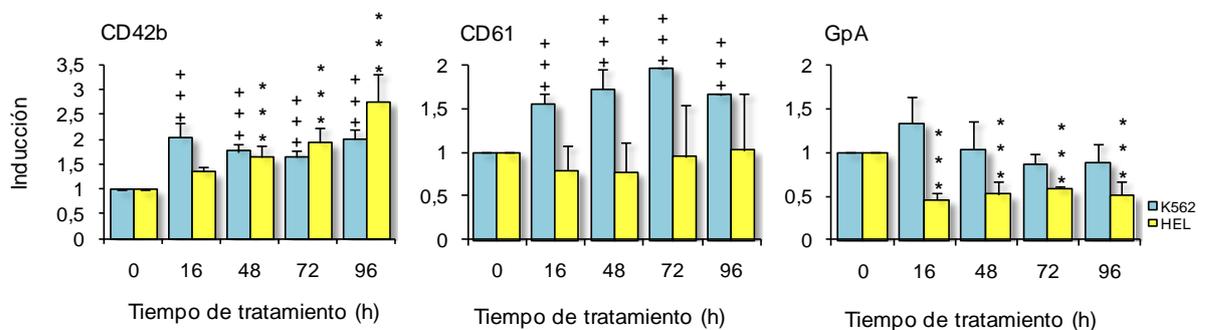


Fig. IV-43. Análisis del efecto del peróxido de hidrógeno sobre la diferenciación megacariocítica de células K562 y HEL. Las células K562 y HEL se trataron a distintos tiempos con H_2O_2 50 µM. Los histogramas muestran el número de veces de inducción en la expresión de los marcadores megacariocíticos (CD42b y CD61) y el marcador eritrocítico (GpA) con respecto a

las células control no tratadas. Los datos son la media \pm la desviación estándar de tres experimentos diferentes. +++ $p < 0,001$ representa diferencias significativas entre las células K562 tratadas con H_2O_2 y las células K562 no tratadas. *** $p < 0,001$ representa diferencias significativas entre las células HEL tratadas con H_2O_2 y las células HEL no tratadas.

El tratamiento con H_2O_2 produjo un efecto limitado a dos de los tres marcadores analizados en ambas líneas celulares. Además, a pesar de que se consigue con este compuesto una buena inducción de la expresión de CD42b, la expresión del marcador CD61 resulta muy débil si se compara con la observada cuando las células se diferencian con PMA (ver tablas IV-1 y IV-2). Sin embargo, comprobamos que la inhibición de la actividad de las PTPs mediante el tratamiento con H_2O_2 producía resultados más evidentes sobre la diferenciación que los observados previamente con el tratamiento con el ortovanadato sódico.

El **pervanadato** es un compuesto que resulta de la reacción entre ortovanadato sódico y peróxido de hidrógeno. El pervanadato actúa produciendo siempre la inhibición irreversible de la actividad de las PTPs como consecuencia de la oxidación irreversible del residuo de cisteína indispensable para la catálisis de estas enzimas (Huyer et al, 1997). Por lo tanto, la inhibición de la actividad PTPásica que se puede alcanzar mediante este tratamiento debería ser superior a la conseguida mediante el tratamiento con ortovanadato sódico o H_2O_2 . Cuando llevamos a cabo experimentos de diferenciación a distintas concentraciones de pervanadato pudimos observar que el tratamiento de las células K562 y HEL con este compuesto a una concentración igual o superior a $50 \mu M$ es suficiente para iniciar la diferenciación megacariocítica en ambas líneas celulares (Figura IV-43A y IV-43B). Así, el tratamiento con pervanadato a una concentración igual o superior a $50 \mu M$ produjo un fuerte incremento en la expresión en la superficie de las células K562 tanto de CD42b como de CD61, mientras que en células HEL este mismo tratamiento produjo aumento de ambos marcadores megacariocíticos y además se manifestó una disminución en la expresión del marcador eritrocítico GpA.

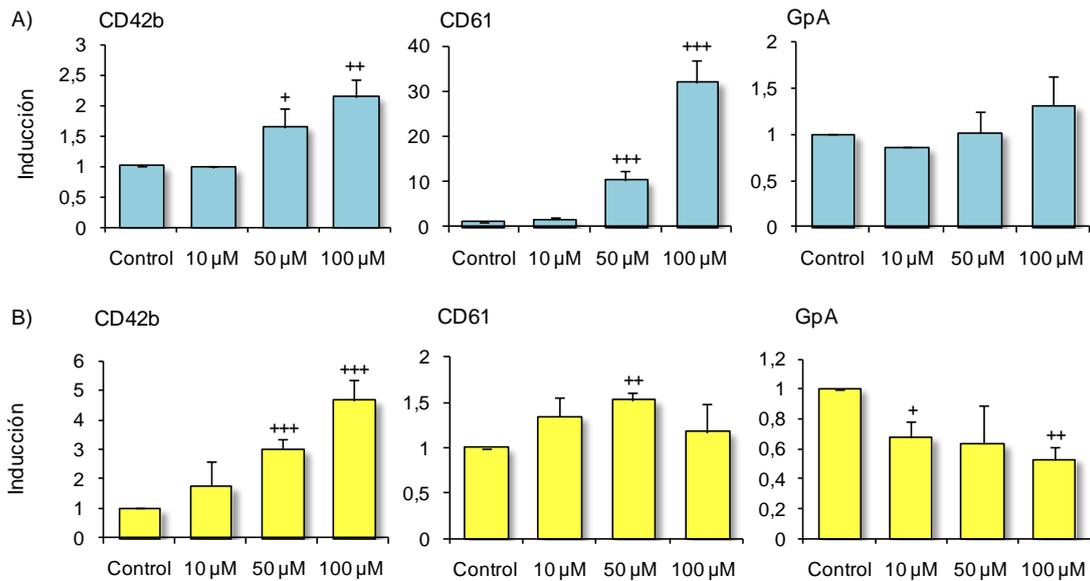


Fig. IV-43. Análisis del efecto del pervanadato sobre la diferenciación megacariocítica de células K562 y HEL. Las células K562 (A) y HEL (B) se trataron con distintas concentraciones de pervanadato durante 48 horas. Los histogramas muestran el número de veces de inducción en la expresión de los marcadores megacariocíticos (CD42b y CD61) y el marcador eritrocítico (GpA) con respecto a las células control no tratadas. Los datos son la media \pm la desviación estándar de tres experimentos diferentes. +++ $p < 0,001$; ++ $p < 0,01$; + $p < 0,05$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con ortovanadato sódico y las células no tratadas.

Por lo tanto, la inhibición de la actividad PTPásica por tratamiento de las células con pervanadato sódico era capaz en cierto modo de imitar el proceso de diferenciación megacariocítica de las líneas celulares inducida por PMA. Para corroborar este hecho, llevamos a cabo experimentos de diferenciación con pervanadato 50 μM a distintos tiempos y analizamos la expresión diferencial de los marcadores de superficie típicos comparando los resultados con los obtenidos del análisis de dichos marcadores cuando las células se diferenciaron con PMA 20 nM también a distintos tiempos.

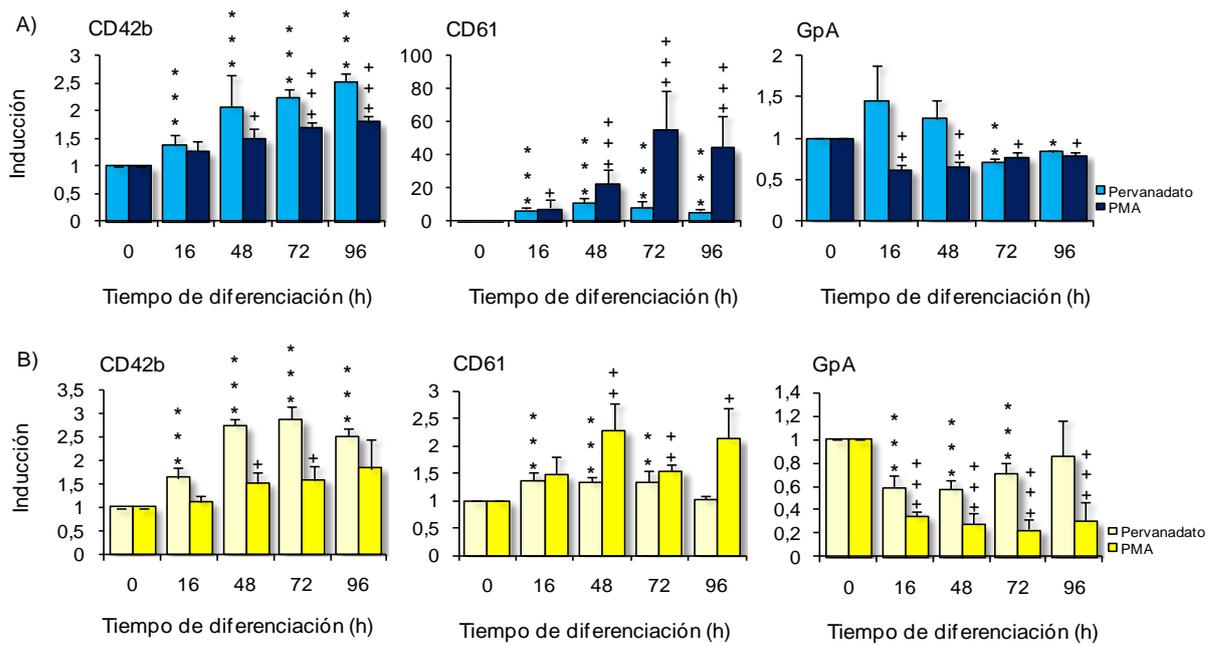


Fig. IV-44. Análisis comparativo del efecto del pervanadato y el PMA sobre la diferenciación megacariocítica de células K562 y HEL. Las células K562 (A) y HEL (B) se trataron con pervanadato 50 μ M o PMA 20 nM a distintos tiempos. Los histogramas muestran el número de veces de inducción en la expresión de los marcadores megacariocíticos (CD42b y CD61) y el marcador eritrocítico (GpA) con respecto a las células control no tratadas. Los datos son la media \pm la desviación estándar de tres experimentos diferentes. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con pervanadato y las células no tratadas. +++ $p < 0,001$; ++ $p < 0,01$; + $p < 0,05$ representan diferencias significativas entre las células tratadas con PMA y las células no tratadas.

El tratamiento con pervanadato provocó un incremento significativo de los marcadores megacariocíticos CD42b y CD61 y un descenso del marcador eritrocítico GpA. En algunos casos el efecto del pervanadato fue más fuerte que el del PMA (ver niveles de CD42b en ambas líneas celulares), mientras que en otros el efecto no era tan evidente como el observado con PMA. Por lo tanto, parece que la inhibición irreversible de la actividad PTPásica por parte del pervanadato es capaz de producir un efecto similar sobre la diferenciación megacariocítica que el tratamiento con PMA. Este resultado sugiere que en el proceso de diferenciación megacariocítica están implicadas las PTPs, las cuales deben resultar inhibidas de modo temprano en este proceso de diferenciación para que tenga lugar. El mecanismo de inhibición de la actividad PTPásica del pervanadato sugiere que esta inhibición debería estar mediada por la oxidación de estas enzimas. Como la diferenciación megacariocítica va acompañada de un incremento de los niveles intracelulares de ROS (Figuras IV-1, IV-2, IV-8B), es probable que el mecanismo por el cual los ROS inducen la megacariopoyesis sea,

al menos en parte, mediante la inhibición por oxidación de una o varias PTPs específicas.

5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PTP1B, SHP1, SHP2 Y PTP-Bas DURANTE LA DIFERENCIACIÓN MEGACARIOCÍTICA.

Con el fin de determinar las posibles PTPs que pueden estar actuando como dianas moleculares de los ROS durante el proceso de diferenciación megacariocítica, analizamos el patrón de fosforilación en residuos de tirosina a lo largo del proceso de diferenciación. Además analizamos la expresión de algunas PTPs cuya expresión en plaquetas es conocida.

5.1. Estudio del patrón de fosforilación en residuos de tirosina durante la diferenciación megacariocítica.

La estimulación de la diferenciación conlleva la activación de quinasas. Asimismo, hemos descrito anteriormente que a tiempos cortos de diferenciación hay un descenso en la actividad PTPásica, seguido de un incremento. Por tanto, podríamos esperar un incremento en la fosforilación en tirosina de diversas proteínas a tiempos cortos de diferenciación seguido de un descenso de la fosforilación a tiempos largos. Para comprobar si esto es así, hemos obtenido muestras de células sometidas a diferenciación a distintos tiempos y hemos analizado los niveles de proteínas fosforiladas en tirosina mediante transferencia de Western (Figura IV-45). En primer lugar, hemos de señalar que no observamos un aumento global de la fosforilación en tirosina en las células sometidas a diferenciación. Sin embargo, sí se pueden observar diversas proteínas en las que hay un incremento evidente de la fosforilación una vez iniciada la diferenciación. La más evidente es la banda de 42 kDa, y en menor medida las bandas de 39 y 56 kDa que marcamos en la Figura IV-45. Este incremento de fosforilación se mantiene hasta las 24 horas de diferenciación, para posteriormente producirse un claro proceso de desfosforilación. Además, otras bandas proteicas, como por ejemplo las de 87 y 96 kDa, también se desfosforilan a partir de las 24 horas de diferenciación. Por lo tanto, parece claro que a tiempos largos de diferenciación se produce la desfosforilación selectiva de determinadas proteínas. Hemos de señalar que tal y se observa en la Figura IV-41A, en las células K562 detectamos un incremento sostenido de actividad PTPásica a partir

de las 16 horas de diferenciación, incremento que se correlaciona bastante bien con la desfosforilación de varias proteínas que observamos en la Figura IV-45.

El incremento en la actividad PTPásica puede deberse a diversas causas: 1) incremento en la actividad de determinadas PTPs ó 2) incremento en los niveles de expresión de alguna PTP. Evaluar la actividad de una PTP concreta es un proceso difícil y además los resultados pueden variar en función del sustrato que se utilice *in vitro*. Dada esta dificultad, tal y como describiremos más tarde, hemos preferido analizar los niveles de expresión de diversas PTPs durante la diferenciación, para intentar correlacionar estos niveles con los resultados que hemos descrito en las Figuras IV-41 y IV-45.

