



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"EFECTOS DE LA TRANSFECCION DEL GEN RAS
EN CELULAS HELA"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
BIOLOGO

PRESENTA:

DESIDERIO SALOMON HERNANDEZ GUTIERREZ



MEXICO D.F.

OCTUBRE 1995

FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrin Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Efectos de la transfección del gen ras en células HeLa"
realizado por Hernández Gutiérrez Desiderio Salomón
con número de cuenta 8606664-0 , pasante de la carrera de Biólogo

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	Dr. Emilio Rojas del Castillo
Propietario	Dr. Alejandro Garcia Carrancá
Propietario	Dr. Ignacio Camacho Arroyo
Suplente	Dr. René Cardenas Vazquez
Suplente	Dra. Patricia Ostrosky-Wegman

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Alejandro Martínez Mena

SECRETARÍA DE BIOLÓGICOS

Este trabajo fué realizado en los departamentos de Genética y Toxicología ambiental y Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Emilio Rojas del Castillo.

Este trabajo fué realizado en los departamentos de Genética y Toxicología ambiental y Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. bajo la dirección del Dr. Emilio Rojas del Castillo.

Con mucho cariño a mis
Padres y mis Hermanos,
gracias a su apoyo y
comprensión he logrado
alcanzar una meta.

A mis tios, los que siempre han estado a mi lado.

AGRADECIMIENTOS:

Quiero agradecer profundamente a mi director de tesis Dr. Emilio Rojas del Castillo, al Dr. Alejandro García Carrancá y a la Dra. Patricia Ostrosky Shejet, por darme la oportunidad de trabajar en sus laboratorios.

A los miembros del jurado por la revisión y sugerencias realizadas al trabajo.

Especialmente a mis compañeros y amigos de proyecto Enrique y Carla

A mis compañeros de los dos Labos: Miriam, Mahara, Manuel, Libia, Marce Angelica, Nestor, Paty, Lupita, Luis, Olga, Daniel, Paloma, Anita y Viky

A Silvia, Bety y Eva tres extraordinarias secres

A mis amigos y compañeros de la Fac y de la UVEHC que incondicionalmente brindaron su ayuda para la realización de este trabajo

A todas aquellas personas que de alguna manera participaron en este trabajo

"EFECTOS DE LA TRANSFECCION DEL GEN RAS EN CELULAS HELA"

INTRODUCCION:

GENERALIDADES SOBRE CANCER.....	1
TRANSFERENCIA DE GENES.....	3
CANCER CERVICO-UTERINO (CaCu).....	5
CELULAS HELA: UNA LINEA CELULAR DERIVADA DE UN CaCu	7
ONCOGEN RAS.....	9
CICLO CELULAR.....	5
RAS Y CICLO CELULAR.....	20
METODOS PARA MEDIR CICLO CELULAR.....	23
MATERIAL Y METODOS.....	27
MANTENIMIENTO DE UN CULTIVO DE CELULAS HELA.....	28
TRANSFECCION POR ELECTROPORACION.....	29
SELECCION Y CLONACION	30
PREPARACION DE MUESTRAS PARA ANALISIS POR CITOFUOROMETRIA.....	31
PREPARACION DE LAMINILLAS.....	32
RESULTADOS.....	34
DISCUSION.....	38
CONCLUSION.....	43
REFERENCIAS.....	44

ANEXO A: TABLA DE DATOS

ANEXO B: ANALISIS ESTADISTICO.

RESUMEN.

La mayoría de los esfuerzos en terapia génica se han basado en métodos indirectos para la introducción de nueva información genética dentro de tejidos. En la actualidad existen diversas formas de introducir nueva información genética a un organismo a través del uso de retrovirus, vectores de adenovirus, microproyectiles cubiertos de ADN o ADN encapsulado en liposomas. Para algunas aplicaciones la introducción directa de genes sin la necesidad de utilizar vectores virales, como es el caso de la electroporación, ha sido una herramienta útil para el estudio de la participación de ciertos genes en algunos tipos de cáncer.

Los genes ras codifican proteínas homologas de 21-kD, asociadas internamente a la membrana, donde participan en la transducción de señales de crecimiento y diferenciación celular a través de la unión con GTP. En los mamíferos Ras constituye una familia de tres proto-oncogenes, H-ras, K-ras y N-ras cada uno de los cuales puede adquirir propiedades oncogénicas, con tan solo tener una mutación puntual. Las formas mutadas de los genes ras son prevalentes en muchos tumores tanto humanos como de roedores, también han sido implicados en transformación in vitro, así como en la generación de tumores in vivo.

En este trabajo se estudio el efecto de la transfección del gen H-ras sobre la morfología celular, número cromosómico y alteraciones del ciclo celular en células HeLa.

Los resultados muestran que tanto la electroporación del gen H-ras normal, como el mutado (presenta una mutación en el codon 12 (val/gly)), alteran la morfología de estas células, observándose algunas células gigantes y multinucleadas. Por lo que respecta al número cromosómico, se encontró que la transfección de H-ras (ambas versiones) provoca un aumento en la media de cromosomas de estas células a las 42 y 72 horas de cultivo, estos picos correlacionan con la aparición de las células gigantes y multinucleadas. El análisis del ciclo celular realizado mediante la técnica de citofluorometría mostró que la transfección altera los tiempos de cada fase con respecto a las células no transfectadas y ocasiona un arresto en G2/M. Estas alteraciones son características de un fenómeno conocido como muerte mitótica.

INTRODUCCION.

GENERALIDADES SOBRE CANCER

El cáncer a nivel mundial esta reconocido como un problema importante de salud pública, debido a las frecuencias tan elevadas que ha alcanzado, a su impacto económico y trascendencia social (Registro Nacional del Cáncer). Por ello se ha dado especial atención al problema en los programas de atención médica, de investigación, prevención y epidemiológicos. Algunos estudios epidemiológicos han indicado que entre las causas que pueden desencadenar un proceso carcinogénico se encuentran factores físicos (radiación gamma, UV etc.), químicos (ciertas drogas y compuestos carcinógenos) y biológicos (virus, hormonas)

El cáncer es una enfermedad que tiene múltiples etapas, probablemente de la acumulación de errores producidos por la alteración de los genes, resultado del daño al DNA de diverso tipo. Algunas evidencias que apoyan la idea anterior son las siguientes:

- Predisposición hereditaria al cáncer
- incapacidad de la célula para reparar DNA dañado
- relación entre potencial mutagénico de algunas sustancias y carcinogenicidad
- así como la presencia de oncogenes que están en tumores humanos y que al introducirlos en células normales pueden causar cáncer (Hunter, 1991).

Frente a este problema de salud pública, la ciencia dispone clásicamente de tres medios para tratar de combatirlo, la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. De aquí la importancia de la búsqueda

de nuevas estrategias que ayuden de alguna manera en su control y/o prevención.

a través de millones de años de evolución, la célula ha adquirido y perfeccionado una memoria genética donde está registrada toda la información necesaria para fabricar, con un riguroso control de calidad, todas las proteínas requeridas para sus procesos vitales. Los ácidos nucleicos son el material que contiene esta memoria genética, sin embargo en ocasiones esta memoria puede ser dañada o alterada por los factores ya antes mencionados que conllevan al desarrollo del cáncer. A la vez, el conocimiento de esta memoria genética mediante la aplicación de técnicas de secuenciación, clonación y transferencia de DNA, han tenido un gran impacto en la biología y la medicina, ya que las modificaciones en el DNA producen cambios en la estructura de algunas proteínas afectando su función (Lewin, 1994). El tratar de corregir estas modificaciones en el DNA ha propiciado el diseño de nuevas estrategias basadas en la biología molecular que permitan el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de enfermedades genéticas, infecciosas y de algunos tipos de cáncer, convirtiendo a la terapia génica en un nuevo medio para el combate de enfermedades que como el cáncer es producida por la alteración de los genes.

TRANSFERENCIA DE GENES

La idea de crear una forma de terapia en la que el uso de genes terapéuticamente valiosos se convierta en una herramienta para el combate o control de algunas enfermedades, no es reciente ya que desde hace mucho tiempo la naturaleza ha desarrollado métodos para introducir establemente DNA externo, dentro de células animales por medio de virus y dentro de células vegetales en forma de virus o a través de plásmidos bacterianos. Estas formas de transferencia de material genético han existido aun antes de que la tecnología moderna permitiera la clonación y manipulación de genes in vitro. Cuando se comprendieron los mecanismos de funcionamiento e integración viral y evolucionaron los métodos de clonación y manipulación in vitro, la terapia génica se comenzó a ver de manera mas tangible. (Weissman, 1992).

El tratamiento de enfermedades humanas por medio de transferencia de genes, ya es una realidad. La primera vez que se intentó una terapia génica en humanos fue a fines de 1990, se transfirió el gen de la adenosina desaminasa (ADA) en linfocitos de una paciente que tenia un defecto en el funcionamiento normal de esta enzima lo que le producía una deficiencia inmunológica severa (Anderson, 1992). Este acontecimiento permitió que se desarrollaran nuevos protocolos para el tratamiento con genes.

La mayoría de los esfuerzos en terapia génica se han basado en métodos indirectos para la introducción de nueva información genética dentro de tejidos. Las células blanco se sacan del cuerpo, se infectan con vectores virales que contienen la nueva información y se vuelven a reimplantar. Estos vectores son muy eficientes para terapia

génica en células que se están replicando, pero no infectan a las células que no se dividen, otro problema es el sitio de integración de la nueva secuencia en el genoma, ya que puede ocasionar mutagénesis por inserción. (Anderson, 1992)

En la actualidad existen muchas otras maneras de introducir nueva información genética a un organismo vivo, incluyendo retrovirus, vectores de adenovirus, microproyectiles cubiertos de DNA (William, et al, 1991), DNA encapsulado en liposomas, DNA coprecipitado en fosfato de calcio o DNA unido a un complejo de polilisina glicoproteína (Wolf, et al, 1990).

Para algunas aplicaciones, la introducción directa de los genes, como por ejemplo es el caso de la electroporación, sin la necesidad de utilizar vectores vírales es muy útil y evita algunos problemas que surgen al estar trabajando con virus, ya que al replicar la célula su genoma, también el virus estaría replicando. Con los conocimientos, que se tienen hoy día, sobre este tema; en varias partes del mundo se han diseñado protocolos de investigación, que intentan ver efectos positivos con la transferencia de genes en algunas enfermedades neoplásicas. Dentro de este tipo de enfermedades la más frecuente en la población femenina de los países subdesarrollados es el cáncer cérvico-uterino. (Registro Nacional del Cáncer), y en nuestro país es la primer causa de muerte por cáncer, de aquí la importancia de la búsqueda de nuevas estrategias para su tratamiento.

CANCER CERVICO-UTERINO (CaCU)

En México el CaCu ocupa el primer lugar con un 17% en frecuencia de los casos totales de cáncer y 27% de los tipos de cáncer que se presentan en la mujer (Registro nacional del Cáncer 1991)

Los cambios morfológicos que conllevan cáncer cervico-uterino, presentan tres etapas. Las lesiones preinvasoras e invasoras del cuello uterino, que se presentan como una serie de cambios que generalmente comienzan con una lesión bien diferenciada como displasia leve o lesión precancerosa (NIC I), pasa por una fase menos diferenciada (NIC II o displasia moderada), luego a una lesión intraepitelial indiferenciada (NIC III, displasia severa o carcinoma in situ) y finalmente termina en cáncer invasor cuando las células neoplásicas del epitelio cervical han atravesado la membrana basal e invadido el tejido subyacente (Nelson, et al, 1984). Comúnmente esta variedad de lesiones presentan alteraciones del fenotipo celular como: alargamiento nuclear, hipercromatismo, pleomorfismo, pérdida del relieve celular, cromatina gruesa o burda y principalmente mitosis anormales (aneuploidias), siendo mayores las alteraciones conforme avanzan las etapas (Reid, et al, 1984). Las lesiones se inician en la unión escamocolumnar del cuello uterino, generalmente con lesiones unifocales y permanecen confinadas a ese sitio durante la fase intraepitelial (Burghardt, et al, 1986), aunque la invasión puede ocurrir en cualquier fase del NIC, se cree que se da en el NIC III, considerada una lesión más avanzada y agresiva, sin embargo el riesgo inmediato de invasión aun no se puede predecir (Nelson, et al, 1984; Franceschi, et al, 1986). La transición a lesiones invasoras no es inevitable incluso algunas lesiones regresan o permanecen preinvasoras durante toda la vida, y

solo un porcentaje pequeño progresan a CaCu; 7.5% del NIC I, 15% de NIC II y 25% de NIC III (Reid, et al, 1984). El tiempo de evolución de las lesiones que progresan de NIC I a NIC III es muy variable, generalmente de 10 a 20 años.