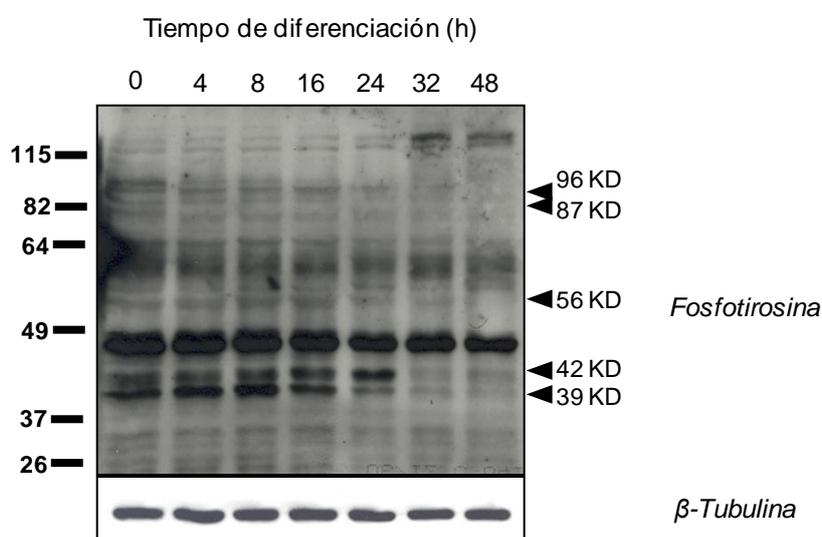


Fig. IV-45: Análisis de transferencia de Western de proteínas fosforiladas en tirosina durante la diferenciación megacariocítica de células K562 inducida por PMA. Las células K562 se diferenciaron con PMA 20 nM y se recolectaron a diferentes tiempos en tampón RIPA. El patrón de fosforilación en tirosina de sus proteínas se analizó mediante transferencia de Western a lo largo de la diferenciación utilizando un anticuerpo antifosfotirosina. Se cargaron 40 μ g de proteína por carril y como control de carga se analizó la expresión de β -tubulina. A la izquierda de la imagen se muestra el marcador de peso molecular "protein ladder". A la derecha, las puntas de flecha señalan las bandas en las que se observa un cambio en el patrón de fosforilación en tirosinas durante la diferenciación y su tamaño molecular está indicado en "kDa". En la figura se muestra un experimento representativo de cuatro diferentes.

5.2. Análisis de la expresión de SHP-1, SHP-2 y PTP1B durante la diferenciación megacariocítica.

Analizamos los niveles de expresión de tres PTPs presentes en plaquetas (Hernandez-Hernandez et al, 1999a) durante la diferenciación megacariocítica: SHP-1, SHP-2 y PTP1B. La expresión de estas tres PTPs ya ha sido analizada con anterioridad en células K562 sometidas a diferenciación megacariocítica

(Bruecher-Encke et al, 2001). Estos autores describieron que tan sólo la expresión de SHP-1 se ve activaba durante el proceso de diferenciación, y sugirieron que esta inducción era importante para la diferenciación. Nosotros llevamos a cabo análisis similares y también encontramos que la expresión de SHP-1 se incrementaba notablemente durante la diferenciación. Sin embargo, los tiempos de diferenciación que nosotros escogimos son distintos a los suyos. En su caso se tomaron muestras cada 24 horas, llevando el proceso de diferenciación hasta los 6 ó 7 días. Nosotros hemos preferido analizar lo que pasa a tiempos cortos, ya que las vías de señalización que conducen a la diferenciación se activan rápidamente como hemos descrito anteriormente (Figura IV-39). Dichos autores indicaron que las células K562 indiferenciadas no expresan SHP-1, sin embargo, nosotros sí encontramos cierta expresión de la proteína en nuestras células indiferenciadas (Figura IV-46A, carril 1). Ellos comprobaron un incremento sostenido de la expresión de SHP-1 a partir de las 24 horas de diferenciación de las células K562. Nosotros hemos analizado lo que sucede a tiempos más cortos, y hemos detectado que hay una fuerte inducción de la expresión de SHP-1 en células K562 entre las 4 y las 16 horas (Figura IV-46A). Después parece que bajan los niveles de expresión (Figura IV-46A, 24 horas y 32 horas), para luego volver a aumentar a las 48 horas. Las únicas muestras coincidentes entre sus experimentos y los nuestros son las correspondientes a las 24 y 48 horas. A estos tiempos los resultados serían coincidentes en ambos estudios. Sin embargo, nosotros hemos detectado que en las etapas tempranas hay una inducción de la expresión incluso mayor. Curiosamente, el incremento de la expresión de SHP-1 no coincide temporalmente con el descenso de la actividad PTPásica global (Figura IV-41), lo que nos hace suponer que ese descenso inicial de actividad global pueda deberse a la inhibición de otras PTPs distintas de SHP-1 que estén presentes en la célula.

En cuanto a SHP-2, una PTP muy relacionada con SHP-1, las células K562 indiferenciadas sí la expresan (Figura IV-46A, carril 1) pero sus niveles no sufren ninguna variación durante la diferenciación, lo que coincide con lo descrito anteriormente (Bruecher-Encke et al, 2001).

En cuanto a PTP1B, tampoco observamos una variación clara de sus niveles de expresión. Sin embargo, detectamos la aparición de una banda de menor movilidad, sobre todo a las 4 y 8 horas de diferenciación, que no está

presente en células indiferenciadas (Figura IV-46A). Pensamos que dicha banda puede deberse a la fosforilación de la proteína. La fosforilación de PTP1B en residuos de serina se ha descrito hace tiempo (Flint et al, 1993; Schievella et al, 1993), y más en concreto se ha descrito la fosforilación en respuesta a PMA. El PMA provoca una inhibición de la actividad PTPásica global y una fosforilación de la PTP1B que va acompañada de la pérdida de actividad (Kiyomoto et al, 1994). Estos resultados son muy similares a los nuestros y hemos de señalar que el descenso acusado de la actividad PTPásica que nosotros encontramos en células K562 (Figura IV-41A) coincide con los tiempos a los que observamos la doble banda en la transferencia de Western de PTP1B (Figura IV-46A). Además, a tiempos largos de diferenciación (Figura IV-46A, 32 y 48 horas) detectamos una banda de mayor movilidad. Esta banda más pequeña podría deberse a degradación proteica, aunque nosotros empleamos inhibidores de proteasas al preparar los extractos, por lo que esta posibilidad nos parece poco probable. Otra alternativa posible y atractiva al mismo tiempo, es que se deba al procesamiento proteolítico por medio de la calpaína. Este procesamiento regula la actividad de PTP1B liberándola de la membrana del retículo, y parece ser importante en la fisiología plaquetaria (Kuchay et al, 2007).

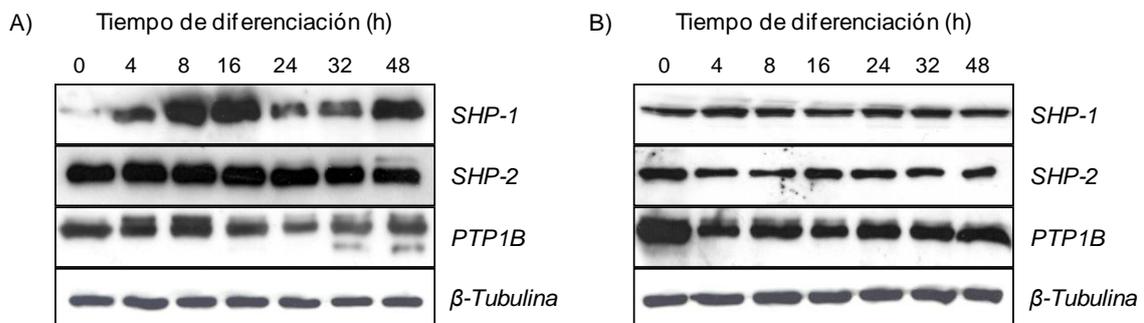


Fig. IV-46. Análisis de transferencia de Western de PTP1B, SHP-1 y SHP-2 en células K562 y HEL diferenciadas con PMA. Las células K562 (A) y HEL (B) fueron diferenciadas con PMA 20 nM y recolectadas a diferentes tiempos en tampón RIPA. Se cargaron 25 μ g de proteína por carril y como control de carga se analizó la expresión de tubulina. En la figura se muestra un experimento representativo de cuatro diferentes.

A continuación llevamos a cabo los mismos experimentos descritos para las células K562 en células HEL (Figura IV-46B). En estas células detectamos un descenso de los niveles de PTP1B una vez comenzada la diferenciación. Sin embargo, no encontramos variación alguna en los niveles de SHP-1 ni en los de

SHP-2, a pesar de que se trataron las células con la misma concentración de PMA que las células K562. Esto indica que las vías de señalización que en ambas líneas celulares conducen a la diferenciación megacariocítica, presentan particularidades en lo que respecta a la participación de las PTPs. Podría pensarse que, puesto que el incremento de expresión de SHP-1 sólo se observa en las células K562 pero no en las HEL, SHP-1 no tendría importancia para la diferenciación. Sin embargo, la sobreexpresión de SHP-1 en células K562 provoca la aparición un fenotipo más diferenciado (Bruecher-Encke et al, 2001), por lo que al menos en estas células ese incremento parece ser importante para el proceso de diferenciación.

5.3. Expresión de una nueva PTP durante la diferenciación megacariocítica.

Desde hace tiempo, nuestro grupo de investigación ha estado interesado en el estudio de diversos aspectos de las PTPs de plaquetas ya que los procesos de fosforilación son muy importantes en la fisiología de este tipo celular (Ferrell, Jr. y Martin, 1989). Hasta el momento, tan sólo se ha descrito la presencia de cuatro PTPs en plaquetas: PTP1B, SHP-1, SHP-2 y MEG (Hernandez-Hernandez et al, 1999a). Sin embargo, nuestros estudios ponen de manifiesto la existencia de otras PTPs de mayor tamaño en estas células (Hernandez-Hernandez et al, 1997; Hernandez-Hernandez et al, 1999a), que aún han de ser identificadas. Debe tenerse en cuenta que las PTPs pueden ser ubicuas o presentar una distribución restringida a un determinado tipo celular. Continuando en esta línea de trabajos, hemos intentado identificar nuevas PTPs en plaquetas, y, recientemente, hemos demostrado la presencia de una nueva PTP: PTP-Bas (Vidal Cardalda, 2006). En este trabajo comprobamos que PTP-Bas se expresaba en las plaquetas pero no en las células K562 indiferenciadas. Esta proteína no se expresa en todos los linajes hematopoyéticos. Así, por ejemplo, en un estudio donde se analizó su expresión en siete líneas celulares hematopoyéticas diferentes, tan sólo se encontró su ARNm en dos de ellas, aunque en ningún caso se comprobó si la proteína realmente se expresaba o no (Kim et al, 2000). En este mismo estudio, además, se describió que el ARNm de PTP-Bas no se transcribía en células K562. Puesto que las células K562 son capaces de seguir la diferenciación megacariocítica, y teniendo en cuenta que PTP-Bas se expresa en

plaquetas, nos pareció interesante analizar si la expresión de PTP-Bas resulta activada durante este proceso. El resultado es que al cabo de 24 horas de diferenciación se aprecia la expresión de PTP-Bas a nivel de proteína, incrementándose además sus niveles hasta las 48 horas de diferenciación (Figura IV-47).

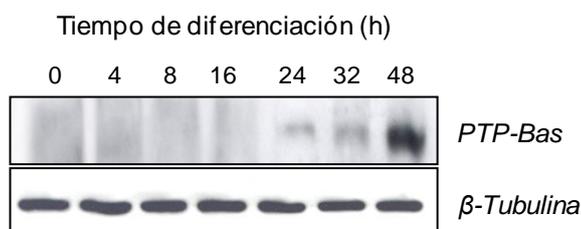


Fig. IV-47. Análisis de transferencia de Western de PTP-Bas en células K562 diferenciadas con PMA. Las células K562 se diferenciaron con PMA 20 nM y se recolectaron a diferentes tiempos en tampón RIPA. Se cargaron 50 µg de proteína por carril y como control de carga se analizó la expresión de tubulina. En la figura se muestra un experimento representativo de cuatro diferentes.

El hecho de que la expresión de PTP-Bas se active durante la diferenciación nos indica que podría tener un papel importante en este proceso. Además, hemos de indicar que la aparición de PTP-Bas coincide con el incremento de actividad PTPásica que vemos en la Figura IV-41, por lo que pensamos que PTP-Bas puede contribuir a este incremento de actividad.

5.4. Análisis de la expresión de PTP-Bas a nivel del ARNm durante la diferenciación megacariocítica.

A continuación quisimos comprobar si la activación de la expresión de PTP-Bas se producía a nivel de transcripción. Para ello llevamos a cabo experimentos de RT-PCR semicuantitativa. Corroborando lo descrito anteriormente (Kim et al, 2000), nosotros tampoco fuimos capaces de detectar el mensajero de PTP-Bas en células K562 indiferenciadas. Sin embargo, tan pronto como las células se someten a la diferenciación, se aprecia claramente su expresión (Figura IV-48A). Estos datos indican que la transcripción del gen PTP-Bas se activa durante la diferenciación. El gen PTP-Bas se sitúa en el cromosoma 4 y su promotor contiene sitios de unión para diversos factores de transcripción como por ejemplo SP1, AP-1, AP-2, GC box, CCAAT box o GATA-1 (Yoshida et al, 2002). El que más nos llama la atención es GATA-1 ya que es el factor de transcripción indispensable para la diferenciación tanto de megacariocitos como de

eritrocitos. Su ausencia provoca letalidad embrionaria por anemia (Fujiwara et al, 1996) y, en humanos, distintas mutaciones de su gen se relacionan con enfermedades, entre ellas, anemias, trombocitopenias y leucemias (Crispino, 2005). Aparentemente todos los genes específicos del linaje eritromegacariocítico poseen sitios de unión para GATA-1. Se propone que GATA-1 controla la expresión de todos estos genes. Sin embargo, hasta el momento no se conocen muchas dianas directas de GATA-1. Por lo tanto, nos parece probable que GATA-1 pueda estar regulando la expresión de PTP-Bas, y en un futuro abordaremos su estudio.

Una vez caracterizada la expresión del gen de PTP-Bas en células K562, decidimos estudiar la misma cuestión en células HEL. Llevamos a cabo el análisis a nivel de mensajero usando los mismos cebadores que en el caso de células K562. En este caso sí detectamos el mensajero de PTP-Bas en células indiferenciadas, pero tan pronto como las células se someten a diferenciación megacariocítica se ve un claro aumento de la expresión del mensajero de una manera muy rápida (Figura IV-48B).

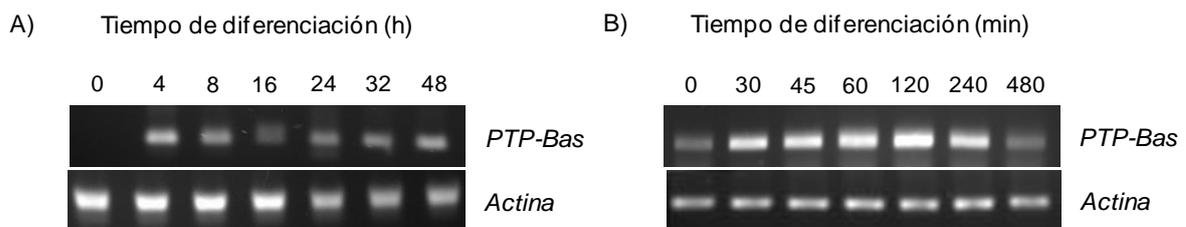


Fig. IV-48. Análisis de la expresión del ARNm de PTP-Bas durante la diferenciación megacariocítica de células K562 y HEL inducida por PMA. RT-PCR de células K562 (A) y HEL (B) diferenciadas con PMA 20 nM. Se analizó además la expresión del ARNm de actina como control de carga. En la figura se presenta un experimento representativo de cuatro diferentes.

Estos resultados indican claramente que la activación de la expresión de PTP-Bas es específica de la diferenciación megacariocítica, y dicha activación se produce a nivel de transcripción en ambas líneas celulares.

6. ESTUDIO DEL PAPEL DE PTP-Bas DURANTE LA DIFERENCIACIÓN MEGACARIOCÍTICA.

6.1. Análisis de la correlación entre la desfosforilación en residuos de tirosina y la expresión diferencial de PTP-Bas durante la diferenciación megacariocítica.

De las cuatro PTPs analizadas en este estudio, tan sólo PTP-Bas varía en ambas líneas celulares. La expresión de SHP-1 se activa en células K562 pero no en HEL. Además, si comparamos el patrón de expresión de SHP-1 y PTP-Bas con el perfil de proteínas fosforiladas en tirosina, observamos una clara correlación entre la aparición de PTP-Bas y la desfosforilación de ciertas proteínas (Figura IV-45), pero no observamos esa correlación en el caso de SHP-1. Esas proteínas que se desfosforilan podrían ser sustratos de PTP-Bas y su identificación nos daría gran información, tanto del proceso de diferenciación como de la función de PTP-Bas en este proceso.

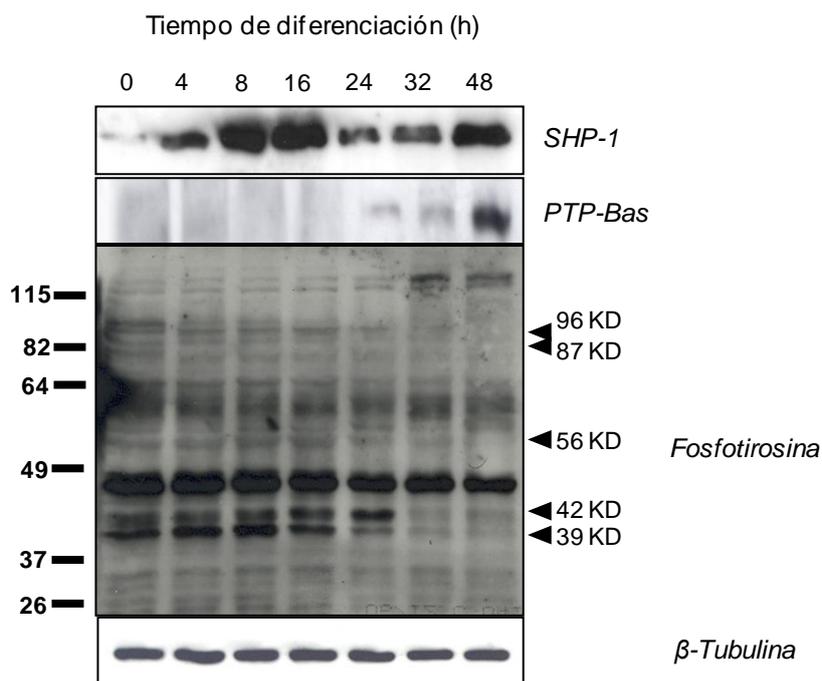


Fig. IV-49. Análisis comparativo de transferencia de Western de la expresión de SHP-1 y PTP-Bas y las modificaciones en el patrón de fosforilación en tirosinas de células K562 diferenciadas con PMA. Las células K562 se diferenciaron con PMA 20 nM y se recolectaron a diferentes tiempos en tampón RIPA. Como control de carga se utilizó un anticuerpo antitubulina. En la figura se presenta un experimento representativo de cuatro diferentes.

6.2. Análisis del efecto de la sobreexpresión de PTP-Bas en la diferenciación megacariocítica.

Para intentar averiguar si PTP-Bas ejerce un papel importante en la diferenciación megacariocítica, llevamos a cabo experimentos de expresión ectópica de la proteína. Actualmente, disponemos de tres plásmidos que codifican esta enzima: uno que expresa la versión silvestre de PTP-Bas (pHM6-PTP-Bas) y otros dos que codifican para dos versiones mutantes que carecen de actividad PTPásica, en uno de ellos se ha mutado el residuo de cisteína indispensable para la catálisis a serina (pHM6-PTP-BasC/S), mientras que en el otro se han mutado dos residuos importantes para la interacción con el sustrato, tirosina y fenilalanina por aspártico y alanina (pHM6-PTP-BasYF/DA). Estos dos mutantes carecen de actividad catalítica pero aún son capaces de unirse a los sustratos, por lo que funcionarían como “mutantes atrapadores de sustratos”.

En primer lugar analizamos los niveles de PTP-Bas por transferencia de Western en ambas líneas celulares para poder determinar si habíamos conseguido sobreexpresar exitosamente dicha proteína mediante el sistema de transfección y selección con G418 (ver apartados 4.16.2 y 4.16.3 de la sección de Materiales y Métodos). Los tres vectores de expresión de PTP-Bas expresan la proteína fusionada a un epítipo HA. Este epítipo HA es un nonapéptido derivado de la hemaglutinina del virus de la gripe humana. Concretamente, este péptido se corresponde con los aminoácidos del 98 al 106 de dicha proteína. Este epítipo HA nos permite determinar la sobreexpresión de PTP-Bas no sólo mediante el empleo de los distintos anticuerpos existentes frente a PTP-Bas (ver Tabla III-2), si no también mediante un anticuerpo anti-HA.

No detectamos la expresión de PTP-Bas en células K562 transfectadas con el vector vacío (Figura IV-50), lo cual concuerda con lo descrito anteriormente al analizar los niveles de PTP-Bas durante la diferenciación megacariocítica de células K562 (Figura IV-47). Sin embargo, si que se detectó PTP-Bas en aquellas células que habían sido transfectadas con el plásmido pHM6 con las distintas versiones de PTP-Bas (Figura IV-50). El efecto de la sobreexpresión resultó más evidente cuando las células habían sido tratadas con el inhibidor del proteasoma MG132 2,5 μ M. Por lo tanto, parece probable que esta proteína se degrade vía proteasoma lo cual dificulta considerablemente su detección mediante experimentos de transferencia de Western.

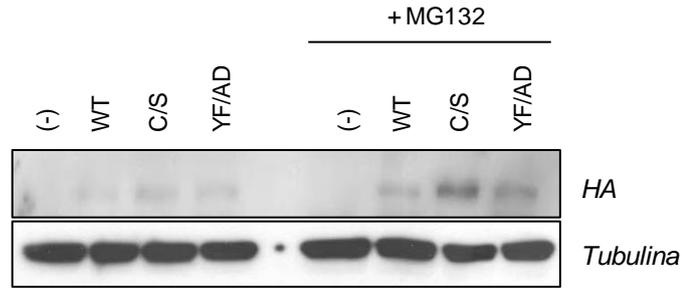


Fig. IV-50. Análisis de los niveles de PTP-Bas mediante transferencia de Western. Se analizaron los niveles de PTP-Bas en células K562 tranfectadas con el pHM6 vacío (-) o con los plásmidos de expresión para las distintas versiones de PTP-Bas: tipo silvestre (Wt) y dos mutantes catalíticamente inactivos (C/S e YF/AD). Las células se seleccionaron durante 14 días con G418. Se recogieron extractos de proteínas a partir de las células tratadas durante 6 horas en presencia o ausencia de MG132 2,5 μ M. Se utilizaron como control de los niveles de PTP-Bas las células tranfectadas con el pHM6 vacío (-). Se cargaron 50 μ g de proteína por carril. Como control de carga se analizaron los niveles de β -tubulina.

Una vez que corroboramos que estábamos sobreexpresando PTP-Bas, llevamos a cabo experimentos de diferenciación megacariocítica con el fin de determinar la posible implicación de dicha PTP en este proceso de diferenciación.

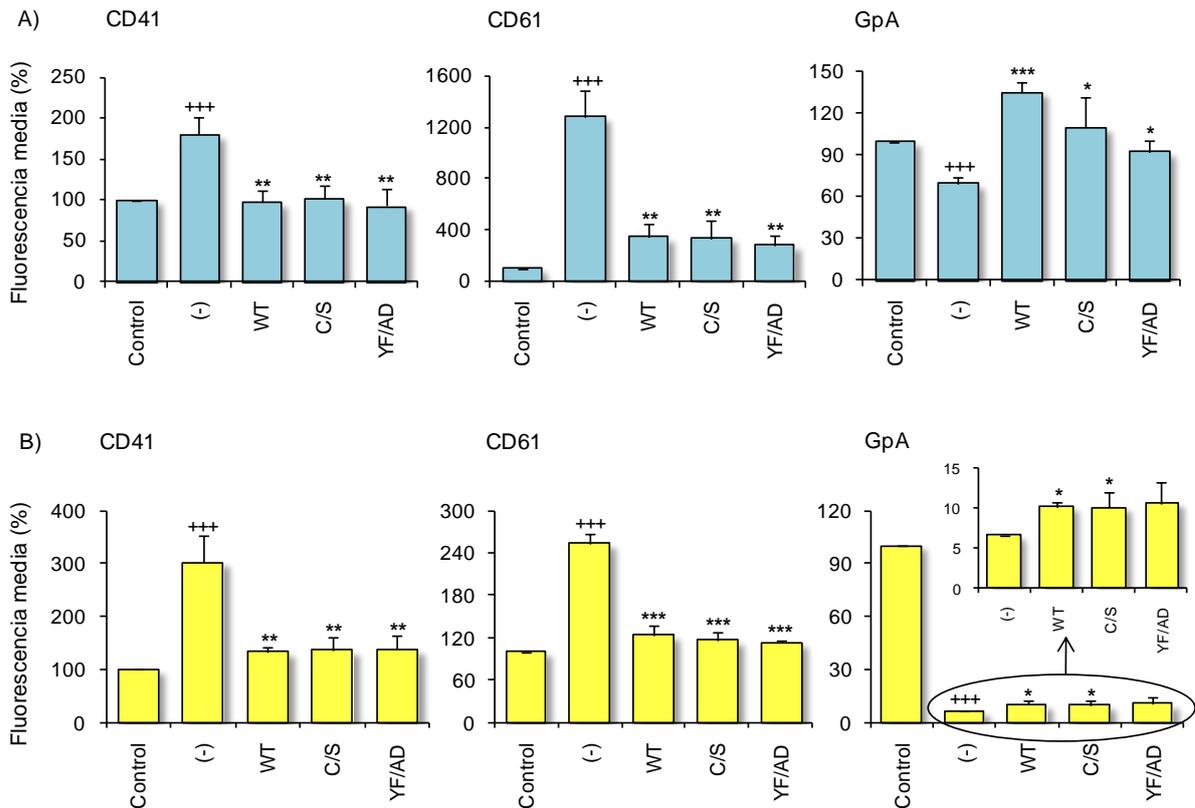


Fig. IV-51. Análisis del efecto de la expresión ectópica de PTP-Bas sobre la diferenciación megacariocítica. Las células K562 (A) y HEL (B) se tranfectaron con el pHM6 vacío (-) o con los plásmidos de expresión para las distintas versiones de PTP-Bas: tipo silvestre (Wt) y dos mutantes catalíticamente inactivos (C/S e YF/AD). Las células tranfectadas se trataron 48h con PMA 20 nM. Los histogramas muestran la media \pm la desviación estándar de al menos 3 experimentos diferentes. +++ $p < 0,001$ representa diferencias significativas entre las células tratadas con PMA y

las células no tratadas. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ representan diferencias significativas entre las células diferenciadas transfectadas con el vector vacío y las células diferenciadas transfectadas con las distintas versiones de PTP-Bas.

Estos experimentos demuestran que la diferenciación megacariocítica está alterada por la expresión ectópica de PTP-Bas, lo que indica claramente que PTP-Bas ha de jugar un papel en el proceso. La expresión de cualquiera de las tres versiones de PTP-Bas afecta negativamente a la diferenciación de células K562 (Figura IV-51A), ya que los marcadores megacariocíticos (CD41 y CD61) tras 48h de tratamiento con PMA se mantienen aproximadamente a los mismos niveles que en células indiferenciadas (Figura IV-51A). Por lo que respecta al marcador eritrocítico GpA detectamos un descenso en células transfectadas con el vector vacío tratadas con PMA, pero no en las células transfectadas con las distintas versiones de PTP-Bas (Figura IV-50A). En principio parece que el dominio catalítico de PTP-Bas no es necesario para interferir con el proceso de diferenciación en estas células, ya que encontramos el mismo efecto cuando expresamos la proteína nativa o los mutantes. Teniendo en cuenta que PTP-Bas es capaz de interactuar con numerosas moléculas, el efecto que vemos estaría mediado probablemente por algún tipo de interacción.

En el caso de las células HEL se manifestaron efectos similares para los marcadores megacariocíticos (CD41 y CD61) (Figura IV-51B). Con respecto al marcador eritrocítico GpA, se detectó una drástica disminución de sus niveles en las células transfectadas. No obstante, cuando comparamos los niveles de este marcador en las células transfectadas con el vector vacío con las transfectadas con las distintas versiones de PTP-Bas, observamos que los niveles son significativamente superiores para la versión silvestre de PTP-Bas y para el mutante C/S (Figura IV-50B).

A continuación analizamos la proliferación en las células K562 y HEL transfectadas con las distintas versiones de PTP-Bas. No se pudo encontrar ninguna diferencia significativa en cuanto a la proliferación celular entre las células transfectadas con el plásmido vacío y las transfectadas con las distintas versiones de PTP-Bas ni para células K562 (Figura IV-52A) ni para células HEL (Figura IV-52B). Por lo tanto, el efecto que observamos para la sobreexpresión de PTP-Bas sobre la diferenciación megacariocítica es independiente de un efecto indirecto sobre la proliferación celular.