Ya desde hace más de diez años Harald zur Hausen sugirió el posible papel de los papilomavirus en la inducción del cáncer cervical. Hoy se sabe que algunos papilomas participan de manera importante en el desarrollo de este tipo de cáncer. El DNA de los papilomavirus tipos 16, 18 y 33 se encuentra integrado en aproximadamente 90% de los carcinomas genitales (Zur Hausen, et al, 1987).

En algunos tumores el virus del papiloma humano (HPV) se ha encontrado insertado cerca de algún oncogen celular (c-myc, c-ras o c-src) (Durst, et al, 1987). Por otra parte en otra serie de CaCu que presentan el HPV se han encontrado amplificados los oncogenes myc y h-ras, por lo que en estos tumores la activación de estos oncogenes celulares pareciera ser importante en algún paso de la progresión tumoral (Taya, et al. 1984). De igual manera podemos encontrar diferentes líneas celulares transformadas, que por tener integrado en su genoma el HPV, son inmortales y podemos cultivarlas fácilmente, como sucede con la línea celular HeLa.

CELULAS HELA: UNA LINEA CELULAR DERIVADA DE UN CÁNCER

En la mayor parte de los carcinomas de las vías genitales y en líneas celulares como HeLa, es evidente la integración del DNA de papilomavirus en una o más regiones de los cromosomas.

Las células HeLa son células tumorigénicas e inmortales derivadas en 1951 de un carcinoma epitelode cervical de una paciente de 31 años llamada Henrietta Lacks. HeLa fue la primer célula aneuploide epitelial derivada de tejidos humanos que se mantuvo continuamente en cultivo, fue aislada por G.O. Gey, W.D. Coffman y M.T. Kubicek en febrero de 1951. Desde su origen ha sido una de las líneas celulares ampliamente estudiadas. Estudios previos han demostrado que el estado tumorigénico está asociado específicamente a la pérdida de una copia de los cromosomas 11 y 14 (Redpath, et al 1986), tiene un cariotipo muy inestable, al observarse rearrreglos cromosómicos en una gran variedad de sublíneas celulares HeLa (Rees, et al 1980). Se ha observado que los cromosomas 1 y 5 son extracopiados, otros cromosomas que pueden ser extracopiados son 7, 9, 12, 16 y 17 (Mamaera, et al, 1986).

Una desventaja para realizar estudios genéticos con líneas establecidas es su inestabilidad cariotípica, las células HeLa son extensivamente heteroploides, tienen un rango de cromosomas que va de 38 a 106 con una moda de 71 (Lewin, 1980). Estas células contienen DNA integrado del papiloma virus tipo 18 en forma no productiva, generalmente amplificados en unas 5-200 copias por célula (Schneider, et al. 1987). De este tipo de papilomas los oncogenes E6 y E7 se transcriben activamente,(Schwart, et al. 1985). Sus productos están involucrados en la inducción y mantenimiento del estado inmortalizado

de las células que contienen la secuencia del HPV; dichos genes se expresan selectivamente en tumores celulares y líneas celulares derivadas de tumores humanos y se conservan intactos durante la integración del DNA viral al genoma celular. (Schwarz,E. et al. 1985; Smolkin,D. et al, 1986), siendo evidente la integración del papiloma en una o más regiones de los cromosomas del huésped a menudo con una disposición en tandem (Broker and Botchan, 1986).

Una característica significativa de estas células es que cuando se fusionan con fibroblastos normales, las células híbridas resultantes ya no presentan el fenotipo maligno (Atkin,N.B.,1988; Srivastava,S. et al,1986).

Se sabe que algunos genes celulares están implicados en el desarrollo del cáncer, a éstos genes se les conoce como oncogenes, que son versiones alteradas de genes normales (los proto-oncogenes) (Bishop,1983). Un oncogen es un gen viral o celular que cuando se introduce a células por infección o transfección puede inducir transformación neoplásica y tumores, son llamados v-onc cuando son acarreados por virus y c-onc cuando pertenecen a una célula .

En diversos tumores humanos encontramos alteraciones en oncogenes, como c-myc, c-myb, c-abl, o c-ras, entre otros. Los mecanismos moleculares que se presentan con mayor frecuencia en este tipo de alteraciones son translocaciones cromosómicas, amplificación génica o mutaciones puntuales (Gariglio, 1987).

ONCOGEN RAS:

Las proteínas ras forman una superfamilia que incluyen más de 50 miembros (Bokoch and Der, 1993; Barbicid, 1987) Con base en las secuencias nucleotídicas, la superfamilia ha sido subdividida en tres grandes grupos cuyos miembros tienen características funcionales semejantes: familia Ras que incluye a las verdaderas proteínas ras, participan en la transducción de señales; familia Rho/Rac involucradas en la organización del citoesqueleto y las proteínas Rab, proteínas que regulan el tráfico membranal, es decir el transporte de vesículas entre diferentes compartimentos intracelulares (Bogusky, M y McCormick, F. 1993).

En los mamíferos la familia Ras esta constituida por tres proto-oncogenes, H-ras, K-ras y N-ras (Der, et al. 1982) cada uno de los cuales puede adquirir propiedades oncogénicas, con tan solo tener una mutación puntual, comúnmente esta se produce en el codon 12 o en el codon 61. (Shimizu, et al. 1983). Las formas mutadas de los genes ras son prevalentes en muchos tumores tanto humanos como de roedores, también han sido implicados en transformación in vitro, así como en la generación de tumores in vivo (Slomon, et al. 1982).

Los genes ras codifican proteínas homologas de 21-kD, unidas internamente a la membrana, donde participan en la transducción de señales de crecimiento y diferenciación celular a través de la unión a GTP, para estar en forma activa (Bogusky, and McCormick, 1993; Zarbi, et al, 1985), viendose incrementada casi en un 100% por la proteína activadora de la GTPasa "GAP" (Trahey, and McCormick, 1987). Quedando en forma inactiva con la hidrólisis del GTP (Bogusky, and McCormick, 1993; Zarbi, et al, 1985; Prendergast and Gibbs, 1993) que es convertido a GDP. La proteína ras funciona como

un switch binario, estando apagado ras esta unido a GDP, esta unión esta localizada en la superficie interna de la membrana, aguardando una señal extracelular que active el sistema para quedar encendido, es decir ras unido a GTP, regresando a un estado inactivo al darse la hidrólisis de esta molécula (Bogusky, and McCormick, 1993).

En la célula hay tres clases de activadores que controlan tanto la unión como la hidrólisis de GTP a la proteína ras. Estos factores reguladores incluyen activadores de GTPasa (GAPs), y dos clases de factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs), los nucleótidos estimuladores de disociación (GDSs) y los nucleótidos inhibidores de disociación (GDIs) (Prendergast and Gibbs, 1993).

La velocidad de intercambio del nucleótido de guanina GDP es regulada por al menos tres familias diferentes de proteínas: mSOS, GRF, y GDS (factores intercambiadores de nucleótidos). Las proteínas mSOS son ubicuas y pueden activar a las tres proteínas ras, GRF también actúa en todas las proteínas ras aunque solo se encuentra en extracto de cerebro, GDS actúa en Ki-ras y otras proteínas relacionadas con ras, pero no afecta a H-ras ni tampoco a N-ras.(Moodie and Wolfman, 1994)

Ras está involucrado y juega un papel muy importante dentro de una gran cascada de señales de fosforilación, sin embargo antes de pasar la señal por ras primero tiene que pasar por factores intercambiadores de nucleótidos como Grb/Sem5, unidos a grupos fosfato de receptores tirosin-cinasa al ser activados por factores de crecimiento; y por proteínas como Sos que llevan a cabo la activación de ras. Esta sorprendente conexión ha sido hecha dawn stream (después de haber pasado primero la señal por ras), una vez que ha sido activada, ras pasa la señal a la proteína raf, ésta a su vez fosforila una segunda cinasa conocida como MAP cinasa (MAPk), esta cinasa y quizá otra no bien identificada mandan señales hacia el

núcleo celular, a través de la fosforilación de factores de transcripción que entre otros, incluyen productos de oncogenes (Egan and Weinberg, 1993).

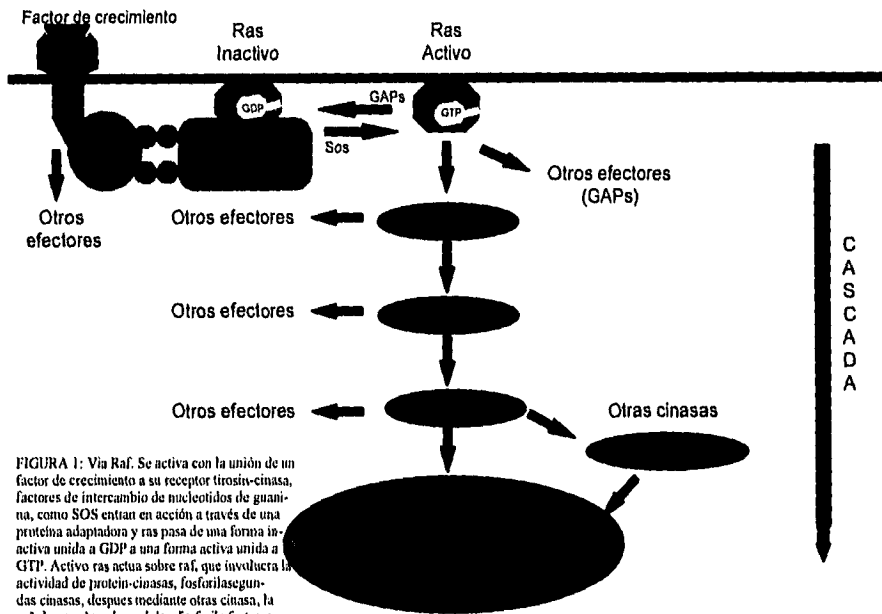


FIGURA 1: Via Raf. Se activa con la unión de un factor de crecimiento a su receptor tirosin-cinasa, factores de intercambio de nucleótidos de guanina, como SOS entran en acción a través de una proteína adaptadora y ras pasa de una forma inactiva unida a GDP a una forma activa unida a GTP. Activo ras actúa sobre raf, que involucra la actividad de protein-cinasas, fosforilasegundas cinasas, después mediante otras cinasa, la señal pasa al núcleo celular, fosforila factores de transcripción que regulan la expresión de algunos genes

Recientes trabajos indican que dentro de la cascada de señalización ras participa en la regulación de dos señales por dos vías; una descrita anteriormente que tiene que ver con procesos de transducción, transcripción y ciclo celular, involucra la actividad mitogénica de las proteínas-cinasas (MAPk), por vía raf. La otra vía se

refiere al control de la organización del citoesqueleto con la participación de las proteínas Rho/Rac que controlan la organización de la actina en la célula. Esta vía para ser activada también necesita ser estimulada por factores de crecimiento, de esta manera las proteínas Rho y Rac pasan de un estado inactivo unido a GDP a un estado activo unido a GTP con la ayuda de factores intercambiadores de nucleótidos de guanina, específicos para cada una de ellas. Formas activas de ras inducen cambios en citoesqueleto a través de los miembros de la familia Rho. La conexión entre ras activado y la vía Rho/Rac es importante por que puede representar una característica crítica que puede diferir entre las funciones de ras normal y su forma oncogénica (Prendergast and Gibbs, 1993), figura 2