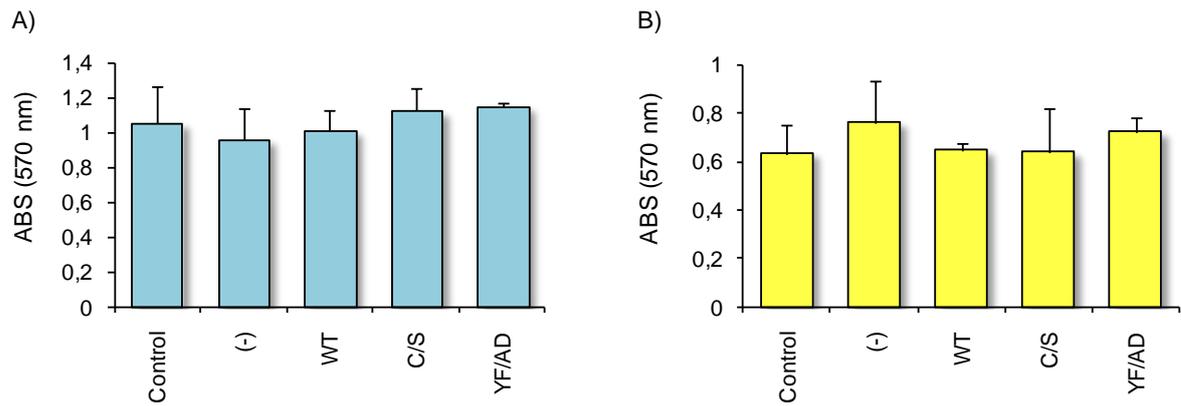


Fig. IV-52. Análisis del efecto de la sobreexpresión de PTP-Bas sobre la proliferación celular. Las células K562 (A) y HEL (B) se transfectaron con el pHM6 vacío (-) o con los plásmidos de expresión para las distintas versiones de PTP-Bas: tipo silvestre (Wt) y dos mutantes catalíticamente inactivos (C/S e YF/AD). La proliferación celular fue analizada mediante el ensayo del MTT. Los resultados son la media aritmética \pm la desviación estándar de 3 experimentos diferentes.

En conjunto, todos estos resultados sugieren que PTP-Bas tendría un papel relevante en la megacariopoyesis *in vivo*. El efecto inhibitorio sobre la diferenciación megacariocítica que ejerce la expresión ectópica de PTP-Bas asimismo sugiere que quizá su expresión se induzca a tiempos largos de diferenciación para regular a la baja las vías de señalización implicadas en el proceso.

CAPÍTULO V: Conclusiones

1. La diferenciación megacariocítica tanto de las líneas celulares K562 y HEL como de células humanas CD34+ se ve acompañada por un rápido incremento en los niveles de ROS intracelulares, los cuales son necesarios para que se lleve a cabo el proceso de diferenciación.
2. El incremento de ROS que acompaña a la diferenciación megacariocítica se debe a una o varias NADPH oxidasas dependientes de p22^{phox}. La actividad de dichas enzimas es crucial para el proceso de diferenciación.
3. Las rutas de señalización más importantes para la diferenciación megacariocítica son la ruta de las MAP quinasas MEK/ERK y la ruta de AKT.
4. Los ROS derivados de la actividad de una NADPH oxidasa dependiente de p22^{phox} son necesarios para la activación completa de las rutas de señalización que regulan la diferenciación megacariocítica.
5. Al inicio de la diferenciación megacariocítica se produce un acusado descenso de la actividad PTPásica. El tratamiento con inhibidores de esta actividad induce la diferenciación megacariocítica en células K562 y HEL.
6. La expresión de PTP-Bas se activa a nivel transcripcional durante la diferenciación megacariocítica.
7. La sobreexpresión de PTP-Bas dificulta la diferenciación megacariocítica de células K562 y HEL de manera independiente de su actividad PTPásica.

CAPÍTULO VI: Bibliografía

Adachi, M., Sekiya, M., Arimura, Y., Takekawa, M., Itoh, F., Hinoda, Y., Imai, K., y Yachi, A. (1992) Protein-tyrosine phosphatase expression in pre-B cell NALM-6. *Cancer Res.* **52**, 737-740.

Adolfsson, J., Mansson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C. T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O. J., Thoren, L. A., Anderson, K., Sitnicka, E., Sasaki, Y., Sigvardsson, M., y Jacobsen, S. E. (2005) Identification of Flt3⁺ lympho-myeloid stem cells lacking erythromegakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* **121**, 295-306.

Ago, T., Nunoi, H., Ito, T., y Sumimoto, H. (1999) Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the SH3 domain-mediated intramolecular interaction in p47(phox), thereby activating the oxidase. *J.Biol.Chem.* **274**, 33644-33653.

Aldieri, E., Riganti, C., Polimeni, M., Gazzano, E., Lussiana, C., Campia, I., y Ghigo, D. (2008) Classical inhibitors of NOX NAD(P)H oxidases are not specific. *Curr.Drug Metab* **9**, 686-696.

Alexander, W. S., Metcalf, D., y Dunn, A. R. (1995) Point mutations within a dimer interface homology domain of c-Mpl induce constitutive receptor activity and tumorigenicity. *EMBO J.* **14**, 5569-5578.

Alitalo, R. (1990) Induced differentiation of K562 leukemia cells: a model for studies of gene expression in early megakaryoblasts. *Leuk.Res.* **14**, 501-514.

Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J., y Mustelin, T. (2004) Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* **117**, 699-711.

Ambasta, R. K., Kumar, P., Griendling, K. K., Schmidt, H. H., Busse, R., y Brandes, R. P. (2004) Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J.Biol.Chem.* **279**, 45935-45941.

Andersen, J. N., Jansen, P. G., Echwald, S. M., Mortensen, O. H., Fukada, T., Del Vecchio, R., Tonks, N. K., y Moller, N. P. (2004) A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage. *FASEB J.* **18**, 8-30.

Avecilla, S. T., Hattori, K., Heissig, B., Tejada, R., Liao, F., Shido, K., Jin, D. K., Dias, S., Zhang, F., Hartman, T. E., Hackett, N. R., Crystal, R. G., Witte, L., Hicklin, D. J., Bohlen, P., Eaton, D., Lyden, D., de Sauvage, F., y Rafii, S. (2004) Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat.Med.* **10**, 64-71.

Avraham, H. y Price, D. J. (1999) Regulation of megakaryocytopoiesis and platelet production by tyrosine kinases and tyrosine phosphatases. *Methods* **17**, 250-264.

- Babior, B. M.** (2004) NADPH oxidase. *Curr.Opin.Immunol.* **16**, 42-47.
- Babior, B. M., Kipnes, R. S., y Curnutte, J. T.** (1973) Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J.Clin.Invest* **52**, 741-744.
- Ballen, K. K., Ritchie, A. J., Murphy, C., Handin, R. I., y Ewenstein, B. M.** (1996) Expression and activation of protein kinase C isoforms in a human megakaryocytic cell line. *Exp.Hematol.* **24**, 1501-1508.
- Banville, D., Ahmad, S., Stocco, R., y Shen, S. H.** (1994) A novel protein-tyrosine phosphatase with homology to both the cytoskeletal proteins of the band 4.1 family and junction-associated guanylate kinases. *J.Biol.Chem.* **269**, 22320-22327.
- Bartley, T. D., Bogenberger, J., Hunt, P., Li, Y. S., Lu, H. S., Martin, F., Chang, M. S., Samal, B., Nichol, J. L., Swift, S., y .** (1994) Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell* **77**, 1117-1124.
- Bedard, K. y Krause, K. H.** (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* **87**, 245-313.
- Bermejo, R., Vilaboa, N., y Cales, C.** (2002) Regulation of CDC6, geminin, and CDT1 in human cells that undergo polyploidization. *Mol.Biol.Cell* **13**, 3989-4000.
- Bernard, G. R.** (1991) N-acetylcysteine in experimental and clinical acute lung injury. *Am.J.Med.* **91**, 54S-59S.
- Bilwes, A. M., Den Hertog, J., Hunter, T., y Noel, J. P.** (1996) Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase-alpha by dimerization. *Nature* **382**, 555-559.
- Bjornstedt, M., Xue, J., Huang, W., Akesson, B., y Holmgren, A.** (1994) The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *J.Biol.Chem.* **269**, 29382-29384.
- Bompard, G., Martin, M., Roy, C., Vignon, F., y Freiss, G.** (2003) Membrane targeting of protein tyrosine phosphatase PTPL1 through its FERM domain via binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J.Cell Sci.* **116**, 2519-2530.
- Bompard, G., Puech, C., Prebois, C., Vignon, F., y Freiss, G.** (2002) Protein-tyrosine phosphatase PTPL1/FAP-1 triggers apoptosis in human breast cancer cells. *J.Biol.Chem.* **277**, 47861-47869.
- Bordo, D. y Bork, P.** (2002) The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. Sequence-structure-function relations. *EMBO Rep.* **3**, 741-746.

Boveris, A., Oshino, N., y CHANCE, B. (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem.J.* **128**, 617-630.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**, 248-254.

Brady-Kalnay, S. M., Flint, A. J., y Tonks, N. K. (1993) Homophilic binding of PTP mu, a receptor-type protein tyrosine phosphatase, can mediate cell-cell aggregation. *J.Cell Biol.* **122**, 961-972.

Brar, S. S., Corbin, Z., Kennedy, T. P., Hemendinger, R., Thornton, L., Bommarius, B., Arnold, R. S., Whorton, A. R., Sturrock, A. B., Huecksteadt, T. P., Quinn, M. T., Krenitsky, K., Ardie, K. G., Lambeth, J. D., y Hoidal, J. R. (2003) NOX5 NAD(P)H oxidase regulates growth and apoptosis in DU 145 prostate cancer cells. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **285**, C353-C369.

Brautigan, D. L. y Pinault, F. M. (1991) Activation of membrane protein-tyrosine phosphatase involving cAMP- and Ca²⁺/phospholipid-dependent protein kinases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**, 6696-6700.

Bray, R. C. (1988) The inorganic biochemistry of molybdoenzymes. *Q.Rev.Biophys.* **21**, 299-329.

Bray, R. C., Barber, M. J., Dalton, H., Lowe, D. J., y Coughlan, M. P. (1975) Iron-sulphur systems in some isolated multi-component oxidative enzymes. *Biochem.Soc.Trans.* **3**, 479-482.

Brooks, A. J., Wooh, J. W., Tunny, K. A., y Waters, M. J. (2008) Growth hormone receptor; mechanism of action. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **40**, 1984-1989.

Bruecher-Encke, B., Griffin, J. D., Neel, B. G., y Lorenz, U. (2001) Role of the tyrosine phosphatase SHP-1 in K562 cell differentiation. *Leukemia* **15**, 1424-1432.

Bunnell, E. y Pacht, E. R. (1993) Oxidized glutathione is increased in the alveolar fluid of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am.Rev.Respir.Dis.* **148**, 1174-1178.

Bunting, S., Widmer, R., Lipari, T., Rangell, L., Steinmetz, H., Carver-Moore, K., Moore, M. W., Keller, G. A., y de Sauvage, F. J. (1997) Normal platelets and megakaryocytes are produced in vivo in the absence of thrombopoietin. *Blood* **90**, 3423-3429.

Cadenas, E., Boveris, A., Ragan, C. I., y Stoppani, A. O. (1977) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch.Biochem.Biophys.* **180**, 248-257.

Cantin, A. M., Hubbard, R. C., y Crystal, R. G. (1989) Glutathione deficiency in the epithelial lining fluid of the lower respiratory tract in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am.Rev.Respir.Dis.* **139**, 370-372.

Cao, T. T., Deacon, H. W., Reczek, D., Bretscher, A., y von Zastrow, M. (1999) A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* **401**, 286-290.

Carcamo-Orive, I., Tejados, N., Delgado, J., Gaztelumendi, A., Otaegui, D., Lang, V., y Trigueros, C. (2008) ERK2 protein regulates the proliferation of human mesenchymal stem cells without affecting their mobilization and differentiation potential. *Exp.Cell Res.* **314**, 1777-1788.

Chan, R. J., Johnson, S. A., Li, Y., Yoder, M. C., y Feng, G. S. (2003) A definitive role of Shp-2 tyrosine phosphatase in mediating embryonic stem cell differentiation and hematopoiesis. *Blood* **102**, 2074-2080.

Charbonneau, H. y Tonks, N. K. (1992) 1002 protein phosphatases? *Annu.Rev.Cell Biol.* **8**, 463-493.

Chen, C. H., Cheng, T. H., Lin, H., Shih, N. L., Chen, Y. L., Chen, Y. S., Cheng, C. F., Lian, W. S., Meng, T. C., Chiu, W. T., y Chen, J. J. (2006) Reactive oxygen species generation is involved in epidermal growth factor receptor transactivation through the transient oxidization of Src homology 2-containing tyrosine phosphatase in endothelin-1 signaling pathway in rat cardiac fibroblasts. *Mol.Pharmacol.* **69**, 1347-1355.

Cheshier, S. H., Morrison, S. J., Liao, X., y Weissman, I. L. (1999) In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 3120-3125.

Chiarugi, P., Fiaschi, T., Taddei, M. L., Talini, D., Giannoni, E., Raugei, G., y Ramponi, G. (2001) Two vicinal cysteines confer a peculiar redox regulation to low molecular weight protein tyrosine phosphatase in response to platelet-derived growth factor receptor stimulation. *J.Biol.Chem.* **276**, 33478-33487.

Chiarugi, P., Pani, G., Giannoni, E., Taddei, L., Colavitti, R., Raugei, G., Symons, M., Borrello, S., Galeotti, T., y Ramponi, G. (2003) Reactive oxygen species as essential mediators of cell adhesion: the oxidative inhibition of a FAK tyrosine phosphatase is required for cell adhesion. *J.Cell Biol.* **161**, 933-944.

Chida, D., Kume, T., Mukouyama, Y., Tabata, S., Nomura, N., Thomas, M. L., Watanabe, T., y Oishi, M. (1995) Characterization of a protein tyrosine phosphatase (RIP) expressed at a very early stage of differentiation in both mouse erythroleukemia and embryonal carcinoma cells. *FEBS Lett.* **358**, 233-239.

Chishti, A. H., Kim, A. C., Marfatia, S. M., Lutchman, M., Hanspal, M., Jindal, H., Liu, S. C., Low, P. S., Rouleau, G. A., Mohandas, N., Chasis, J. A., Conboy, J. G., Gascard, P., Takakuwa, Y., Huang, S. C., Benz, E. J.,

Jr., Bretscher, A., Fehon, R. G., Gusella, J. F., Ramesh, V., Solomon, F., Marchesi, V. T., Tsukita, S., Tsukita, S., Hoover, K. B., y . (1998) The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem.Sci.* **23**, 281-282.

Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, A., Papadimitriou, J. C., y Keller, G. (1998) A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* **125**, 725-732.

Ciccarelli, F. D., Bork, P., y Kerkhoff, E. (2003) The KIND module: a putative signalling domain evolved from the C lobe of the protein kinase fold. *Trends Biochem.Sci.* **28**, 349-352.

Coffer, P. J. y Burgering, B. M. (2007) Stressed marrow: FoxOs stem tumour growth. *Nat.Cell Biol.* **9**, 251-253.

Cornacoff, J. B., Hebert, L. A., Smead, W. L., VanAman, M. E., Birmingham, D. J., y Waxman, F. J. (1983) Primate erythrocyte-immune complex-clearing mechanism. *J.Clin.Invest* **71**, 236-247.

Cosio, F. G., Shen, X. P., Birmingham, D. J., Van Aman, M., y Hebert, L. A. (1990) Evaluation of the mechanisms responsible for the reduction in erythrocyte complement receptors when immune complexes form in vivo in primates. *J.Immunol.* **145**, 4198-4206.

Crispino, J. D. (2005) GATA1 in normal and malignant hematopoiesis. *Semin.Cell Dev.Biol.* **16**, 137-147.

Cross, A. R. y Jones, O. T. (1986) The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils. Specific labelling of a component polypeptide of the oxidase. *Biochem.J.* **237**, 111-116.

Cuppen, E., Gerrits, H., Pepers, B., Wieringa, B., y Hendriks, W. (1998) PDZ motifs in PTP-BL and RIL bind to internal protein segments in the LIM domain protein RIL. *Mol.Biol.Cell* **9**, 671-683.

Cuppen, E., Nagata, S., Wieringa, B., y Hendriks, W. (1997) No evidence for involvement of mouse protein-tyrosine phosphatase-BAS-like Fas-associated phosphatase-1 in Fas-mediated apoptosis. *J.Biol.Chem.* **272**, 30215-30220.

Cuppen, E., van Ham, M., Pepers, B., Wieringa, B., y Hendriks, W. (1999a) Identification and molecular characterization of BP75, a novel bromodomain-containing protein. *FEBS Lett.* **459**, 291-298.

Cuppen, E., Wijers, M., Schepens, J., Fransen, J., Wieringa, B., y Hendriks, W. (1999b) A FERM domain governs apical confinement of PTP-BL in epithelial cells. *J.Cell Sci.* **112 (Pt 19)**, 3299-3308.

Das, D. K. (2004) Thioredoxin regulation of ischemic preconditioning. *Antioxid.Redox.Signal.* **6**, 405-412.

de Sauvage, F. J., Hass, P. E., Spencer, S. D., Malloy, B. E., Gurney, A. L., Spencer, S. A., Darbonne, W. C., Henzel, W. J., Wong, S. C., Kuang, W. J., y . (1994) Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* **369**, 533-538.

de, M., I y Leto, T. L. (1995) Functional reconstitution of the phagocyte NADPH oxidase by transfection of its multiple components in a heterologous system. *Blood* **85**, 1104-1110.

Dekker, L. V. y Parker, P. J. (1994) Protein kinase C--a question of specificity. *Trends Biochem.Sci.* **19**, 73-77.

DeLeo, F. R., Burritt, J. B., Yu, L., Jesaitis, A. J., Dinauer, M. C., y Nauseef, W. M. (2000) Processing and maturation of flavocytochrome b558 include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly. *J.Biol.Chem.* **275**, 13986-13993.

DeLeo, F. R., Nauseef, W. M., Jesaitis, A. J., Burritt, J. B., Clark, R. A., y Quinn, M. T. (1995) A domain of p47phox that interacts with human neutrophil flavocytochrome b558. *J.Biol.Chem.* **270**, 26246-26251.

Den Hertog, J., Groen, A., y Van Der, W. T. (2005) Redox regulation of protein-tyrosine phosphatases. *Arch.Biochem.Biophys.* **434**, 11-15.

Denu, J. M., Stuckey, J. A., Saper, M. A., y Dixon, J. E. (1996) Form and function in protein dephosphorylation. *Cell* **87**, 361-364.

Deutsch, V. R. y Tomer, A. (2006) Megakaryocyte development and platelet production. *Br.J.Haematol.* **134**, 453-466.

Donko, A., Peterfi, Z., Sum, A., Leto, T., y Geiszt, M. (2005) Dual oxidases. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **360**, 2301-2308.

Dorsch, M., Danial, N. N., Rothman, P. B., y Goff, S. P. (1999) A thrombopoietin receptor mutant deficient in Jak-STAT activation mediates proliferation but not differentiation in UT-7 cells. *Blood* **94**, 2676-2685.

Dosil, M., Leibman, N., y Lemischka, I. R. (1996) Cloning and characterization of fetal liver phosphatase 1, a nuclear protein tyrosine phosphatase isolated from hematopoietic stem cells. *Blood* **88**, 4510-4525.

Drachman, J. G., Millett, K. M., y Kaushansky, K. (1999) Thrombopoietin signal transduction requires functional JAK2, not TYK2. *J.Biol.Chem.* **274**, 13480-13484.

Dromard, M., Bompard, G., Glondu-Lassis, M., Puech, C., Chalbos, D., y Freiss, G. (2007) The putative tumor suppressor gene PTPN13/PTPL1 induces apoptosis through insulin receptor substrate-1 dephosphorylation. *Cancer Res.* **67**, 6806-6813.

Eklund, E. A., Jalava, A., y Kakar, R. (1998) PU.1, interferon regulatory factor 1, and interferon consensus sequence-binding protein cooperate to increase gp91(phox) expression. *J.Biol.Chem.* **273**, 13957-13965.

Eklund, E. A. y Kakar, R. (1999) Recruitment of CREB-binding protein by PU.1, IFN-regulatory factor-1, and the IFN consensus sequence-binding protein is necessary for IFN-gamma-induced p67phox and gp91phox expression. *J.Immunol.* **163**, 6095-6105.

El Benna, J., Dang, P. M., Gougerot-Pocidallo, M. A., Marie, J. C., y Braut-Boucher, F. (2009) p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp.Mol.Med.* **41**, 217-225.

Ellson, C. D., Gobert-Gosse, S., Anderson, K. E., Davidson, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Thuring, J. W., Cooper, M. A., Lim, Z. Y., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Coadwell, J., Chilvers, E. R., Hawkins, P. T., y Stephens, L. R. (2001) PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40(phox). *Nat.Cell Biol.* **3**, 679-682.

Ema, M., Yokomizo, T., Wakamatsu, A., Terunuma, T., Yamamoto, M., y Takahashi, S. (2006) Primitive erythropoiesis from mesodermal precursors expressing VE-cadherin, PECAM-1, Tie2, endoglin, and CD34 in the mouse embryo. *Blood* **108**, 4018-4024.

Erdmann, K. S. (2003) The protein tyrosine phosphatase PTP-Basophil/Basophil-like. Interacting proteins and molecular functions. *Eur.J.Biochem.* **270**, 4789-4798.

Erdmann, K. S., Kuhlmann, J., Lessmann, V., Herrmann, L., Eulenburg, V., Muller, O., y Heumann, R. (2000) The Adenomatous Polyposis Coli-protein (APC) interacts with the protein tyrosine phosphatase PTP-BL via an alternatively spliced PDZ domain. *Oncogene* **19**, 3894-3901.

Fauman, E. B. y Saper, M. A. (1996) Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *Trends Biochem.Sci.* **21**, 413-417.

Fearon, D. T. y Austen, K. F. (1980) Current concepts in immunology: the alternative pathway of complement--a system for host resistance to microbial infection. *N.Engl.J.Med.* **303**, 259-263.

Febbraio, M. A. (2007) gp130 receptor ligands as potential therapeutic targets for obesity. *J.Clin.Invest* **117**, 841-849.

Feese, M. D., Tamada, T., Kato, Y., Maeda, Y., Hirose, M., Matsukura, Y., Shigematsu, H., Muto, T., Matsumoto, A., Watarai, H., Ogami, K., Tahara, T., Kato, T., Miyazaki, H., y Kuroki, R. (2004) Structure of the receptor-binding domain of human thrombopoietin determined by complexation with a neutralizing antibody fragment. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**, 1816-1821.

Ferrell, J. E., Jr. y Martin, G. S. (1989) Tyrosine-specific protein phosphorylation is regulated by glycoprotein IIb-IIIa in platelets. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**, 2234-2238.

Fischer, E. H., Charbonneau, H., y Tonks, N. K. (1991) Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science* **253**, 401-406.

Flint, A. J., Gebbink, M. F., Franza, B. R., Jr., Hill, D. E., y Tonks, N. K. (1993) Multi-site phosphorylation of the protein tyrosine phosphatase, PTP1B: identification of cell cycle regulated and phorbol ester stimulated sites of phosphorylation. *EMBO J.* **12**, 1937-1946.

Frangioni, J. V., Oda, A., Smith, M., Salzman, E. W., y Neel, B. G. (1993) Calpain-catalyzed cleavage and subcellular relocation of protein phosphotyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) in human platelets. *EMBO J.* **12**, 4843-4856.

Freiss, G. y Vignon, F. (2004) Protein tyrosine phosphatases and breast cancer. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* **52**, 9-17.

Fuchs, E. J. y Whartenby, K. A. (2004) Hematopoietic stem cell transplant as a platform for tumor immunotherapy. *Curr.Opin.Mol.Ther.* **6**, 48-53.

Fujiwara, Y., Browne, C. P., Cunniff, K., Goff, S. C., y Orkin, S. H. (1996) Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 12355-12358.

Galloway, J. L. y Zon, L. I. (2003) Ontogeny of hematopoiesis: examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo. *Curr.Top.Dev.Biol.* **53**, 139-158.

Genestra, M. (2007) Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal.* **19**, 1807-1819.

Ghiran, I., Glodek, A. M., Weaver, G., Klickstein, L. B., y Nicholson-Weller, A. (2008) Ligation of erythrocyte CR1 induces its clustering in complex with scaffolding protein FAP-1. *Blood* **112**, 3465-3473.

Gitika, B., Sai, R. M., Sharma, S. K., Ilavazhagan, G., y Banerjee, P. K. (2006) Quercetin protects C6 glial cells from oxidative stress induced by tertiary-butylhydroperoxide. *Free Radic.Res.* **40**, 95-102.

Gjorloff-Wingren, A., Saxena, M., Han, S., Wang, X., Alonso, A., Renedo, M., Oh, P., Williams, S., Schnitzer, J., y Mustelin, T. (2000) Subcellular localization of intracellular protein tyrosine phosphatases in T cells. *Eur.J.Immunol.* **30**, 2412-2421.

Goldfarb, A. N. (2007) Transcriptional control of megakaryocyte development. *Oncogene* **26**, 6795-6802.

Goldfarb, A. N., Delehanty, L. L., Wang, D., Racke, F. K., y Hussaini, I. M. (2001) Stromal inhibition of megakaryocytic differentiation correlates with blockade of signaling by protein kinase C-epsilon and ERK/MAPK. *J.Biol.Chem.* **276**, 29526-29530.

Goldstein, B. J., Mahadev, K., Wu, X., Zhu, L., y Motoshima, H. (2005) Role of insulin-induced reactive oxygen species in the insulin signaling pathway. *Antioxid.Redox.Signal.* **7**, 1021-1031.

Goldstone, S. D., Milligan, A. D., y Hunt, N. H. (1996) Oxidative signalling and gene expression during lymphocyte activation. *Biochim.Biophys.Acta* **1314**, 175-182.

Gomez, L. D., Noctor, G., Knight, M. R., y Foyer, C. H. (2004) Regulation of calcium signalling and gene expression by glutathione. *J.Exp.Bot.* **55**, 1851-1859.

Gordon, M. S. y Hoffman, R. (1992) Growth factors affecting human thrombocytopoiesis: potential agents for the treatment of thrombocytopenia. *Blood* **80**, 302-307.

Granger, D. N., Hollwarth, M. E., y Parks, D. A. (1986) Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand.Suppl* **548**, 47-63.

Granger, D. N., Rutili, G., y McCord, J. M. (1981) Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* **81**, 22-29.

Greer, E. L. y Brunet, A. (2005) FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* **24**, 7410-7425.

Grivennikova, V. G. y Vinogradov, A. D. (2006) Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. *Biochim.Biophys.Acta* **1757**, 553-561.

Groen, A., Lemeer, S., Van Der, W. T., Overvoorde, J., Heck, A. J., Ostman, A., Barford, D., Slijper, M., y Den Hertog, J. (2005) Differential oxidation of protein-tyrosine phosphatases. *J.Biol.Chem.* **280**, 10298-10304.

Gross, C., Heumann, R., y Erdmann, K. S. (2001) The protein kinase C-related kinase PRK2 interacts with the protein tyrosine phosphatase PTP-BL via a novel PDZ domain binding motif. *FEBS Lett.* **496**, 101-104.

Gross, S., Blanchetot, C., Schepens, J., Albet, S., Lammers, R., Den Hertog, J., y Hendriks, W. (2002) Multimerization of the protein-tyrosine phosphatase (PTP)-like insulin-dependent diabetes mellitus autoantigens IA-2 and IA-2beta with receptor PTPs (RPTPs). Inhibition of RPTPalpha enzymatic activity. *J.Biol.Chem.* **277**, 48139-48145.

Gu, M. y Majerus, P. W. (1996) The properties of the protein tyrosine phosphatase PTPMEG. *J.Biol.Chem.* **271**, 27751-27759.

Guerriero, A., Worford, L., Holland, H. K., Guo, G. R., Sheehan, K., y Waller, E. K. (1997) Thrombopoietin is synthesized by bone marrow stromal cells. *Blood* **90**, 3444-3455.

Guerriero, R., Parolini, I., Testa, U., Samoggia, P., Petrucci, E., Sargiacomo, M., Chelucci, C., Gabbianelli, M., y Peschle, C. (2006) Inhibition of TPO-induced MEK or mTOR activity induces opposite effects on the ploidy of human differentiating megakaryocytes. *J.Cell Sci.* **119**, 744-752.

Haddad, J. J. (2001) L-Buthionine-(S,R)-sulfoximine, an irreversible inhibitor of gamma-glutamylcysteine synthetase, augments LPS-mediated pro-inflammatory cytokine biosynthesis: evidence for the implication of an I κ B α /NF- κ B insensitive pathway. *Eur.Cytokine Netw.* **12**, 614-624.

Haddad, J. J. (2002) Recombinant TNF- α mediated regulation of the I κ B α /NF- κ B signaling pathway: evidence for the enhancement of pro- and anti-inflammatory cytokines in alveolar epithelial cells. *Cytokine* **17**, 301-310.

Haddad, J. J. y Harb, H. L. (2005) L-gamma-Glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and GSH-related enzymes in the regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines: a signaling transcriptional scenario for redox(y) immunologic sensor(s)? *Mol.Immunol.* **42**, 987-1014.

Haddad, J. J. y Land, S. C. (2000) O₂-evoked regulation of HIF-1 α and NF- κ B in perinatal lung epithelium requires glutathione biosynthesis. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **278**, L492-L503.

Haddad, J. J., Olver, R. E., y Land, S. C. (2000) Antioxidant/pro-oxidant equilibrium regulates HIF-1 α and NF- κ B redox sensitivity. Evidence for inhibition by glutathione oxidation in alveolar epithelial cells. *J.Biol.Chem.* **275**, 21130-21139.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M., y Cross, C. E. (1992) Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J.Lab Clin.Med.* **119**, 598-620.

Hancock, J. T. y Jones, O. T. (1987) The inhibition by diphenyleneiodonium and its analogues of superoxide generation by macrophages. *Biochem.J.* **242**, 103-107.

Harrison, R. (2002) Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic.Biol.Med.* **33**, 774-797.