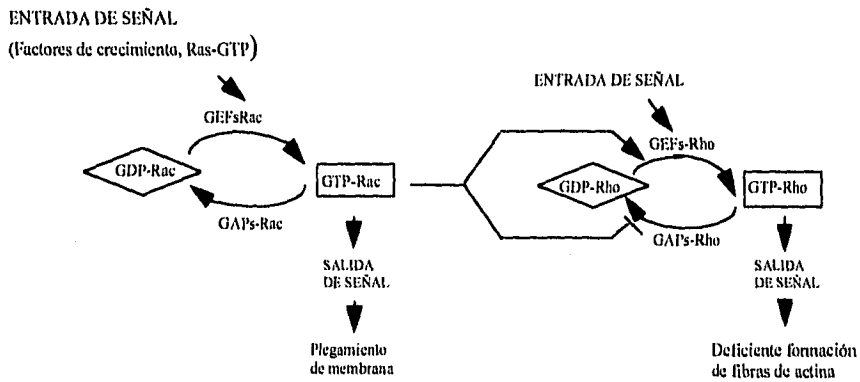


FIGURA 2: VIA Rho-Rac. Se refiere al control de la organización del citoesqueleto. Ras activo, actúa sobre factores intercambiadores de nucleótidos activando a Rac al unirlo a GTP, Rac activo puede actuar sobre factores de intercambio de nucleótidos de Rho para unirlo a GTP y activarlo

En fibroblastos estimulados con factores de crecimiento, Rho es necesaria para regular el ensamble de fibras de actina, así como para la adhesión focal (Ridley and Hall, 1992), y rac es requerida para la formación de plegamientos en la membrana. La inyección de proteínas que bloquean a Rac impide que se de la formación de fibras de estres, por lo que se sugiere que en algunos casos ras pueda funcionar up stream de Rho (antes), durante la cascada de señales producida por ras. (Prendergast and Gibbs 1993; Muller, 1993).

Las proteínas ras tienen una actividad intrínseca de GTPasa, que se ve dañada en los casos de la expresión de los genes una vez que éstos han sido mutados.(Lacal.J. et al,1986). Se ha propuesto que la reducción en la actividad GTPasa, acompañada por la activación de genes ras mutados, daña la función reguladora de las proteínas de ras, además tiene repercusiones de intervención en las señales que controlan la proliferación celular.(Bar-Sagi and Feramisco, 1986).

Formas mutadas de ras las cuales tienen reducida su actividad de GTPasa se han encontrado en aproximadamente un 25% de tumores humanos. Estas formas oncogénicas además tienen reducida grandemente su actividad de GTPasa intracelular y de permanecen siempre encendidos. (Bos, 1990).

Las funciones bioquímicas específicas de las proteínas ras todavía no han sido identificadas. Sin embargo diversos estudios indican que participan en eventos moleculares iniciados por factores de crecimiento (Kamata and Feramisco, 1984). Se sabe que en *Saccharomyces cerevisiae*, ras tiene funciones de sensar las condiciones de nutrientes en el medio y del control del ciclo celular. (Broach, 1991; Powers, 1992). En *Schizosaccharomyces pompe* de ciertas hormonas para el apareamiento así como la meiosis, la esporulación y la forma de la célula, en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, los genes de

ras controlan el desarrollo del ojo. En el nemátodo *Caenorhabditis elegans* participan en el proceso de desarrollo de la vulva (Egan and Weiberg, 1993).

La importancia de los proto-oncogenes se pone de manifiesto al haber sido conservados en el transcurso de la evolución, así por ejemplo sabemos que el gen ras lo encontramos tanto en la levadura como en el hombre (Muller et al 1993). La conservación evolutiva implica que los proto-oncogenes realizan funciones cruciales para la célula. Una vez que un proto-oncogen se convierte en oncogen, puede afectar funciones tan importantes como son los procesos de control, regulación de división y proliferación celular, que se dan en el ciclo celular.

CICLO CELULAR

Un modelo eucarionte donde se ha estudiado muy bien el ciclo celular es en las levaduras (Alberts et al. 1989). En este modelo se sabe que dentro del ciclo celular hay tres eventos perfectamente coordinados, los ciclos citoplasmático, cromosómico, y centrosómico. En el ciclo cromosómico el DNA es duplicado, al mismo tiempo que se alterna con la mitosis, donde las copias duplicadas del genoma son separadas. Mientras tanto en el ciclo citoplasmático, se lleva a cabo un crecimiento celular, un incremento en el volumen celular, conforme se va dando la progresión del ciclo celular, además de la síntesis de muchos otros componentes proteicos, que tienen que ver con la citocinesis, para que la célula pueda dividirse y dar origen a una célula hija, finalmente en el ciclo centrosómico se da la duplicación del aparato mitótico (centriolo y huso acromático) (Alberts et al, 1989). Estos tres eventos están coordinados dentro del propio ciclo celular, es decir en las etapas de interfase y mitosis.

La interfase se divide en tres fases G1, S y G2, mientras que la etapa de división solo comprende la fase M (mitosis). Se ha demostrado que las células con un volumen post-mitótico pequeño requieren mayor tiempo de estancia en G1 para entrar a S, que las que alcanzan un tamaño normal, esto sugiere que el tamaño celular es crucial (Alberts et al, 1989)

En la fase de G1 la actividad biosintética de factores proteicos necesarios para la fase S se encuentra en un rango muy elevado. Al final de la fase G1 hay un punto conocido como punto de restricción (R) que condiciona el progreso hacia la siguiente etapa del ciclo celular, pudiendo ser uno de los múltiples controles que intervienen

directamente en el control de la proliferación celular.(Alberts et.al. , 1989). Este punto llamado R o Z (si se trata de células eucariontes) la célula no requiere de mitógenos para la progresión a través del ciclo y es menos sensible a los inhibidores de síntesis de proteínas. Lo anterior hace pensar que este punto juega un papel clave, al ser un punto de control en la progresión del ciclo celular en mamíferos. (Muller, et al, 1993)

Son muchos los factores y las condiciones que necesita una célula para que crezca y se divida, así por ejemplo, si de un cultivo celular, privamos del medio uno de sus componentes principales como lo es el suero, normalmente las células no pasaran el punto de restricción de G1 ya que se sabe que las células, requieren diferentes proteínas contenidas en el suero y que están directa y específicamente involucradas en el estímulo de la división celular. A estas proteínas se les conoce como factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento neuronal (NGF) entre otros (Alberts et.al., 1989).

La estimulación de las células por medio de mitógenos induce una multitud de cambios rápidos que son mediados por diversas señales a través de las cuales muchos genes se vuelven transcripcionalmente activos, a la vez que otros quedan reprimidos (Pardee,1989). Los mecanismos moleculares por medio de los cuales se regula el crecimiento celular y el metabolismo, en respuesta al estímulo de mitógenos no son muy bien conocidos. (Muller, et al. 1993). Aunque los mecanismos de transducción de señales no son completamente entendidos, algunas de estas vías han sido parcialmente mapeadas en los últimos años. Este progreso ha sido posible debido al descubrimiento de que muchos productos de proto-oncogenes desempeñan una

función crucial dentro de toda esta red de señales. (Williams, 1989; Leever, S.J. and Marshall, 1992).

Más de la mitad de los proto-oncogenes conocidos codifican para enzimas o subunidades de estas, que están directamente involucradas en la transducción de señales desde la membrana citoplasmática hacia el núcleo celular mediada en la mayoría de los casos por proteínas tirosin-cinasa y menos frecuente por serina/treonina-kinasas unidas a GTP (Muller, et al. 1993).

Algunas proteínas transmembranales que sirven como receptores de mitógenos han sido ya identificadas (Ullrich, and Schlessinger, 1990). Muchos de estos receptores son proteínas tirosin-cinasas que actúan en eventos de fosforilación que juegan un papel importante en la transducción de señales mitogénicas hacia el interior de la célula, se sabe muy bien que el receptor inicial que media la fosforilación de una tirosin-cinasa específica dispara una cascada de eventos de fosforilación (Muller, et al 1993; Moodie and Wolfman, 1994).

Las señales extracelulares son reguladas por cinasa (ERKs) o MAP kinasas, estas enzimas constituyen una familia de proteínas serina/treonina que son activadas por diferentes estímulos extracelulares llevando a la célula a la proliferación, diferenciación o activación de funciones celulares específicas, la actividad de las MAPKs está regulada por eventos de fosforilación y desfosforilación (Muller, et al 1993; Egan and Weiberg, 1993).

La fase S comienza cuando la célula da inicio con la replicación de su DNA y termina cuando cada cromosoma tiene su cromátida hermana, durante esta fase el contenido de DNA del núcleo debe ser replicado completamente. El núcleo es inducido a entrar a esta fase del ciclo a través de señales citoplasmáticas. La replicación es bidireccional, se lleva a cabo en múltiples puntos del DNA, conocidos como replicones, en cada uno de los cromosomas. (Laskey 1989).

Durante la fase M los cromosomas duplicados se condensan y son fácilmente vistos con la ayuda de un microscopio óptico, las cromátidas hermanas se separan para formar cada una parte del núcleo de la célula progenitora y de la célula hija. La mitosis es el proceso mediante el cual las células eucariontes aseguran la segregación de sus cromosomas en la división celular. Los eventos clave en la mitosis son 4. a) Profase: Condensación de los cromosomas duplicados, desde un estado disperso y activo hasta una condición compacta adecuada para el transporte. b)Metafase: Una vez que los cromosomas han sido condensados son alineados en el plano ecuatorial en el huso acromático. c)Anafase: Es aquí donde se lleva a cabo la separación de los cromosomas en dos partes idénticas, las cromátidas hermanas. d)Telofase: Se da la cariocinesis, vuelve a aparecer la envoltura nuclear y la descondensación de los cromosomas, para restablecer las condiciones de interfase (McIntosh, J.R and Koonce, 1989).

Los mecanismos de control que ponen en marcha la mitosis, son comunes en todas las células eucariontes, ya que evolutivamente han sido conservados. Estos mecanismos tienen que ver con la formación de complejos específicos proteína-cinasa/ciclina (cdk/cdc) (O'farrell, P. 1989; Nurse, P. 1989).

En el ciclo celular participan una amplia gama de genes, sin embargo, los productos de dos de ellos son muy importantes ya que tienen implicaciones en su regulación así como participación en procesos de proliferación celular (Mercer, W.E., 1992). Estos dos genes conocidos como genes supresores de tumores son p53 (produce una proteína de 53 kD) y pRb (proteína del retinoblastoma) (Standbrige, E.J., 1991)

El gen p53 regula negativamente la división celular, no es esencial para la progresión del ciclo celular pero funciona como

"checkpoint" bloqueando la división incontrolada de la célula (Levin, A. 1992). p53 tiene también la capacidad de regular la expresión de una proteína de 21 kD conocida como cip ó WAF1 que bloquea el complejo cdk/cdc, y de esta manera bloquea la división celular (Marx, J. 1993).

Por otra parte el producto de pRb tiene propiedades como factor regulador del ciclo celular, dependiendo del estado de fosforilación o desfosforilación en el que se encuentre (Buchkovich et al, 1989; DeCaprio et al, 1989; Mihara et al, 1989), actuando como regulador negativo del crecimiento celular en la fase G0/G1; se inactiva por fosforilación en residuos treonina/serina en los límites G1/S, disparando la progresión del ciclo para entrar a la fase S (Munger, K. et al, 1992).