Heinonen, K. M., Dube, N., Bourdeau, A., Lapp, W. S., y Tremblay, M. L. (2006) Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates macrophage development through CSF-1 signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **103**, 2776-2781.

Heinonen, K. M. y Tremblay, M. L. (2006) Protein Tyrosine Phosphatase 1B in Hematopoiesis. *Cell Cycle* **5**,

Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Muller-Newen, G., y Schaper, F. (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem.J.* **374**, 1-20.

Hernandez-Hernandez, A., Garabatos, M. N., Rodriguez, M. C., Vidal, M. L., Lopez-Revuelta, A., Sanchez-Gallego, J. I., Llanillo, M., y Sanchez-Yague, J. (2005) Structural characteristics of a lipid peroxidation product, trans-2-nonenal, that favour inhibition of membrane-associated phosphotyrosine phosphatase activity. *Biochim.Biophys.Acta* **1726**, 317-325.

Hernandez-Hernandez, A., Llanillo, M., Rodriguez, M. C., Gomez, F., y Sanchez-Yague, J. (1999a) Amphiphilic and hydrophilic nature of sheep and human platelet phosphotyrosine phosphatase forms. *Biochim.Biophys.Acta* **1419**, 195-206.

Hernandez-Hernandez, A., Sanchez-Bernal, C., Rodriguez, M. C., Gomez, F. P., Llanillo, M., y Sanchez-Yague, J. (2001) Loss of phosphotyrosine phosphatase activity and changes in the tyrosine phosphorylation state of proteins after storage of sheep platelets in plasma or Seto solution at 4 degrees C. *Vox Sang.* **81**, 241-247.

Hernandez-Hernandez, A., Sanchez-Yague, J., Martin-Valmaseda, E. M., y Llanillo, M. (1997) Characterization of phosphotyrosine phosphatase activity in sheep platelets: amphiphilic and hydrophilic forms. *Comp Biochem.Physiol B Biochem.Mol.Biol.* **117**, 437-444.

Hernandez-Hernandez, A., Sanchez-Yague, J., Martin-Valmaseda, E. M., y Llanillo, M. (1999b) Oxidative inactivation of human and sheep platelet membrane-associated phosphotyrosine phosphatase activity. *Free Radic.Biol.Med.* **26**, 1218-1230.

Herrmann, L., Dittmar, T., y Erdmann, K. S. (2003) The protein tyrosine phosphatase PTP-BL associates with the midbody and is involved in the regulation of cytokinesis. *Mol.Biol.Cell* **14**, 230-240.

Holmgren, A. (1979) Reduction of disulfides by thioredoxin. Exceptional reactivity of insulin and suggested functions of thioredoxin in mechanism of hormone action. *J.Biol.Chem.* **254**, 9113-9119.

Holmgren, A. (1984) Enzymatic reduction-oxidation of protein disulfides by thioredoxin. *Methods Enzymol.* **107**, 295-300.

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

Huang, W., Zhu, C., Wang, H., Horvath, E., y Eklund, E. A. (2008) The interferon consensus sequence-binding protein (ICSBP/IRF8) represses PTPN13 gene transcription in differentiating myeloid cells. *J.Biol.Chem.* **283**, 7921-7935.

Huber, W. W. y Parzefall, W. (2007) Thiols and the chemoprevention of cancer. *Curr.Opin.Pharmacol.* **7**, 404-409.

Hug, H. y Sarre, T. F. (1993) Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem.J.* **291 (Pt 2)**, 329-343.

Hunter, T. (1989) Protein-tyrosine phosphatases: the other side of the coin. *Cell* **58**, 1013-1016.

Huyer, G., Liu, S., Kelly, J., Moffat, J., Payette, P., Kennedy, B., Tsaprailis, G., Gresser, M. J., y Ramachandran, C. (1997) Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *J.Biol.Chem.* **272**, 843-851.

Inoue, H., Nojima, H., y Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.

Irie, S., Hachiya, T., Rabizadeh, S., Maruyama, W., Mukai, J., Li, Y., Reed, J. C., Bredezen, D. E., y Sato, T. A. (1999) Functional interaction of Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1) with p75(NTR) and their effect on NF-kappaB activation. *FEBS Lett.* **460**, 191-198.

Ishibashi, T., Bottaro, D. P., Michieli, P., Kelley, C. A., y Aaronson, S. A. (1994) A novel dual specificity phosphatase induced by serum stimulation and heat shock. *J.Biol.Chem.* **269**, 29897-29902.

Ishiko, E., Matsumura, I., Ezoe, S., Gale, K., Ishiko, J., Satoh, Y., Tanaka, H., Shibayama, H., Mizuki, M., Era, T., Enver, T., y Kanakura, Y. (2005) Notch signals inhibit the development of erythroid/megakaryocytic cells by suppressing GATA-1 activity through the induction of HES1. *J.Biol.Chem.* **280**, 4929-4939.

Iwasaki, H. y Akashi, K. (2007) Hematopoietic developmental pathways: on cellular basis. *Oncogene* **26**, 6687-6696.

Jahr, C. E. y Stevens, C. F. (1993) Calcium permeability of the N-methyl-D-aspartate receptor channel in hippocampal neurons in culture. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 11573-11577.

Jang, Y. Y. y Sharkis, S. J. (2007) A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood* **110**, 3056-3063.

Jeanmougin, F., Wurtz, J. M., Le Douarin, B., Chambon, P., y Losson, R. (1997) The bromodomain revisited. *Trends Biochem.Sci.* **22**, 151-153.

Jelkmann, W. (2001) The role of the liver in the production of thrombopoietin compared with erythropoietin. *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.* **13**, 791-801.

Johnson, D. K., Schillinger, K. J., Kwait, D. M., Hughes, C. V., McNamara, E. J., Ishmael, F., O'Donnell, R. W., Chang, M. M., Hogg, M. G., Dordick, J. S., Santhanam, L., Ziegler, L. M., y Holland, J. A. (2002) Inhibition of NADPH oxidase activation in endothelial cells by ortho-methoxy-substituted catechols. *Endothelium* **9**, 191-203.

Johnson, K. G. y Van Vector, D. (2003) Receptor protein tyrosine phosphatases in nervous system development. *Physiol Rev.* **83**, 1-24.

Kachel, N., Erdmann, K. S., Kremer, W., Wolff, P., Gronwald, W., Heumann, R., y Kalbitzer, H. R. (2003) Structure determination and ligand interactions of the PDZ2b domain of PTP-Bas (hPTP1E): splicing-induced modulation of ligand specificity. *J.Mol.Biol.* **334**, 143-155.

Kamata, H., Honda, S., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H., y Karin, M. (2005) Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* **120**, 649-661.

Kamatkar, S., Radha, V., Nambirajan, S., Reddy, R. S., y Swarup, G. (1996) Two splice variants of a tyrosine phosphatase differ in substrate specificity, DNA binding, and subcellular location. *J.Biol.Chem.* **271**, 26755-26761.

Katsura, Y. (2002) Redefinition of lymphoid progenitors. *Nat.Rev.Immunol.* **2**, 127-132.

Katsura, Y. y Kawamoto, H. (2001) Stepwise lineage restriction of progenitors in lympho-myelopoiesis. *Int.Rev.Immunol.* **20**, 1-20.

Kaushansky, K. (1995) Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood* **86**, 419-431.

Kaushansky, K. (2005) The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J.Clin.Invest* **115**, 3339-3347.

Kaushansky, K. (2006) Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N.Engl.J.Med.* **354**, 2034-2045.

Kaushansky, K. (2008) Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood* **111**, 981-986.

Kawahara, T., Ritsick, D., Cheng, G., y Lambeth, J. D. (2005) Point mutations in the proline-rich region of p22phox are dominant inhibitors of Nox1- and Nox2-dependent reactive oxygen generation. *J.Biol.Chem.* **280**, 31859-31869.

Kawamoto, H. (2006) A close developmental relationship between the lymphoid and myeloid lineages. *Trends Immunol.* **27**, 169-175.

Kawamoto, H., Wada, H., y Katsura, Y. (2010) A revised scheme for developmental pathways of hematopoietic cells: the myeloid-based model. *Int.Immunol.* **22**, 65-70.

Kennedy, M., Firpo, M., Choi, K., Wall, C., Robertson, S., Kabrun, N., y Keller, G. (1997) A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature* **386**, 488-493.

Keyse, S. M. (1998) Protein phosphatases and the regulation of MAP kinase activity. *Semin.Cell Dev.Biol.* **9**, 143-152.

Kiel, M. J. y Morrison, S. J. (2008) Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat.Rev.Immunol.* **8**, 290-301.

Kim, K. M., Lee, K., Hong, Y. S., y Park, H. Y. (2000) Fas-mediated apoptosis and expression of related genes in human malignant hematopoietic cells. *Exp.Mol.Med.* **32**, 246-254.

Kim, Y. M., Kang, H. S., Paik, S. G., Pyun, K. H., Anderson, K. L., Torbett, B. E., y Choi, I. (1999) Roles of IFN consensus sequence binding protein and PU.1 in regulating IL-18 gene expression. *J.Immunol.* **163**, 2000-2007.

Kiss, P. J., Knisz, J., Zhang, Y., Baltrusaitis, J., Sigmund, C. D., Thalmann, R., Smith, R. J., Verpy, E., y Banfi, B. (2006) Inactivation of NADPH oxidase organizer 1 results in severe imbalance. *Curr.Biol.* **16**, 208-213.

Kiyomoto, H., Fouqueray, B., Abboud, H. E., y Choudhury, G. G. (1994) Phorbol 12-myristate 13-acetic acid inhibits PTP1B activity in human mesangial cells. A possible mechanism of enhanced tyrosine phosphorylation. *FEBS Lett.* **353**, 217-220.

Klebanoff, S. J. (1970) Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes. *Science* **169**, 1095-1097.

Kuchay, S. M., Kim, N., Grunz, E. A., Fay, W. P., y Chishti, A. H. (2007) Double knockouts reveal that protein tyrosine phosphatase 1B is a physiological target of calpain-1 in platelets. *Mol.Cell Biol.* **27**, 6038-6052.

Kudin, A. P., Malinska, D., y Kunz, W. S. (2008) Sites of generation of reactive oxygen species in homogenates of brain tissue determined with the use of respiratory substrates and inhibitors. *Biochim.Biophys.Acta* **1777**, 689-695.

Kwon, J., Lee, S. R., Yang, K. S., Ahn, Y., Kim, Y. J., Stadtman, E. R., y Rhee, S. G. (2004) Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**, 16419-16424.

Kwon, J., Qu, C. K., Maeng, J. S., Falahati, R., Lee, C., y Williams, M. S. (2005) Receptor-stimulated oxidation of SHP-2 promotes T-cell adhesion through SLP-76-ADAP. *EMBO J.* **24**, 2331-2341.

Lacy, F., Gough, D. A., y Schmid-Schonbein, G. W. (1998) Role of xanthine oxidase in hydrogen peroxide production. *Free Radic.Biol.Med.* **25**, 720-727.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

- Lam, L. T., Ronchini, C., Norton, J., Capobianco, A. J., y Bresnick, E. H.** (2000) Suppression of erythroid but not megakaryocytic differentiation of human K562 erythroleukemic cells by notch-1. *J.Biol.Chem.* **275**, 19676-19684.
- Lambert, A. J., Buckingham, J. A., Boysen, H. M., y Brand, M. D.** (2008) Diphenyleneiodonium acutely inhibits reactive oxygen species production by mitochondrial complex I during reverse, but not forward electron transport. *Biochim.Biophys.Acta* **1777**, 397-403.
- Lambeth, J. D.** (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat.Rev.Immunol.* **4**, 181-189.
- Leary, J. F., Farley, B. A., Giuliano, R., Kosciolk, B. A., La Bella, S., y Rowley, P. T.** (1987) Induction of megakaryocytic characteristics in human leukemic cell line K562: polyploidy, inducers, and secretion of mitogenic activity. *J.Biol.Regul.Homeost.Agents* **1**, 73-80.
- Lecine, P. y Shivdasani, R. A.** (1998) Cellular and molecular biology of megakaryocyte differentiation in the absence of lineage-restricted transcription factors. *Stem Cells* **16 Suppl 2**, 91-95.
- Lee, S. H., Shin, M. S., Lee, H. S., Bae, J. H., Lee, H. K., Kim, H. S., Kim, S. Y., Jang, J. J., Joo, M., Kang, Y. K., Park, W. S., Park, J. Y., Oh, R. R., Han, S. Y., Lee, J. H., Kim, S. H., Lee, J. Y., y Yoo, N. J.** (2001) Expression of Fas and Fas-related molecules in human hepatocellular carcinoma. *Hum.Pathol.* **32**, 250-256.
- Lee, S. R., Kwon, K. S., Kim, S. R., y Rhee, S. G.** (1998) Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J.Biol.Chem.* **273**, 15366-15372.
- Leto, T. L., Adams, A. G., y de, M., I.** (1994) Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 10650-10654.
- Levinthal, D. J. y Defranco, D. B.** (2005) Reversible oxidation of ERK-directed protein phosphatases drives oxidative toxicity in neurons. *J.Biol.Chem.* **280**, 5875-5883.
- Li, J., Xia, Y., y Kuter, D. J.** (1999) Interaction of thrombopoietin with the platelet c-mpl receptor in plasma: binding, internalization, stability and pharmacokinetics. *Br.J.Haematol.* **106**, 345-356.
- Li, Y., Kanki, H., Hachiya, T., Ohyama, T., Irie, S., Tang, G., Mukai, J., y Sato, T.** (2000) Negative regulation of Fas-mediated apoptosis by FAP-1 in human cancer cells. *Int.J.Cancer* **87**, 473-479.
- Lin, D., Gish, G. D., Songyang, Z., y Pawson, T.** (1999) The carboxyl terminus of B class ephrins constitutes a PDZ domain binding motif. *J.Biol.Chem.* **274**, 3726-3733.

Livnah, O., Stura, E. A., Middleton, S. A., Johnson, D. L., Jolliffe, L. K., y Wilson, I. A. (1999) Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science* **283**, 987-990.

Lobatto, S., Daha, M. R., Voetman, A. A., Evers-Schouten, J. H., Van Es, A. A., Pauwels, E. K., y Van Es, L. A. (1987) Clearance of soluble aggregates of human immunoglobulin G in healthy volunteers and chimpanzees. *Clin.Exp.Immunol.* **69**, 133-141.

Logan, T. M., Zhou, M. M., Nettesheim, D. G., Meadows, R. P., Van Etten, R. L., y Fesik, S. W. (1994) Solution structure of a low molecular weight protein tyrosine phosphatase. *Biochemistry* **33**, 11087-11096.

Lohse, D. L., Denu, J. M., Santoro, N., y Dixon, J. E. (1997) Roles of aspartic acid-181 and serine-222 in intermediate formation and hydrolysis of the mammalian protein-tyrosine-phosphatase PTP1. *Biochemistry* **36**, 4568-4575.

Long, M. W., Heffner, C. H., Williams, J. L., Peters, C., y Prochownik, E. V. (1990) Regulation of megakaryocyte phenotype in human erythroleukemia cells. *J.Clin.Invest* **85**, 1072-1084.

Lorenzen, J. A., Dadabay, C. Y., y Fischer, E. H. (1995) COOH-terminal sequence motifs target the T cell protein tyrosine phosphatase to the ER and nucleus. *J.Cell Biol.* **131**, 631-643.

Loschen, G., Azzi, A., y Flohe, L. (1973) Mitochondrial H₂O₂ formation: relationship with energy conservation. *FEBS Lett.* **33**, 84-87.

Lumelsky, N. L. y Schwartz, B. S. (1997) Protein kinase C in erythroid and megakaryocytic differentiation: possible role in lineage determination. *Biochim.Biophys.Acta* **1358**, 79-92.

Maekawa, K., Imagawa, N., Nagamatsu, M., y Harada, S. (1994) Molecular cloning of a novel protein-tyrosine phosphatase containing a membrane-binding domain and GLGF repeats. *FEBS Lett.* **337**, 200-206.

Maekawa, K., Imagawa, N., Naito, A., Harada, S., Yoshie, O., y Takagi, S. (1999) Association of protein-tyrosine phosphatase PTP-BAS with the transcription-factor-inhibitory protein I κ B α through interaction between the PDZ1 domain and ankyrin repeats. *Biochem.J.* **337 (Pt 2)**, 179-184.

Mahadev, K., Zilbering, A., Zhu, L., y Goldstein, B. J. (2001) Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade. *J.Biol.Chem.* **276**, 21938-21942.

Martin, D. I. y Orkin, S. H. (1990) Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/NF-E1/Eryf 1. *Genes Dev.* **4**, 1886-1898.

Martyn, K. D., Frederick, L. M., von Loehneysen, K., Dinauer, M. C., y Knaus, U. G. (2006) Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal*. **18**, 69-82.

McCord, J. M. (1985) Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N.Engl.J.Med.* **312**, 159-163.

Meister, A. (1988) Glutathione metabolism and its selective modification. *J.Biol.Chem.* **263**, 17205-17208.

Meng, T. C., Buckley, D. A., Galic, S., Tiganis, T., y Tonks, N. K. (2004) Regulation of insulin signaling through reversible oxidation of the protein-tyrosine phosphatases TC45 and PTP1B. *J.Biol.Chem.* **279**, 37716-37725.

Meng, T. C., Fukada, T., y Tonks, N. K. (2002) Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol.Cell* **9**, 387-399.

Miyamoto, K., Araki, K. Y., Naka, K., Arai, F., Takubo, K., Yamazaki, S., Matsuoka, S., Miyamoto, T., Ito, K., Ohmura, M., Chen, C., Hosokawa, K., Nakauchi, H., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Harada, M., Motoyama, N., Suda, T., y Hirao, A. (2007) Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell* **1**, 101-112.

Miyano, K. y Sumimoto, H. (2007) Role of the small GTPase Rac in p22phox-dependent NADPH oxidases. *Biochimie* **89**, 1133-1144.

Moller, N. P., Moller, K. B., Lammers, R., Kharitonov, A., Sures, I., y Ullrich, A. (1994) Src kinase associates with a member of a distinct subfamily of protein-tyrosine phosphatases containing an ezrin-like domain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 7477-7481.

Morrison, S. J. y Spradling, A. C. (2008) Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* **132**, 598-611.

Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J.Immunol.Methods* **65**, 55-63.

Murthy, K. K., Clark, K., Fortin, Y., Shen, S. H., y Banville, D. (1999) ZRP-1, a zyxin-related protein, interacts with the second PDZ domain of the cytosolic protein tyrosine phosphatase hPTP1E. *J.Biol.Chem.* **274**, 20679-20687.

Mustelin, T., Feng, G. S., Bottini, N., Alonso, A., Kholod, N., Birle, D., Merlo, J., y Huynh, H. (2002) Protein tyrosine phosphatases. *Front Biosci.* **7**, d85-142.

Mustelin, T., Vang, T., y Bottini, N. (2005) Protein tyrosine phosphatases and the immune response. *Nat.Rev.Immunol.* **5**, 43-57.

Naka, K., Ohmura, M., y Hirao, A. (2007) Regulation of the self-renewal ability of tissue stem cells by tumor-related genes. *Cancer Biomark.* **3**, 193-201.

Nakahira, M., Tanaka, T., Robson, B. E., Mizgerd, J. P., y Grusby, M. J. (2007) Regulation of signal transducer and activator of transcription signaling by the tyrosine phosphatase PTP-BL. *Immunity.* **26**, 163-176.

Nakamura, H., Nakamura, K., y Yodoi, J. (1997) Redox regulation of cellular activation. *Annu.Rev.Immunol.* **15**, 351-369.

Naughton, R., Quiney, C., Turner, S. D., y Cotter, T. G. (2009) Bcr-Abl-mediated redox regulation of the PI3K/AKT pathway. *Leukemia*

Nauseef, W. M. (2008) Biological roles for the NOX family NADPH oxidases. *J.Biol.Chem.* **283**, 16961-16965.

Nichols, K. E., Crispino, J. D., Poncz, M., White, J. G., Orkin, S. H., Maris, J. M., y Weiss, M. J. (2000) Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. *Nat.Genet.* **24**, 266-270.

Nimnual, A. S., Taylor, L. J., y Bar-Sagi, D. (2003) Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat.Cell Biol.* **5**, 236-241.

Nishizuka, Y. (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **258**, 607-614.

O'Connell, J., Bennett, M. W., O'Sullivan, G. C., Roche, D., Kelly, J., Collins, J. K., y Shanahan, F. (1998) Fas ligand expression in primary colon adenocarcinomas: evidence that the Fas counterattack is a prevalent mechanism of immune evasion in human colon cancer. *J.Pathol.* **186**, 240-246.

Ohtsuka, T., Ryu, H., Minamishima, Y. A., Macip, S., Sagara, J., Nakayama, K. I., Aaronson, S. A., y Lee, S. W. (2004) ASC is a Bax adaptor and regulates the p53-Bax mitochondrial apoptosis pathway. *Nat.Cell Biol.* **6**, 121-128.

Orkin, S. H. y Zon, L. I. (2002) Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity. *Nat.Immunol.* **3**, 323-328.

Orkin, S. H. y Zon, L. I. (2008) Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* **132**, 631-644.

Ostergaard, H., Tachibana, C., y Winther, J. R. (2004) Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol. *J.Cell Biol.* **166**, 337-345.

Owusu-Ansah, E. y Banerjee, U. (2009) Reactive oxygen species prime Drosophila haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature* **461**, 537-541.

Paffenholz, R., Bergstrom, R. A., Pasutto, F., Wabnitz, P., Munroe, R. J., Jagla, W., Heinzmann, U., Marquardt, A., Bareiss, A., Laufs, J., Russ, A., Stumm, G., Schimenti, J. C., y Bergstrom, D. E. (2004) Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase. *Genes Dev.* **18**, 486-491.

Paling, N. R. y Welham, M. J. (2005) Tyrosine phosphatase SHP-1 acts at different stages of development to regulate hematopoiesis. *Blood* **105**, 4290-4297.

Palmer, A., Zimmer, M., Erdmann, K. S., Eulenburg, V., Porthin, A., Heumann, R., Deutsch, U., y Klein, R. (2002) EphrinB phosphorylation and reverse signaling: regulation by Src kinases and PTP-BL phosphatase. *Mol.Cell* **9**, 725-737.

Pang, L., Weiss, M. J., y Poncz, M. (2005) Megakaryocyte biology and related disorders. *J.Clin.Invest* **115**, 3332-3338.

Papayannopoulou, T., Yokochi, T., Nakamoto, B., y Martin, P. (1983) The surface antigen profile of HEL cells. *Prog.Clin.Biol.Res.* **134**, 277-292.

Paravicini, T. M. y Touyz, R. M. (2008) NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* **31 Suppl 2**, S170-S180.

Perisic, O., Wilson, M. I., Karathanassis, D., Bravo, J., Pacold, M. E., Ellson, C. D., Hawkins, P. T., Stephens, L., y Williams, R. L. (2004) The role of phosphoinositides and phosphorylation in regulation of NADPH oxidase. *Adv.Enzyme Regul.* **44**, 279-298.

Persson, C., Savenhed, C., Bourdeau, A., Tremblay, M. L., Markova, B., Bohmer, F. D., Haj, F. G., Neel, B. G., Elson, A., Heldin, C. H., Ronnstrand, L., Ostman, A., y Hellberg, C. (2004) Site-selective regulation of platelet-derived growth factor beta receptor tyrosine phosphorylation by T-cell protein tyrosine phosphatase. *Mol.Cell Biol.* **24**, 2190-2201.

Pevny, L., Simon, M. C., Robertson, E., Klein, W. H., Tsai, S. F., D'Agati, V., Orkin, S. H., y Costantini, F. (1991) Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* **349**, 257-260.

Poyton, R. O., Ball, K. A., y Castello, P. R. (2009) Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol.Metab* **20**, 332-340.

Pulido, R. y Hooft, v. H. (2008) Protein tyrosine phosphatases: dual-specificity phosphatases in health and disease. *FEBS J.* **275**, 848-866.

Qu, C. K., Nguyen, S., Chen, J., y Feng, G. S. (2001) Requirement of Shp-2 tyrosine phosphatase in lymphoid and hematopoietic cell development. *Blood* **97**, 911-914.

Qu, C. K., Yu, W. M., Azzarelli, B., Cooper, S., Broxmeyer, H. E., y Feng, G. S. (1998) Biased suppression of hematopoiesis and multiple developmental defects in chimeric mice containing Shp-2 mutant cells. *Mol.Cell Biol.* **18**, 6075-6082.

Racke, F. K., Lewandowska, K., Goueli, S., y Goldfarb, A. N. (1997) Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway is required for megakaryocytic differentiation of K562 cells. *J.Biol.Chem.* **272**, 23366-23370.

Racke, F. K., Wang, D., Zaidi, Z., Kelley, J., Visvader, J., Soh, J. W., y Goldfarb, A. N. (2001) A potential role for protein kinase C-epsilon in regulating megakaryocytic lineage commitment. *J.Biol.Chem.* **276**, 522-528.

Rahman, I. (1999) Inflammation and the regulation of glutathione level in lung epithelial cells. *Antioxid.Redox.Signal.* **1**, 425-447.

Rahman, I. y MacNee, W. (2000) Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur.Respir.J.* **16**, 534-554.

Rebrin, I., Bayne, A. C., Mockett, R. J., Orr, W. C., y Sohal, R. S. (2004) Free aminothiols, glutathione redox state and protein mixed disulphides in aging *Drosophila melanogaster*. *Biochem.J.* **382**, 131-136.

Rehli, M., Poltorak, A., Schwarzfischer, L., Krause, S. W., Andreesen, R., y Beutler, B. (2000) PU.1 and interferon consensus sequence-binding protein regulate the myeloid expression of the human Toll-like receptor 4 gene. *J.Biol.Chem.* **275**, 9773-9781.

Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W. S., y Khvorova, A. (2004) Rational siRNA design for RNA interference. *Nat.Biotechnol.* **22**, 326-330.

Rossi, F. y Zatti, M. (1964) Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. *Experientia* **20**, 21-23.

Roum, J. H., Buhl, R., McElvaney, N. G., Borok, Z., y Crystal, R. G. (1993) Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis. *J.Appl.Physiol* **75**, 2419-2424.

Rouser, G., Fkeischer, S., y Yamamoto, A. (1970) Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* **5**, 494-496.

Sabath, D. F., Kaushansky, K., y Broudy, V. C. (1999) Deletion of the extracellular membrane-distal cytokine receptor homology module of Mpl results in constitutive cell growth and loss of thrombopoietin binding. *Blood* **94**, 365-367.

Saharinen, P., Vihinen, M., y Silvennoinen, O. (2003) Autoinhibition of Jak2 tyrosine kinase is dependent on specific regions in its pseudokinase domain. *Mol.Biol.Cell* **14**, 1448-1459.

Salgado, C., Urbano-Ispizua, A., Rozman, C., Sierra, J., Carreras, E., y Montserrat, E. (1995) Interleukin-2 after T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **85**, 600-601.

Salmeen, A. y Barford, D. (2005) Functions and mechanisms of redox regulation of cysteine-based phosphatases. *Antioxid.Redox.Signal.* **7**, 560-577.

Salter, M. W. (1998) Src, N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, and synaptic plasticity. *Biochem.Pharmacol.* **56**, 789-798.

Sap, J., Jiang, Y. P., Friedlander, D., Grumet, M., y Schlessinger, J. (1994) Receptor tyrosine phosphatase R-PTP-kappa mediates homophilic binding. *Mol.Cell Biol.* **14**, 1-9.

Saras, J., Claesson-Welsh, L., Heldin, C. H., y Gonez, L. J. (1994) Cloning and characterization of PTPL1, a protein tyrosine phosphatase with similarities to cytoskeletal-associated proteins. *J.Biol.Chem.* **269**, 24082-24089.

Saras, J., Franzen, P., Aspenstrom, P., Hellman, U., Gonez, L. J., y Heldin, C. H. (1997) A novel GTPase-activating protein for Rho interacts with a PDZ domain of the protein-tyrosine phosphatase PTPL1. *J.Biol.Chem.* **272**, 24333-24338.

Sato, T., Irie, S., Kitada, S., y Reed, J. C. (1995) FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science* **268**, 411-415.

Sattler, M., Winkler, T., Verma, S., Byrne, C. H., Shrikhande, G., Salgia, R., y Griffin, J. D. (1999) Hematopoietic growth factors signal through the formation of reactive oxygen species. *Blood* **93**, 2928-2935.

Saugstad, O. D. (1997) Bronchopulmonary dysplasia and oxidative stress: are we closer to an understanding of the pathogenesis of BPD? *Acta Paediatr.* **86**, 1277-1282.

Saxena, M. y Mustelin, T. (2000) Extracellular signals and scores of phosphatases: all roads lead to MAP kinase. *Semin.Immunol.* **12**, 387-396.

Schievella, A. R., Paige, L. A., Johnson, K. A., Hill, D. E., y Erikson, R. L. (1993) Protein tyrosine phosphatase 1B undergoes mitosis-specific phosphorylation on serine. *Cell Growth Differ.* **4**, 239-246.

Schofield, R. (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4**, 7-25.

Schonwasser, D. C., Marais, R. M., Marshall, C. J., y Parker, P. J. (1998) Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-

regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isoforms. *Mol. Cell Biol.* **18**, 790-798.

Seo, J. H., Ahn, Y., Lee, S. R., Yeol, Y. C., y Chung, H. K. (2005) The major target of the endogenously generated reactive oxygen species in response to insulin stimulation is phosphatase and tensin homolog and not phosphoinositide-3 kinase (PI-3 kinase) in the PI-3 kinase/Akt pathway. *Mol. Biol. Cell* **16**, 348-357.