RAS Y CICLO CELULAR

Como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que las proteínas de ras participan en la transducción de diversas señales extracelulares, involucradas en procesos de proliferación, transformación y diferenciación terminal (Barbicid, 1987; Egan, and Weinberg, 1993; Lowy, and Willumsen, 1993). También se ha sugerido que se requiere de las proteínas ras para la progresión del ciclo celular en células epiteliales (Howe, et al 1993).

La estimulación con suero de células confluentes en G0, en cultivo; da como resultado un incremento en los niveles de ras unido a GTP, así como la activación de la cascada de señales de las MAP cinasas (Howe, et al, 1993; ver figura 3). Existen datos que sugieren que por lo menos ras está involucrado en tres diferentes puntos del ciclo celular, uno ubicado en los límites G0/G1, otro a la entrada de la fase S y el tercero en la diferenciación terminal a la salida del ciclo celular (Moodie and Wolfman 1994) ver figura 3.

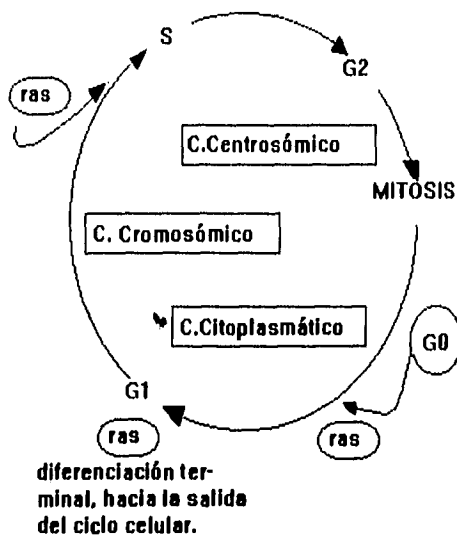


FIGURA 3: Ras y ciclo celular. Dentro del ciclo celular hay tres eventos perfectamente coordinados, estos eventos son el ciclo centrosómico, ciclo cromosómico y ciclo citoplasmático. Ras está involucrado en tres diferentes puntos del ciclo celular el primero en los límites G0/G1, otro a la entrada de la fase S y el tercero a la salida del ciclo celular, hacia la diferenciación terminal.

Hasta aquí es importante reconsiderar algunos puntos importantes donde ras está directamente involucrado, y que ya se conocen:

- La proteína Ras normal ha demostrado jugar un papel importante en la transducción de diversas señales extracelulares involucrados en procesos que controlan la proliferación, transformación y diferenciación. (Barbicid, 1987; Egan, and Weinberg, 1993; Lowy and Willumsen, 1993)

- La proteína oncogénica de Ras tiene la capacidad de alterar rápidamente la morfología celular, por medio de la vía Rho/Rac. (Prendergast and Gibbs, 1993)

- Trabajos recientes indican que ras puede regular el ciclo celular, así como también estar involucrado en la organización del citoesqueleto. (Prendergast and Gibbs, 1993).

Con base en lo anterior el objetivo general de este trabajo fue:

Determinar si la transfección de los genes ras normal y mutado a células HeLa altera el ciclo celular y observar si estas células sufren cambios en su morfología.

Los primeros resultados, durante el desarrollo de este trabajo nos llevaron al planteamiento de dos objetivos particulares:

1.- Ver si existe una correlación entre el ciclo celular y la morfología.

2.- Realizar el conteo de metafases con su respectivo número de cromosomas para determinar la probable existencia de alteraciones en cuanto a número de cromosomas y si es posible ver una generación de células con mayor número de cromosomas a través del tiempo.

METODOS PARA MEDIR CICLO CELULAR

La cuantificación de información de las características proliferativas o citocinéticas de células o poblaciones celulares es esencial para una gran variedad de estudios biológicos y biomédicos. El conocimiento de esta información es de gran importancia en el campo de la oncología para la medición de actividad proliferativa de células malignas y células normales, de aquí la importancia de la medición del ciclo celular en este tipo de estudios.

Entre 1949-1950 se hicieron las primeras determinaciones para medir ciclo celular utilizando un microespectrofotómetro, instrumento que podía medir cantidades de luz específicas, absorbidas por una muestra examinada bajo microscopio. Dependiendo de la cantidad de DNA contenida en el núcleo de la célula, existía un patrón de absorbancia para cada una de las fases del ciclo. (Karp, 1987).

Por otro lado el método clásicamente usado es el de la incorporación de timidina tritiada, un precursor radioactivo que emplean las células para la síntesis de DNA al incorporarlo en lugar de la timina (Alberts et al. 1989).

Otro método es el uso de la Bromo-dioxiuridina (BrdU), análogo de la timidina a la cual se le ha reemplazado un grupo metil por un átomo de bromo para formar la BrdU. Diversos estudios han demostrado que la BrdU es incorporada al DNA con la misma eficiencia que la timidina, (Melamed et al. 1991). La unión de la BrdU a una sustancia fluorescente como el Hoescht (HO58), conforma la base para una técnica que permite estimar el ciclo celular celular en células que han incorporado BrdU en su DNA.

Otro método para evaluar el ciclo celular es por medio de la citofluorometría que ha tenido impacto en varios campos de la biología y la medicina, con una amplia aplicación en estudios del ciclo celular, inmunología, cancerología, estudios de parámetros celulares como pH intracelular y concentraciones de calcio etc. (Melamed, et al. 1991).

El citofluorometro hoy día es un instrumento fascinante desde el punto de vista técnico; ya que emplea la tecnología más avanzada que incluyen sistemas ópticos, lasers, equipo electrónico digital, computadoras y programas específicos, que en conjunto pueden medir diferentes parámetros de las células que pasan a través de su cámara de flujo, para determinar tamaño, estructura y el contenido preciso de varios constituyentes celulares, como por ejemplo el DNA. Su funcionamiento básico es sencillo (figura 4). La sensibilidad de este aparato es suficiente como para poder detectar 10^{-18} gr. de una sustancia específica por célula, contando miles de células por minuto.

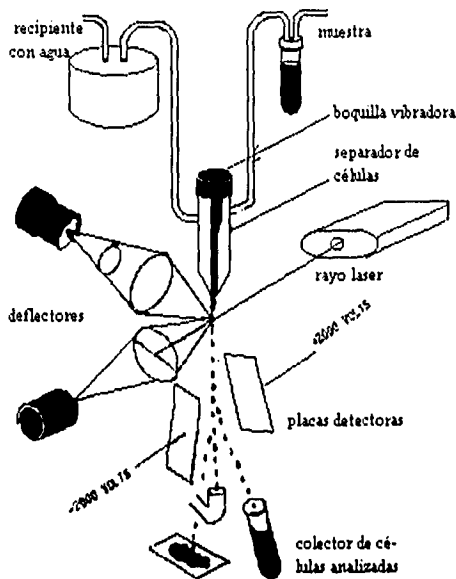


FIGURA 4: El diagrama muestra los componentes más importantes de un citofluorómetro. La muestra celular es inyectada bajo presión hacia el centro de una corriente de flujo libre de partículas, que pasan a través de una boquilla. A una corta distancia bajo la boquilla las células pasan por la zona de detección donde son iluminadas por un haz de láser. Un detector para luz distribuido en pequeños ángulos y detectores para fluorescencia registran la luz proveniente de cada célula. Estos detectores convierten las señales ópticas a pulsos eléctricos que son amplificados, procesados por un analizador de multicanales y almacenados para su posterior despliegue y análisis.

Para hacer mediciones de ciclo celular por citofluorometría, el ADN de las células es teñido con moléculas fluorescentes específicas como el propidio de iodo o 2-4-diamidino-2-fenilindole (DAPI). Las células que se encuentran en suspensión, cruzan una a una un intenso haz de luz; cada célula produce un resplandor fluorescente, esta intensidad es proporcional al contenido de ADN celular. Los haces resplandecientes son colectados por un sistema óptico apropiado que a su vez enfoca la luz a un detector muy sensible, el detector transforma los resplandores de luz en pulsos eléctricos que son medidos y registrados por una computadora.

La ventaja de la citofluorometría es que mide gran número de células individualmente, al mismo tiempo que va graficando cada una de ellas colocándolas en alguna fase del ciclo celular dependiendo de su contenido de DNA.

MATERIAL Y METODOS

Se cultivaron cuatro clonas de células de la línea celular HeLa, células transfectadas con el plásmido Ec neo que contiene el gen ras normal unido al gen de resistencia a la neomicina, células transfectadas con el plásmido Ej neo que contiene el gen ras mutado unido al gen de resistencia a la neomicina; ambos fueron obtenidos a partir de los plásmidos Ec y Ej e insertados en el plásmido pSV2neo (contiene el gen de resistencia a la neomicina) el cual fue utilizado como control. (ver figura 5) y células HeLa sin transfectar; hasta tener suficiente número de células, esto es tres o cuatro días después de haber sido sembradas.

Se realizó un análisis de ciclo celular por citofluorometría, para lo cual se sembraron 11 cajas con 500 000 células para cada uno de los cuatro tipos celulares (44 cajas en total), y se estudio el ciclo durante 90 horas, cada 6 o 12 horas. Se leyó el ciclo celular de las 44 muestras en un citofluorometro "Partec CAII" (Germany)

Con cultivos paralelos se prepararon laminillas para hacer conteo de cromosomas, siguiendo los mismos tiempos, como se hizo para el análisis de citofluorometría. Al concluir las 90 horas de ambos experimentos con un hemocitómetro, se contó el número final de células de cada una de las cuatro clonas.

MANTENIMIENTO DE UN CULTIVO DE CELULAS HELA

Las células HeLa fueron las primeras células humanas de origen tumoral que lograron cultivarse continuamente. La línea celular crece en monocapa en un soporte artificial. Se usaron cajas de cultivo de poliestireno que proveen un soporte simple. Las células se mantienen en condiciones completamente estériles incubadas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Se utilizó el medio de cultivo modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 10% de suero neonato bovino y antibióticos adecuados (Penicilina y estreptomycin, 5 U/ml. y 0.2 µgr./ml. respectivamente).

Para obtener células de las cajas de cultivo se siguió el siguiente procedimiento:

Se retiró el medio, se lavó 2 veces con PBS, enseguida se adicionó 1 ml. de tripsina durante aproximadamente 5 minutos, para después colocar 5 ml. de medio (DMEM + 10% de suero neonato para inactivar la tripsina), se centrifugó durante 5 min. a 2500 rpm., se retiró el sobrenadante y finalmente se adicionó una cantidad conocida de medio para posteriormente hacer un conteo celular.