Sheng, M. y Sala, C. (2001) PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 1-29.

Shivdasani, R. A. (2001) Molecular and transcriptional regulation of megakaryocyte differentiation. *Stem Cells* **19**, 397-407.

Siminovitch, K. A. y Neel, B. G. (1998) Regulation of B cell signal transduction by SH2-containing protein-tyrosine phosphatases. *Semin. Immunol.* **10**, 329-347.

Singh, D. K., Kumar, D., Siddiqui, Z., Basu, S. K., Kumar, V., y Rao, K. V. (2005) The strength of receptor signaling is centrally controlled through a cooperative loop between Ca²⁺ and an oxidant signal. *Cell* **121**, 281-293.

Smilowitz, H. M., Aramli, L., Xu, D., y Epstein, P. M. (1991) Phosphotyrosine phosphatase activity in human platelets. *Life Sci.* **49**, 29-37.

Song, E., Chen, J., Ouyang, N., Su, F., Wang, M., y Heemann, U. (2001) Soluble Fas ligand released by colon adenocarcinoma cells induces host lymphocyte apoptosis: an active mode of immune evasion in colon cancer. *Br. J. Cancer* **85**, 1047-1054.

Sorio, C., Melotti, P., D'Arcangelo, D., Mendrola, J., Calabretta, B., Croce, C. M., y Huebner, K. (1997) Receptor protein tyrosine phosphatase gamma, Ptp gamma, regulates hematopoietic differentiation. *Blood* **90**, 49-57.

St Pierre, J., Buckingham, J. A., Roebuck, S. J., y Brand, M. D. (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.* **277**, 44784-44790.

Stolk, J., Hiltermann, T. J., Dijkman, J. H., y Verhoeven, A. J. (1994) Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **11**, 95-102.

Stross, C., Radtke, S., Clahsen, T., Gerlach, C., Volkmer-Engert, R., Schaper, F., Heinrich, P. C., y Hermanns, H. M. (2006) Oncostatin M receptor-mediated signal transduction is negatively regulated by SOCS3 through a receptor tyrosine-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* **281**, 8458-8468.

STRUMIA, M. M., BLAKE, A. D., Jr., y WICKS, W. A. (1947) The preservation of whole blood. *J.Clin.Invest* **26**, 667-671.

Sun, J. y Trumpower, B. L. (2003) Superoxide anion generation by the cytochrome bc1 complex. *Arch.Biochem.Biophys.* **419**, 198-206.

Sutherland, J. A., Turner, A. R., Mannoni, P., McGann, L. E., y Turc, J. M. (1986) Differentiation of K562 leukemia cells along erythroid, macrophage, and megakaryocyte lineages. *J.Biol.Response Mod.* **5**, 250-262.

Swarup, G., Cohen, S., y Garbers, D. L. (1982) Inhibition of membrane phosphotyrosyl-protein phosphatase activity by vanadate. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **107**, 1104-1109.

Swiatecka-Urban, A., Duhaime, M., Coutermarsh, B., Karlson, K. H., Collawn, J., Milewski, M., Cutting, G. R., Guggino, W. B., Langford, G., y Stanton, B. A. (2002) PDZ domain interaction controls the endocytic recycling of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J.Biol.Chem.* **277**, 40099-40105.

Szalai, G., LaRue, A. C., y Watson, D. K. (2006) Molecular mechanisms of megakaryopoiesis. *Cell Mol.Life Sci.* **63**, 2460-2476.

Tabilio, A., Pelicci, P. G., Vinci, G., Mannoni, P., Civin, C. I., Vainchenker, W., Testa, U., Lipinski, M., Rochant, H., y Breton-Gorius, J. (1983) Myeloid and megakaryocytic properties of K-562 cell lines. *Cancer Res.* **43**, 4569-4574.

Taniguchi, Y., London, R., Schinkmann, K., Jiang, S., y Avraham, H. (1999) The receptor protein tyrosine phosphatase, PTP-RO, is upregulated during megakaryocyte differentiation and is associated with the c-Kit receptor. *Blood* **94**, 539-549.

Tetteroo, P. A., Massaro, F., Mulder, A., Schreuder-van Gelder, R., y dem Borne, A. E. (1984) Megakaryoblastic differentiation of proerythroblastic K562 cell-line cells. *Leuk.Res.* **8**, 197-206.

Tirone, F. y Cox, J. A. (2007) NADPH oxidase 5 (NOX5) interacts with and is regulated by calmodulin. *FEBS Lett.* **581**, 1202-1208.

Tonks, N. K. (2003) PTP1B: from the sidelines to the front lines! *FEBS Lett.* **546**, 140-148.

Tonks, N. K. (2006) Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **7**, 833-846.

Tonks, N. K., Diltz, C. D., y Fischer, E. H. (1988) Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J.Biol.Chem.* **263**, 6731-6737.

Tonks, N. K., Diltz, C. D., y Fischer, E. H. (1990) CD45, an integral membrane protein tyrosine phosphatase. Characterization of enzyme activity. *J.Biol.Chem.* **265**, 10674-10680.

Tothova, Z. y Gilliland, D. G. (2007) FoxO transcription factors and stem cell homeostasis: insights from the hematopoietic system. *Cell Stem Cell* **1**, 140-152.

Tothova, Z., Kollipara, R., Huntly, B. J., Lee, B. H., Castrillon, D. H., Cullen, D. E., McDowell, E. P., Lazo-Kallanian, S., Williams, I. R., Sears, C., Armstrong, S. A., Passegue, E., DePinho, R. A., y Gilliland, D. G. (2007) FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell* **128**, 325-339.

Tsang, A. P., Visvader, J. E., Turner, C. A., Fujiwara, Y., Yu, C., Weiss, M. J., Crossley, M., y Orkin, S. H. (1997) FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell* **90**, 109-119.

Tsui, F. W. y Tsui, H. W. (1994) Molecular basis of the motheaten phenotype. *Immunol.Rev.* **138**, 185-206.

Tsuji, F., Miyake, Y., Aono, H., Kawashima, Y., y Mita, S. (1999) Effects of bucillamine and N-acetyl-L-cysteine on cytokine production and collagen-induced arthritis (CIA). *Clin.Exp.Immunol.* **115**, 26-31.

Turrens, J. F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J.Physiol* **552**, 335-344.

Ueda, Y., Hirai, S., Osada, S., Suzuki, A., Mizuno, K., y Ohno, S. (1996) Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *J.Biol.Chem.* **271**, 23512-23519.

Ushio-Fukai, M. (2009) Compartmentalization of redox signaling through NADPH oxidase-derived ROS. *Antioxid.Redox.Signal.* **11**, 1289-1299.

Vaccarino, F., Guidotti, A., y Costa, E. (1987) Ganglioside inhibition of glutamate-mediated protein kinase C translocation in primary cultures of cerebellar neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84**, 8707-8711.

Vainchenker, W., Debili, N., Mouthon, M. A., y Wendling, F. (1995) Megakaryocytopoiesis: cellular aspects and regulation. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* **20**, 165-192.

van Acker, S. A., Koymans, L. M., y Bast, A. (1993) Molecular pharmacology of vitamin E: structural aspects of antioxidant activity. *Free Radic.Biol.Med.* **15**, 311-328.

Van Der, W. T., Blanchetot, C., Overvoorde, J., y Den Hertog, J. (2003) Redox-regulated rotational coupling of receptor protein-tyrosine phosphatase alpha dimers. *J.Biol.Chem.* **278**, 13968-13974.

Van Der, W. T., Overvoorde, J., y Den Hertog, J. (2004) H₂O₂ induced intermolecular disulfide bond formation between receptor protein-tyrosine phosphatases. *J.Biol.Chem.*

Vejrazka, M., Micek, R., y Stipek, S. (2005) Apocynin inhibits NADPH oxidase in phagocytes but stimulates ROS production in non-phagocytic cells. *Biochim.Biophys.Acta* **1722**, 143-147.

Vidal Cardalda, M. (2006) Identificación y caracterización de PTP-Bas en plaquetas humanas y ovinas. *Trabajo de Grado de la Universidad de Salamanca.Dpto Bioquímica y Biología Molecular*

Villa, F., Deak, M., Bloomberg, G. B., Alessi, D. R., y Van Aalten, D. M. (2005) Crystal structure of the PTPL1/FAP-1 human tyrosine phosphatase mutated in colorectal cancer: evidence for a second phosphotyrosine substrate recognition pocket. *J.Biol.Chem.* **280**, 8180-8187.

von Reyher, U., Strater, J., Kittstein, W., Gschwendt, M., Krammer, P. H., y Moller, P. (1998) Colon carcinoma cells use different mechanisms to escape CD95-mediated apoptosis. *Cancer Res.* **58**, 526-534.

Wang, I. M., Contursi, C., Masumi, A., Ma, X., Trinchieri, G., y Ozato, K. (2000) An IFN-gamma-inducible transcription factor, IFN consensus sequence binding protein (ICSBP), stimulates IL-12 p40 expression in macrophages. *J.Immunol.* **165**, 271-279.

Wang, J. y Bixby, J. L. (1999) Receptor tyrosine phosphatase-delta is a homophilic, neurite-promoting cell adhesion molecular for CNS neurons. *Mol.Cell Neurosci.* **14**, 370-384.

Wang, J. F., Liu, Z. Y., y Groopman, J. E. (1998) The alpha-chemokine receptor CXCR4 is expressed on the megakaryocytic lineage from progenitor to platelets and modulates migration and adhesion. *Blood* **92**, 756-764.

Wansink, D. G., Peters, W., Schaafsma, I., Suttmuller, R. P., Oerlemans, F., Adema, G. J., Wieringa, B., van der Zee, C. E., y Hendriks, W. (2004) Mild impairment of motor nerve repair in mice lacking PTP-BL tyrosine phosphatase activity. *Physiol Genomics* **19**, 50-60.

Whalen, A. M., Galasinski, S. C., Shapiro, P. S., Nahreini, T. S., y Ahn, N. G. (1997) Megakaryocytic differentiation induced by constitutive activation of mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol.Cell Biol.* **17**, 1947-1958.

Wickrema, A., Chen, F., Namin, F., Yi, T., Ahmad, S., Uddin, S., Chen, Y. H., Feldman, L., Stock, W., Hoffman, R., y Platanias, L. C. (1999) Defective expression of the SHP-1 phosphatase in polycythemia vera. *Exp.Hematol.* **27**, 1124-1132.

Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R., y Turner, N. D. (2004) Glutathione metabolism and its implications for health. *J.Nutr.* **134**, 489-492.

Wu, R. F., Xu, Y. C., Ma, Z., Nwariaku, F. E., Sarosi, G. A., Jr., y Terada, L. S. (2005) Subcellular targeting of oxidants during endothelial cell migration. *J.Cell Biol.* **171**, 893-904.

Xie, Y., Yin, T., Wiegraebe, W., He, X. C., Miller, D., Stark, D., Perko, K., Alexander, R., Schwartz, J., Grindley, J. C., Park, J., Haug, J. S., Wunderlich, J. P., Li, H., Zhang, S., Johnson, T., Feldman, R. A., y Li, L. (2009) Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. *Nature* **457**, 97-101.

Xu, Y., Shao, Y., Voorhees, J. J., y Fisher, G. J. (2006) Oxidative inhibition of receptor-type protein-tyrosine phosphatase kappa by ultraviolet irradiation activates epidermal growth factor receptor in human keratinocytes. *J.Biol.Chem.* **281**, 27389-27397.

Yamamoto, T., Sakaguchi, N., Hachiya, M., Nakayama, F., Yamakawa, M., y Akashi, M. (2009) Role of catalase in monocytic differentiation of U937 cells by TPA: hydrogen peroxide as a second messenger. *Leukemia* **23**, 761-769.

Yamamoto, T., Sekine, Y., Kashima, K., Kubota, A., Sato, N., Aoki, N., y Matsuda, T. (2002) The nuclear isoform of protein-tyrosine phosphatase TC-PTP regulates interleukin-6-mediated signaling pathway through STAT3 dephosphorylation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **297**, 811-817.

Yi, T., Cleveland, J. L., y Ihle, J. N. (1991) Identification of novel protein tyrosine phosphatases of hematopoietic cells by polymerase chain reaction amplification. *Blood* **78**, 2222-2228.

Yoshida, S., Harada, H., Nagai, H., Fukino, K., Teramoto, A., y Emi, M. (2002) Head-to-head juxtaposition of Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1) and c-Jun NH2-terminal kinase 3 (JNK3) genes: genomic structure and seven polymorphisms of the FAP-1 gene. *J.Hum.Genet.* **47**, 614-619.

You, T., Muise, E. S., Itie, A., Michaliszyn, E., Wagner, J., Jothy, S., Lapp, W. S., y Tremblay, M. L. (1997) Impaired bone marrow microenvironment and immune function in T cell protein tyrosine phosphatase-deficient mice. *J.Exp.Med.* **186**, 683-693.

Yu, X. M., Askalan, R., Keil, G. J., y Salter, M. W. (1997) NMDA channel regulation by channel-associated protein tyrosine kinase Src. *Science* **275**, 674-678.

Zauli, G., Bassini, A., Catani, L., Gibellini, D., Celeghini, C., Borgatti, P., Caramelli, E., Guidotti, L., y Capitani, S. (1996) PMA-induced megakaryocytic differentiation of HEL cells is accompanied by striking modifications of protein kinase C catalytic activity and isoform composition at the nuclear level. *Br.J.Haematol.* **92**, 530-536.

Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W. G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J. Q., Harris, S., Wiedemann, L. M., Mishina, Y., y

Li, L. (2003) Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* **425**, 836-841.

Zhang, Z. Y. y Dixon, J. E. (1993) Active site labeling of the Yersinia protein tyrosine phosphatase: the determination of the pKa of the active site cysteine and the function of the conserved histidine 402. *Biochemistry* **32**, 9340-9345.

Zhang, Z. Y., Wang, Y., y Dixon, J. E. (1994) Dissecting the catalytic mechanism of protein-tyrosine phosphatases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 1624-1627.

Zheng, C., Yang, R., Han, Z., Zhou, B., Liang, L., y Lu, M. (2008) TPO-independent megakaryocytopoiesis. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* **65**, 212-222.

Zhu, Q. S., Xia, L., Mills, G. B., Lowell, C. A., Touw, I. P., y Corey, S. J. (2006) G-CSF induced reactive oxygen species involves Lyn-PI3-kinase-Akt and contributes to myeloid cell growth. *Blood* **107**, 1847-1856.

Zimmermann, P., Meerschaert, K., Reekmans, G., Leenaerts, I., Small, J. V., Vandekerckhove, J., David, G., y Gettemans, J. (2002) PIP(2)-PDZ domain binding controls the association of syntenin with the plasma membrane. *Mol.Cell* **9**, 1215-1225.