TRANSFECCION POR ELECTROPORACION

Para llevar a cabo la transfección de las células se hizo lo siguiente:

Se tripsinizaron cajas confluentes con células HeLa, las cuales fueron centrifugadas a 2500 rpm. con 1 ml. de suero neonato, se retiró el sobrenadante y se agregó 5 ml. de solución Hebs (Solución: NaCl 137 mM, KCl 5mM, Na₂HPO₄ 0.7 mM, dextrosa 6 mM, hepes 20 mM, pH 7.05) para centrifugar 5 min a 2500 rpm, estos dos últimos pasos se repitieron en dos ocasiones. Se resuspendió la muestra en Hebs, de esta muestra se tomaron 250 µl. y se pusieron en una celda de electroporación la cual se mezcló con 10 µgr. de DNA genómico (plásmidos Ec, Ej o SV2neo) mas 200 µgr. de DNA de salmón en 250 µl. de hebs frío, se agitó 10 seg en vortex. La celda se colocó a 4°C durante 10 minutos, transcurrido este tiempo se dio un choque eléctrico de 250 V y 960 µC con un electroporador (Bio Rad), después del choque se volvió a colocar a 4°C durante 10 minutos y finalmente se sembraron en una caja p100 con 5 ml. de medio con 10% de suero neonato

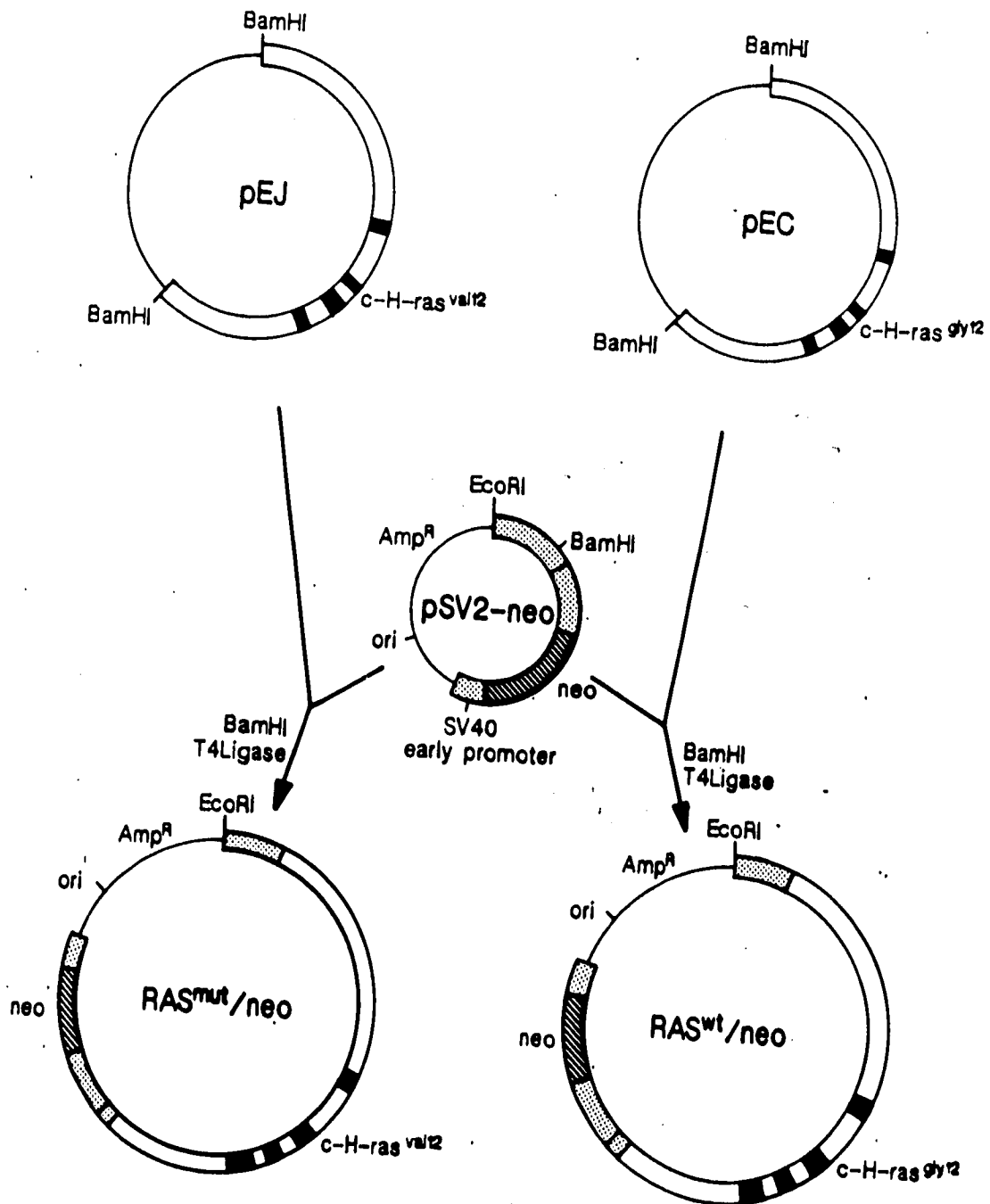


FIGURA 5: Plasmidos usados. Se muestra la estructura general de los plasmidos que contienen los genes ras normal (RAS wt/neo, Ec neo) y ras mutado (RAS mut/neo,Ej) usados para la transfección. El plasmido pSV2-neo se utilizo como control.

SELECCION Y CLONACION

24 horas después de la electroporación se cambió el medio y se adicionaron 800 µg/ml de G418 (Gentamicina), para obtener células que han integrado el plasmido en su genoma, ya sea el plásmido con la versión normal del gen ras (Ec neo) o el plasmido con la versión mutada del gen ras (Ej neo), así como las células con el plásmido que contiene solo el gen de resistencia a la neomicina (Sv2neo), usado como control.

Una vez que obtuvimos estas tres clonas, se procedió a hacer el proceso de clonación, el cual se basa en la aplicación de la dilución limitante, que consiste en hacer diluciones sucesivas de las células, para así obtener células provenientes de una sola progenitora.

PREPARACION DE MUESTRAS PARA ANALISIS POR CITOFUOROMETRIA

Para leer las muestras en el citofluorometro se obtienen las células de las cajas de cultivo con el procedimiento mencionado con anterioridad. El botón celular se resuspendió en 3 ml. de solución fijadora (etanol al 70%) con la ayuda de un vortex y las muestras se almacenaron a 4°C.

Al momento de lectura de las muestras, se centrifugaron a 1200 rpm y se retiró el sobrenadante. A cada tubo se le adicionaron 3ml. de solución de detergentes (solución 1; Partec Alemania); con una pipeta Pasteur se resuspendió el botón durante 5 min. La muestra se transfirió (1.5 ml. aproximadamente) a tubos especiales de lectura para citofluorometro, agregando a estos mismos tubos 2.5 ml. de DAPI (2.5 µg/ml); fluorocromo que tiñe el DNA (solución número 2). El tubo con la muestra celular resuspendida en las dos soluciones se colocó en un citofluorometro Partec CAII para hacer el análisis del ciclo celular a 20 000 núcleos. Esta medición se hizo para cada una de las 44 muestras del experimento con los cuatro tipos de la línea celular.

PREPARACION DE LAMINILLAS

De la misma manera antes mencionada se obtuvieron las células de las cajas de cultivo. Se adicionaron 200 μ l. de colcemid dos horas antes de sacar y fijar las células para detener aquellas células que se encuentran en metafase. Se adicionaron 8 ml. de una solución hipotónica de cloruro de potasio (KCl) 0.075M. Se dejó 20 minutos en incubación a 37°C. Después de haber transcurrido este tiempo, se sacó el tubo con el contenido celular, centrifugándolo 10 minutos a 2500 rpm; se desechó el sobrenadante y agregamos aproximadamente 8ml de una solución fijadora 3 a 1 de metanol-ácido acético, respectivamente; al mismo tiempo, agitamos en un vortex. Esta misma operación de centrifugación, agitación y adición de solución fijadora se repitió en dos ocasiones dejando las muestras en la solución fijadora a 4°C.

Se centrifugaron las muestras a 1200 rpm para obtener un botón nuclear. Se desechó la mayor cantidad de este sobrenadante pero se dejó una pequeña cantidad de para resuspender el contenido nuclear. Dos horas antes de hacer esta resuspensión se colocaron portaobjetos en un frasco con alcohol de 96° a 4°C, asegurándose que el alcohol las cubriera totalmente.

Se hicieron dos laminillas por muestra de la siguiente manera; se tomó una laminilla del frasco y a una altura aproximada de 1.5 metros se dejó caer algunas gotas de las muestras con el fin de que al caer los núcleos sobre la laminilla estos se rompieran y se expandieran los cromosomas de células que al momento de ser fijadas se encontraban en metafase. Las laminillas se secaron al mechero (flameando) y se observaron al microscopio en contraste de fases.

Ya listas las laminillas de cada una de las diferentes muestras se tiñeron durante 5 minutos en una solución de Giemsa (Sigma) al 4% para poder contar de células en metafases el número de cromosomas.

El experimento comenzó con la siembra de las 11 cajas. Seis horas después, tiempo suficiente para que las células se anclaran a la caja de cultivo se sacó la primer muestra; es decir, se sacó una caja de células Ec, una de E_j, una de SV2 y otra de célula HeLa, que representaron el tiempo 0. Con intervalos de 6 horas durante el día y 12 durante la noche (después de haber sacado el tiempo 0) se sacaron el resto de las cajas hasta completar las 90 horas.

Para ver si las células tenían mayor número de cromosomas hicimos un conteo del número de estos, sacando el promedio de 50 metafases para cada una de las diferentes muestras de las cuatro clonas.

RESULTADOS

Al hacer un análisis de células transfectadas con la ayuda de un microscopio invertido, se encontraron alteraciones morfológicas evidentes, las células transfectadas con el proto-oncogen así como también las células transfectadas con el oncogen, muestran un tamaño varias veces más grande al de las células transfectadas con el plásmido control o al de las células HeLa sin transfectar.

Aproximadamente 30 horas después de la resiembra se comienzan a ver la aparición de células gigantes y multinucleadas, siendo visto el mayor número de ellas a las 72 horas de haber iniciado el experimento. La presencia de células gigantes indica, que la morfología de las células HeLa es alterada por la tranfección del gen ras normal, así como también por la versión mutada del mismo gen. Observamos cambios morfológicos en aproximadamente un 30% de la población contenida en la caja de cultivo para el caso de las células Ec y un poco más del 30% para las células Ej. Cambios morfológicos como lo son el incremento en el tamaño celular junto con un incremento en el tamaño nuclear, alteraciones en la membrana plasmática de una forma no común en las células HeLa; presencia de vacuolas y efectos en la estructura del contenido nuclear, así como también se observa la presencia de micronúcleos. En la figura 6 se presentan los cambios morfológicos que se observan al comparar células transfectadas con el gen ras normal (Ec), células transfectadas con el gen ras mutado (Ej) y las células control transfectadas con el gen de la resistencia a la neomicina; así como las células HeLa normales (sin tranfección).

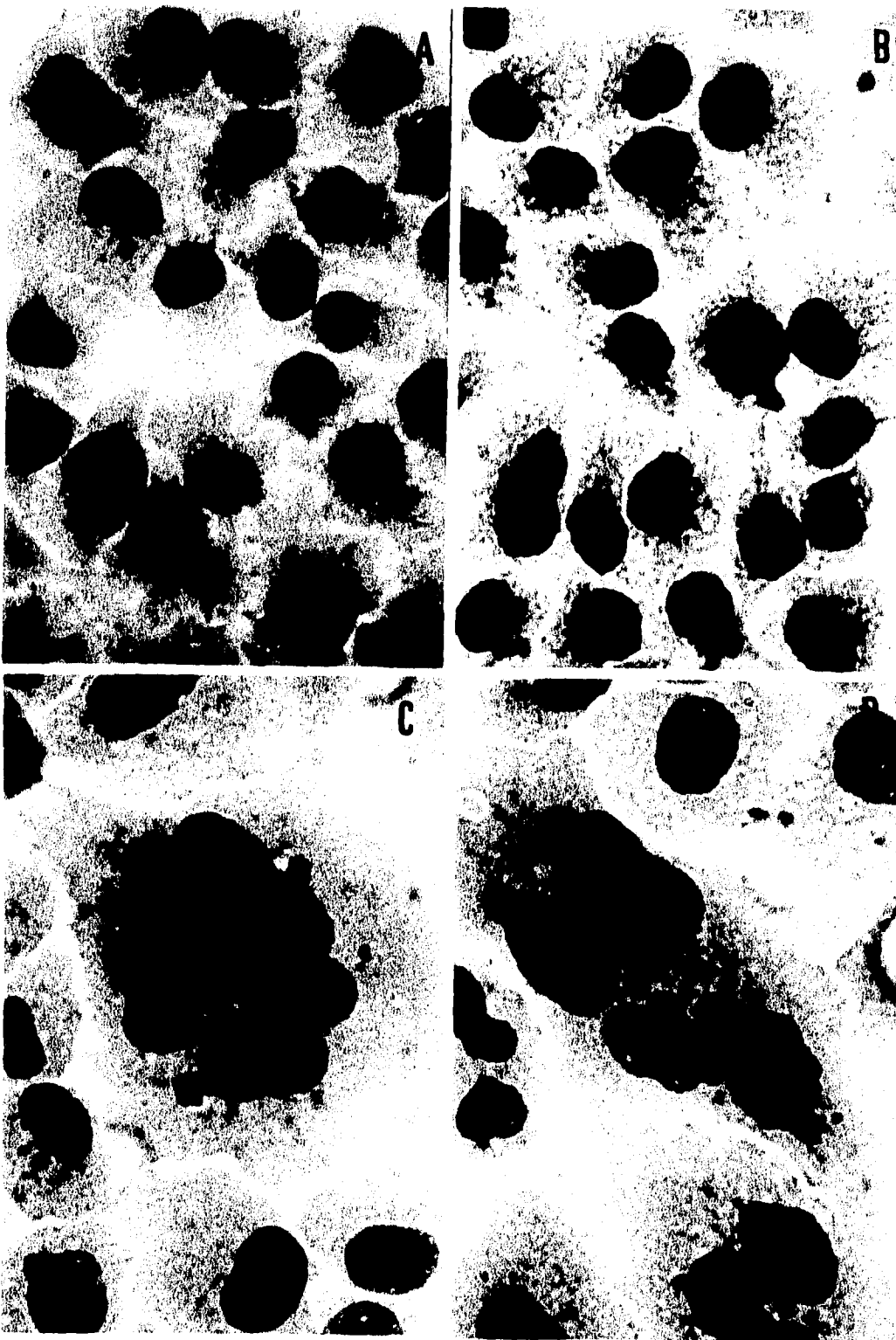


FIGURA 6A: Cambios morfológicos en células HeLa inducidos por la transfección del protooncogen y oncogen ras. Célula HeLa sin transfectar (A), células transfectadas con el plásmido control (B), células transfectadas con el gen ras normal (C) y células transfectadas con el gen ras mutado (D).

Claramente se ven cambios morfológicos, entre células transfectadas con ambas versiones del gen ras (normal ó mutado) y células control (SV2 neo) así como en HeLa que no presentan las alteraciones antes mencionadas. Esto indica indudablemente que los cambios morfológicos observados se debieron a la tranfección de cualquier versión del gen ras.

Estos resultados nos sugerían que posiblemente las células gigantes con la presencia de un gran núcleo o varios núcleos, tenían un mayor contenido de DNA y por lo tanto su número de cromosomas estaría aumentado, lo cual fue confirmado al hacer el conteo y comparar el número de cromosomas para cada clona (ver fig. 6b). Hay que hacer notar que en algunos casos las células Ec y Ej mostraron un incremento en el número de cromosomas, y que en ocasiones este incremento era de 200 ó superior a los 200 cromosomas por metafase, caso que no ocurría para las células HeLa ni tampoco para las células SV2neo. Para esto se hizo un conteo en el número de cromosomas, obteniendo los resultados que se muestran en la figura 7 donde aparece la media de cromosomas a través del tiempo. En la figura 8 aparecen los porcentajes de células con un contenido anormal de cromosomas, considerando los reportes que existen y señalan como número máximo de cromosomas por metafase para células HeLa de 106 con una moda de 70 (Lewin, 1980)

En los resultados de la media de cromosomas (figura 7) se observan dos puntos a las 42 horas que pertenecen a las células Ec y Ej, con diferencias significativas con respecto HeLa y SV2neo. Después cae la media de cromosomas a los niveles promedio entre los cuatro tipos celulares, para luego irse incrementando nuevamente en el transcurso del tiempo para los casos Ec y Ej, volviendo a alcanzar un máximo a las 72 horas, después de las cuales hay un decremento. La figura 8 muestra

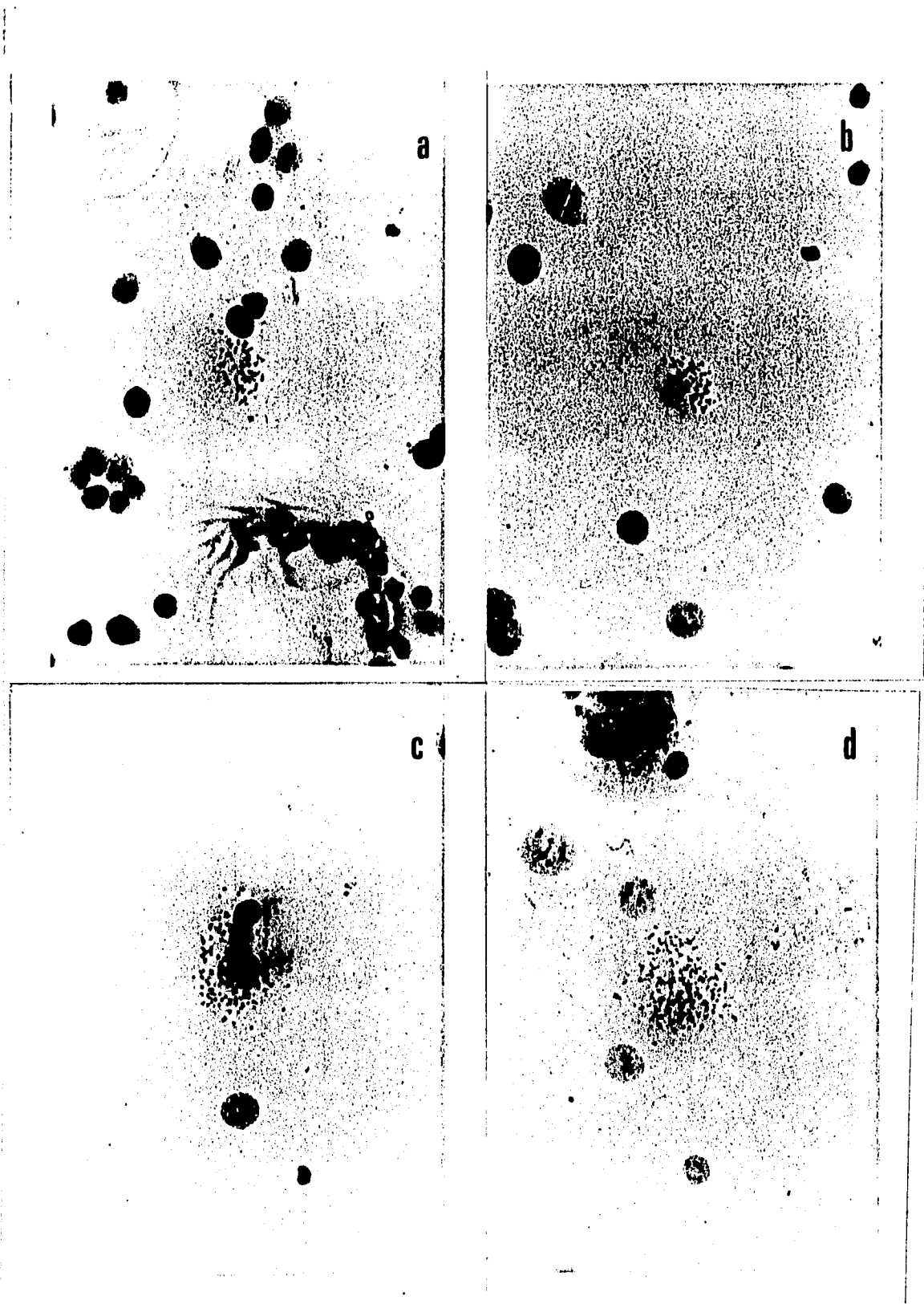


FIGURA 6B: Aumento del número de cromosomas en células tranfectadas con los genes ras. a) HeLa, b) SV2 neo, c) Ec neo y d) Ej neo

el porcentaje de células con más de 106 cromosomas, encontrando los porcentajes más altos en los mismos puntos en los cuales la media de los cromosomas de la gráfica 2 son extremadamente significativos, es decir a las 42 y a las 72 horas, teniendo un 40% para Ec y un 38% para Ej a las 42 horas, mientras que para las 72 horas tenemos porcentajes de 35% y 40 respectivamente. Justamente en estos tiempos en las cajas de cultivo se ven el mayor número de células gigantes con un gran núcleo o células gigantes multinucleadas. Tomando en cuenta los tiempos más representativos de la figura 7 se sacaron los porcentajes del número de cromosomas por célula. Estos puntos son: Para las 0 horas figura 9, 24 horas figura 10, 42 horas figura 11 y 72 horas figura 12, no existiendo diferencias significativas entre células HeLa y células SV2neo, pero si de estas con respecto a las células Ec y Ej. Estas diferencias se pueden apreciar mejor, viendo la figura 13 que muestra la media de cromosomas para estos cuatro tiempos.

La figura 14 muestra el tipo de gráficas que aparecen al hacer un análisis por citofluorometría, dando los porcentajes de distribución que se encuentran en cada fase del ciclo celular (G1, S, y G2/M). Las curvas A (HeLa) y B (SV2neo) son curvas clásicas que corresponden a células que se encuentran ciclando normalmente, mientras que la curvas C (Ec) y D (Ej) no llevan el mismo patrón. Son evidentes las alteraciones en la fase G2/M y es muy probable que se trata de un arresto en ésta fase. Esta figura corresponde a un solo punto de los diferentes tiempos a los que se analizó el ciclo celular por citofluorometría, en este caso al punto de las 42 horas.

Utilizando los porcentajes de células en la fase G1 del ciclo celular a través del tiempo se realizó la figura 15 donde se pueden observar diferencias entre células transfectadas y células sin transfectar. Estas diferencias son indicativas de alteraciones en el ciclo celular. Por si

solos estos datos de citofuorometría, a primera vista sugerían que las células Ec y Ej permanecen estáticas durante varias horas, es decir, como que se estuviera alargando el ciclo celular, que las células Ec y Ej que están en G1 permanecieran por varias horas en esta fase. Sin embargo esta suposición queda descartada por los resultados de la figura 16, ya que si fuera así entonces encontraríamos un menor número de células Ec y también un número menor de células Ej, lo cual no sucede.

Se realizó un análisis estadístico utilizando el programa Tadpole III, haciendo una prueba de T de student para cada uno de los puntos de la figura 7 (media de cromosomas). Ver anexo A.

DISCUSION

En este trabajo se observó un proceso dinámico con la aparición y desaparición de células gigantes a partir de una población de células pequeñas, en cultivos de células HeLa donde se introdujo el gen H-ras. La presencia de células gigantes con un gran núcleo, además de células gigantes multinucleadas, o células gigantes con núcleo grande y con micronúcleos nos hizo pensar que estas podrían tener un incremento importante en su número de cromosomas consecuencia de la transfección de gen ras, no importando la versión del gen, los mismos efectos se ven con la transfección del gen ras normal o el gen ras mutado (ver fig. 9-12). La existencia de este proceso aparición-desaparición hace que se incremente la media en el número de cromosomas cuando hay muchas células gigantes y se da un decremento cuando estas desaparecen.

Los resultados del análisis por citofluorometría muestran que hay alteraciones en el ciclo celular. Los patrones de análisis para células HeLa sin transfectar y células SV2neo conservan valores casi iguales en cuanto a los porcentajes de distribución para cada fase del ciclo celular. Si comparamos estos valores con los valores que obtuvimos para las células Ec y Ej, podemos observar grandes diferencias, ya que los porcentajes de distribución de cada fase difieren bastante, incluso; se detecta un pico bastante pronunciado en G2/M a las 42 horas, lo cual indica que las células se están acumulando en esta etapa, es decir hay un arresto en G2/M (ver fig. 14).

El mecanismo de aparición-desaparición de células gigantes del

cual hemos hablado se trata de un fenómeno conocido como muerte mitótica. Los eventos moleculares que controlan la muerte mitótica aun se desconocen. Sin embargo, es un proceso lento que depende de la actividad mitótica en donde las células después de dos o tres ciclos mueren. Se caracteriza por tener un arresto inicial y transitorio en G2/M, la subsecuente liberación de dicho arresto trae como resultado la aparición de células multinucleadas, micronucleos y un aumento en el tamaño celular. Este fenómeno se describió por primera vez en células tratadas a dosis bajas de radiación ionizante y con células tratadas a concentraciones bajas de agentes químicos como la bleomicina (Lock and Ross, 1990; Chang and Little, 1991; Tounekti et. al. 1994).

Los mecanismos de generación que pueden estar directamente involucrados en la formación de células gigantes multinucleadas, aún no son claros. Se atribuye a fenómenos como a una posición no adecuada de los centriolos, defectos en la polimerización de la tubulina, alteraciones en la reorganización de microfilamentos y microtubulos o problemas en la polimerización de actina para la formación del anillo contractil durante la citosinesis (Rodilla, 1993). Hay otros autores que señalan que se puede deber a un defecto en el Huso mitótico, produciendo anomalías en el movimiento de cromosomas, inhibiendo la cariocinesis (Kung et. al. 1990).

Una explicación de lo que quizá está pasando con las células transfectadas con los genes ras es que no se trata de un retraso en el ciclo celular, como aparentemente muestran los resultados de análisis por citofluorometría, si esto fuera así, entonces también se estaría ocasionando un retraso en la proliferación, es decir que el ciclo celular de las células Ec neo y Ej neo no es más largo en comparación con las células HeLa o SV2neo sino más bien pareciera que se está dando una alteración en las fases del ciclo celular, donde se pierden los tiempos de cada una de las fases que conforman el ciclo de estas clonas, con

respecto a los controles sin que necesariamente se este afectando la proliferación celular.

Estos resultados parecen indicar que la modificación en los tiempos de fase o alteraciones en las fases del ciclo celular, de las cuales hemos hablado con anterioridad son causadas por la presencia del gen ras. Prácticamente el mismo número de células que salen de S a la fase G2/M y pasan a G1, son las mismas que salen de G1 y pasan a S; así, observamos que estos porcentajes casi no varían en las células Ec y Ej. Por esta razón aparentemente vemos en la figura 15, que el ciclo celular se esta alargando, al mantenerse por algún tiempo casi constantes la fase G1.

Al parecer la transfección está alterando la secuencia de eventos del ciclo cromosómico, desacoplándola de la secuencia de eventos del ciclo citoplásmico (Alberts, et al, 1989)

Por otra parte, ras también esta involucrado en la organización del citoesqueleto, por lo tanto también tiene que ver con la organización del aparato mitótico (formación de polos y huso mitótico) (Prendergast and Gibbs 1993).

El posible desacoplamiento podría ser debido a que ras esta actuando sobre el ciclo cromosómico, fuera de fase en la síntesis y al mismo tiempo podría estar actuando sobre el ciclo centrosómico ocasionando un descontrol en la organización del aparato mitótico. Al no estar coordinados estos dos eventos; controlados en parte por ras, con el ciclo citoplasmático se podría estar ocasionando una inestabilidad dinámica entre los tres eventos que constituyen el ciclo celular, trayendo como consecuencia que no se reprodujera con fidelidad la segregación de cromosomas (causando una inhibición de cariocinesis por cromosomas rezagados) y/o impidiendo que los cromosomas migraran hacia los polos o que este fenómeno fuera tan

rápido que no se estuviera dando una citocinesis apropiada. Sino se esta dando una citocinesis, las células tienden a portar una carga cromosómica adicional, carga que al no soportarla después de algunas divisiones sin citocinesis se convierte en un impedimento para la viabilidad y la supervivencia de la célula, llevando a la célula a una catástrofe mitótica y la desaparición de células gigantes ocasionada por muerte mitótica, como resultado de un proceso incompleto de división celular donde se da una cariocinesis pero no una citocinesis.

El incremento importante en el número de cromosomas que se detecta en las células transfectadas (Ec neo y Ej neo), sobre las cuales ras induce muerte mitótica, podría estar siendo regulada por dos vías: Una vez que la señal de fosforilación llega ras y se activa, esta se bifurca y activa la vía de Raf, a través de una cascada de fosforilación mediada por varias proteínas-cinasas que fosforilan factores de transcripción que a su vez activan la expresión de diferentes genes, entre los que quizá se encuentren aquellos que tienen que ver con la síntesis de DNA. La otra vía es Rho/Rac que esta implicada en la organización del citoesqueleto; esta vía estaría involucrada en los problemas que se presentan e impiden llevar a cabo una citocinesis apropiada, con lo cual la célula solo estaría dividiendo su DNA, dando origen a varios núcleos.

Estos resultados no quieren decir que el efecto solo sea a nivel morfológico y contenido de DNA, que al parecer es prácticamente el mismo en ambas clonas (Ec y Ej), también habría que tomar en cuenta los niveles de regulación en la expresión de los genes, debido a que estos son diferentes entre un gen normal y uno mutado, no es lo mismo tener un sistema encendido todo el tiempo que esta pasando una señal constantemente (ras mutado) a tener uno que se apaga cuando se hidroliza el GTP (ras normal) y anula el paso de la señal. Por lo tanto la expresión de cada uno de los genes puede estar regulando otras vías

que no estamos analizando y estos efectos tal vez sean diferentes y no los podemos apreciar. Sin embargo pareciera que ambos genes tienen una vía en común que los lleva a producir los mismos efectos que hemos observado en este trabajo.

CONCLUSION:

La transfección por electroporación de cualquier forma del gen ras ya sea su forma normal o mutada ocasiona grandes cambios morfológicos, así como cambios en el ciclo celular de las las células HeLa. Estos cambios morfológicos tienen que ver con el contenido de DNA ya que una célula gigante o multinucleada; contiene una mayor cantidad DNA y por lo tanto un mayor número de cromosomas ocasionando que estas células sean poliploides y mueran por un fenómeno conocido como muerte mitótica.

REFERENCIAS

Alberts,B., Bray,D., Lewis,J., Raff,M., Roberts,K., Watson,J. (1989) Molecular Biology of the cell 2a de. Garland Publising N.Y. 1219 pp.

Andersson, W.F. (1992) Human gene therapy. Science. 256:808-813

Atkin,N.B.,Baker,M.C. (1988) Deficiency of all or part of chromosome 11 in several types of cancer: significance of a reduction in the number of chromosomes 11. Cytogenet Cell Genet. 47:106-107

Barbicid,M. (1987) Ras genes. Ann.Rev.Biochem. 56: 779-827

Bar-Sagi,D. & Feramisco,J.R. (1986) Induction of membrana ruffing and fluid phase pinocytosis in quiescents fibroblasts by ras proteins. Science 233: 1061-1066

Bogusky,M.S. and McCormick,F. (1993). Protein regulating ras and its relatives. Nature 366:643-654

Bokoch,G.M. and Der,C.J. (1993) Emerging concepts in the ras superfamily of GTP binding proteins. The FASEB J. 7: 750-759

Bos,J.C. (1990) Ras gene mutation and human cancer. En: Molucular genetics in cancer diagnosis (J. Cossman, ed.), pp 278-287 Elsevier, Amsterdam

Broach,J.R. (1991). Ras genes in Saccharomyces Cerivisiae: Signal Transduction in search of pathway. Trends. genet. 7:28-33

Broker,T.R., and Botchan,M. (1986). Papillomaviruses: retrospectives and perspectives. *Cancer cells (Cold Spring Harbor)*. 4: 17-36

Buchkovich,K.,Duffy,L.A.,Harlow,E.(1989). The retinoblastoma protein is phosphorylated, during specific phase of the cell cycle. *Cell* 58:1097-105

Burghardt,E. (1986) Banbury report en: Viral etiology of cervical cancer., p.81 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor., New York

Chang,W.P. and Little,J.B. (1991) Delayed reprouctive death in X-irradiated chinase hamster ovary cells., *Int.J.Radiat.Biol.* 60:483-496

DeCaprio,J.A.,Ludlow,J.,Lynch,D.,Furukawa,Y.,Griffin,J.,Piwnica,H.,
Huag,C.M., Livingston,D.M. (1989). The product of the retinoblastoma susceptibility gene has proprites of a cell cycle regulatory element. *Cell* 58:1085-95

Der,C.J.,Krontiris,G.,Cooper,M. (1982) Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma virus. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* 79:3637-3640

Dürst, M., Croce, C., Gissmann, L., Schwarz, E., Huebner, K. (1987). Papillomaviruse secuencias integrated near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *Proct.Natl.Aca.Sci.USA.* 84: 1070

Dürst,M.,Kleinheinz,A.,Hotz,M.,Gissmann,L. (1985) The physical state of human papillomavirus type 16 DNA bening and maligant tumours. *J. Gen.Virol.*66: 1515-1522

Dyson,M.,Howley,P.M.,Münger,K.,Harlow,E. (1989) The human papillomavirus 16 E7 protein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243: 934-937

Egan,S.E., & Weinber,R.A (1993) The pathway to signal achievement. *Nature* 365: 781-783

Franceschi,S.,Vecchica,C. and DeCarli,A. (1986) Banbury Report en: *Viral etiology of cervical cancer*. p.65 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor., New York

Gage,J.R.,Meyers,C.,Wettstein,F.O., (1990) The E7 protein of nononcogenic type 6b (HPV-6b) and the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *J.Virol.* 64: 723-730

García-Carrancá,A.,Gariglio,P.V., (1993) Aspectos moleculares de los papillomavirus humanos y su relacion con el cancer cervico-uterino. *Rev.Inv.Clin.* 45: 85-92

García-Carrancá,A.,Thierry, F.,Yaniv,M. (1988) Interplay of viral and cellular proteins interaction along the long control region of human papillomavirus 18. *J.Virol.* 62: 4321-4330

Howe,H.P.,Dobrowolsky,F.,Reddy,K.,Stacey,D. (1993). Release from G1 growth factor β 1 requires cellular ras activity. *J.Biol.Chem.* 268:21448-52

Hunter,H.W., Darlington,G.J., O'Brien-S.J. (1980) Characteristics of HeLa cell strain: Permanent vs Variable features., *Cytogenet.cell.genet.* 27(4):216-231

Hunter,T. (1991) Cooperation between oncogenes. Cell 64: 249-270

Kamata,T.K. and Feramisco,J. (1984). Epidermal growth factor stimulates guanine nucleotide binding activity and phosphorylation of ras oncogenes proteins. Nature 310:147-150

Karp,G., (1987) Biología celular. ed. McGraw Hill. Mex.D.F. pp 950

Kurman,R.J.,Jermon,A.B.,Lancaster,W.A.,(1983) Papillomavirus infection on the cervix. Relation to intraepitelial neoplasia based on the presence of specific viral structural proteins. Am. J. Surg Pathol. 7: 39-44.

Lacal,J.,Shiv,K.,Srivastava,P.,Yuort,A.A. (1986) Ras p21 proteins with high or low GTPase activity can efficiently transform NIH/3T3 cells., Cell 44:609-617

Laskey,R.A.,Fairman,M.P. and Blow,J.J.(1989) S phase of the cell cycle., Science 246:609-613

Levine,J. (1992) The p53 tumor supressor gene and product. en: Tumor supressor genes, the cell cycle and cancer. Cancer Surveys Vol. 12 de. Imperial Cancer Research Fund. N.Y. pp. 59-79.

Leevers,S.J. and Marshall,C.J. (1992) MAP Kinase regulation the oncogene connection., Trends.cell.biol. 2:283-286

Lewin,B. (1980). Gene expression. 2a de. Wiley-Interscience publications. New York pp. 143-145

Lewin, B. (1994) *Genes IV*. Oxford University Press. U.K. 857 pp.

Lock, R.B., Galperina, O.V., Feldhoff, R.C., Rhodes, L.J. (1994). Concentration dependent differences in the mechanisms by which potentiates etoposide cytotoxicity in HeLa cells. *Cancer Res.* 54:4933-4939

Lock, R.B. & Ross, W.E. (1990) Possible role for p34 kinase in Etoposide-induced cell death of Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* 50: 3767-3771

Lowy, D.R., Willumsen, B.R., (1993) Function and regulation of ras. *Ann.Rev.Biochem.* 62: 851-891

Mamera, S., Litvinchik, L., Pinaev, G. (1986) Karyotype characteristics of continuous cell lines. The variability and balance of the Chromosomes set of M-HeLa cells., *Tsitologia.* 28(2):193-203

Marx, J. (1993). How p53 suppresses cell growth. *Science* 262:1644-5

Melamed, M., Lindmo, T., Mendelson, M. (1989) *Flow cytometry and sorting 2a* de. Wiley-Liss N.Y. 824 pp.

McIntosh, J.R. and Koonce, M.P. (1989) *Mitosis.* Science 246:622-628

Mercer, W.E., (1992) Cell cell regulation and the p53 tumor suppressor protein. *Critical reviews in eucaryotic gene expression.* 2:251-263

Mihara, K., Cao, X.R., Yen, A., Chadler, S., Murphre, A.L., T'Angi, A., Fung, Y., (1989). Cell cycle dependent regulation of phosphorylation of the human retinoblastoma gene product. *Science* 246:1300-3

Moodie,S.A. & Wolfman,A. (1994) The 3Rs of life ras, raf and growth regulation. TIG 10: 44-48

Müller,R.,Mumberg,D.,Lucibello,F.C. (1993) Signals and genes in the control of cell cycle progression. Bioch. Bioph. Acta 1155: 151-179

Lehn,H.,Krieg,P.,Saver,G. (1985) Papillomavirus genomes in human cervical tumours: Analisis of their transcription activity. Proc.Natl.Acad.USA. 82: 5540-5544

Münger, K.,Phelps,W.C.,Bubb,V.,Howley,P.M.,Schlegel,R.(1989) The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. J.Virol. 63: 4417-4421

Münger,K.,Scheffner,M.,Huibregtse,J.M.,Howley,P.M. (1992) Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products. Cancer surveys 12: Tumour suppressor genes, the cell cycle and cancer: 197-217

Nelson,J.H.,Averette,H.E.,Richard,R.M. (1984). Dysplasia carcinima in situ, and early invasive cervical carcinoma. Cancer J. for Clinicians. 34:306

Nurse,P. (1989) Universal control mechanism regulation onset of mitosis phase., Science 246:503-507

O'Farrel,P.,Bruce,A.,Lakich,D.,Lehner,C., (1989) Directing cell division during development. Science. 246: 635-640

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Pardee,A. (1989) G1 events and regulation of the cell proliferation. *Science* 246:603-608

Powers,S. (1992). Genetic analysis of ras homologs in yeast. *Sem.Cancer Biol.* 3:209-218

Prendergast,G.C. & Gibbs,J.B., (1993) Pathways of ras function: Connections to the actin cytoeskeleton. En: *Advances in cancer research vol.62*, ed. Academic Press, Inc.

Radford,I.R. (1991) Mouse lymphoma that undergo interphase death show markedly increased sensitivity to radiation-induced DNA double-strain braekage as compared with cells that undergo mitotic death., *Int.J.Radiat.Biol.* 59:1353-1369

Redpath,J.L. (1986) Repair of potentially lethal radiation damage in confluent and non-confluent cultures of human hibrids cells. *Int.J.Radiat.Biol. Relat.stud.Phys.Chem.Med.* 50:191-203

Rees,N., Hunter,L., Darlington,G., O'Brien,S. (1980) Characteristics of HeLa strains: Permanent vs. variable features. *Cytogenet.Cell. Genet.* 27 (4): 216-31

Reid,R.,Crum,C.P.,Herschesman,B.R.,Fu,Y.S.,Braun,L.,Shah,K.V.,Agronows,S.J., Stanhope,C.R. (1984) Genital warts and cervical cancer III. Subclinical papillomavirus infection and cervical neoplasia are linked by a spectrum of continuos morphologic and biologic change. *Cancer* 53: 943-953

Ridley,A.J. and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein Rho regulates assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70:389-399.

Rodilla,V (1993) Origin and evolution of binucleated cells with micronuclei in cisplatin-treated. *Mutat. Res.* 300: 281-291

Scheffner,M.,Werness,B.A.,Huibregtse,J.M.,Levin,A.J.,Howley, P.M., (1990) The oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promote the degradation of p53. *Cell* 63: 1129-1136.

Scheffner,M., Münger,K.,Byrne,J.C.,Hawley,P.M. (1991) The state of p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 88:5523-5527

Schlegel,R. (1990) Papillomavirus and human cancer. *Semin. Virol.* 1: 297-306

Schneider.M.,Mounory,S.,Croissant,O.Orth,G. (1987) Integration of human papillomavirus 16 DNA sequences a possible early event in the progression of genital tumours. *J.Virol.* 61: 3295-3298

Schwarz,E.,Freese,U.K.,Gissmann,L.,Mayer,W.,Roggenbuck,B.,Stremlau,A.,Zur Hausen,H. (1985) Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 314: 111-114

Shimizu,S.,Birnbau,D.,Riley,M.A.,Fasano,O.,Suard,Y.,Edlun,L., Taparowsky,E.,Golfarb,M.,Wigler,M. (1983) Structure of ki-ras of the human lung carcinoma cell line Calu-1. *Nature* 304: 497-500

Slamon,D.J. (1984) Expression of cellular oncogenes in human malignancies. Science 224: 256-262

Smotkin, D.,Wettstein,F.O. (1986) Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and cancer derived cell line and identification of the E7 protein. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83: 4680-4684

Srivatsan,E.S.,Benedict,W.F.,Standbridge,E.J., (1986) Implication of chromosome 11 in the supression of neoplastic expression in human cell hibrids. Cancer Res 46:6174-6179

Standbridge,E.J., (1990) Human tumor supressor genes. Annu Rev Genet 24:615-657

Sweet,R.W.,Yocoyama,S.,Kamatar,T.,Feramisco.J.,Rosenberg,M. (1984). The product of ras is a GTPasa and the T24 oncogenic mutant is deficient in this activity. Nature 311:273-275

Tounekty,O.,Pron,G.,Belehradek,J.,Mir,L.M. (1993). Bleomycin, an apootosis-mimetic drug that induces two types of cell death depending on the number of molecules internalized. Cancer Res. 533:5462-5469

Trahey,M.,McCormick,F. (1987) Cytoplasmatic protein stimulates normal N-ras p21 GTPasa but does not affect oncogenics mutants. Science 238: 542-545

Ulrich,A. And Schlessinger,J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity., Cell 61:203-212

Werness,V.A.,Levin,A.J.,Howley,P.M. (1990) Association of human virus type 16 and 18 with p53. Science 248: 76-79

Weissman,S.M. (1992) Gene therapy (commentary). Proc.Natl.Acad.Sci. 89:1111.

William,L.T. (1989) Signal transduction by the platelet-derived grown factor receptor., Science 243:1564-1570

Williams,R.S.,Johnston,S.A.,Reid,M.,DeVit,M.J.,McElligott,S.G. And
Standford,J.K. (1991) Introduction of foreing genes into tissues of living mice
by DNA coated microprojectils. PNAS 88:2726

Wolf,J.A.,Malone,R.W.,Williams,P.,Chong,W.,Acsadi,G.,Jani,A.,Flegner,P.L.
(1990) Direct gene transfer into rodent muscle in vivo, BioTechniques 11,
4:474

Zarlb,H.,Sukumar,S.,Arthur,A.V.,Martin-Zanca,D.,Barbicid,M., (1985) Direct
mutagenesis of Ha-ras oncogenes by N-nitroso-N-methylurea during
initiation of mamary carcinogenics in rats. Nature 315:382-385

Zur Hausen,H., (1987) Papillomavirus in human cancer. Cancer
59: 1692-1699

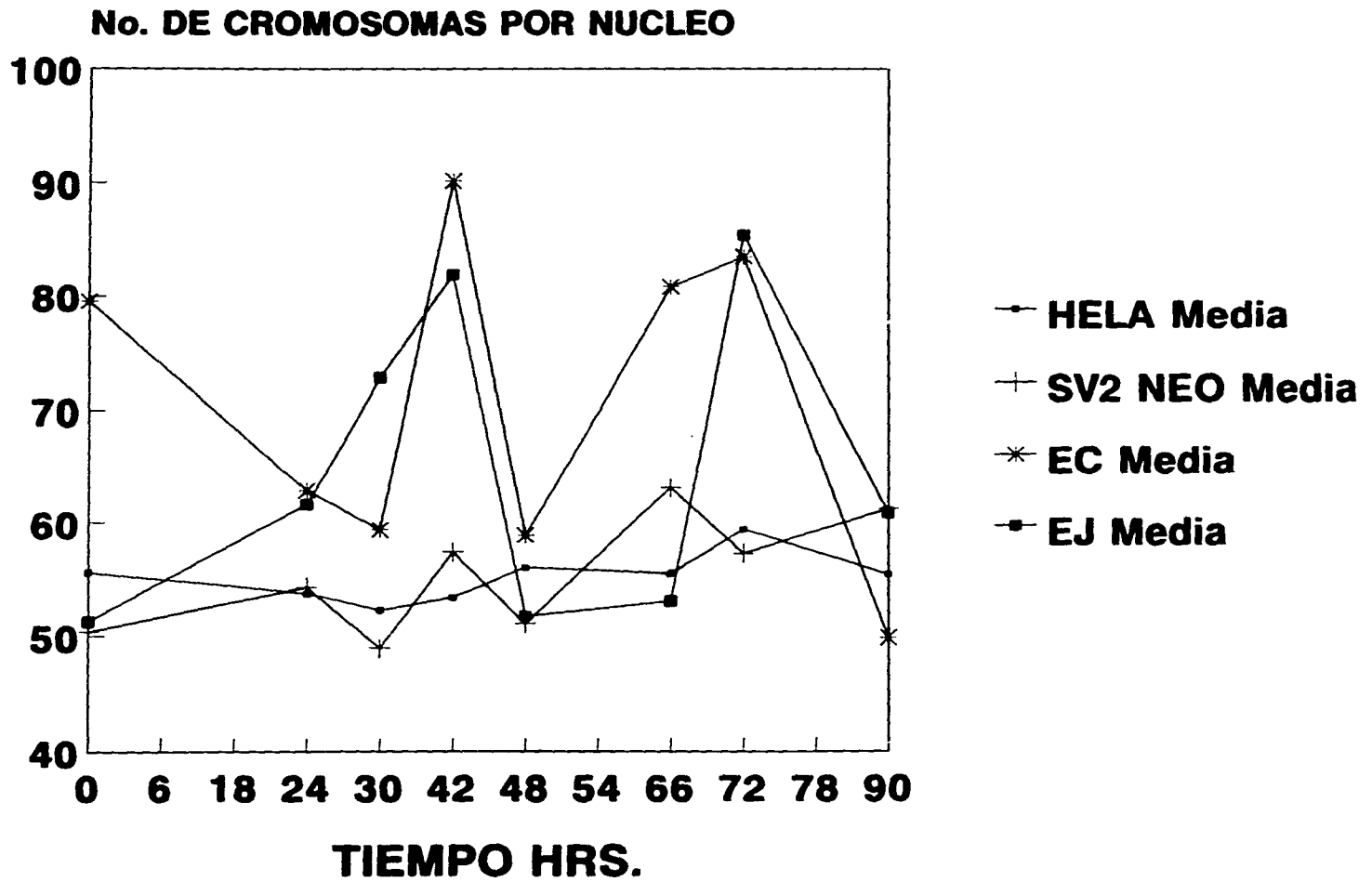


FIGURA 7: Incremento en el número de cromosomas a través del tiempo en células transfectadas con los genes ras. Los incrementos corresponden con la aparición de células gigantes y multinucleadas.

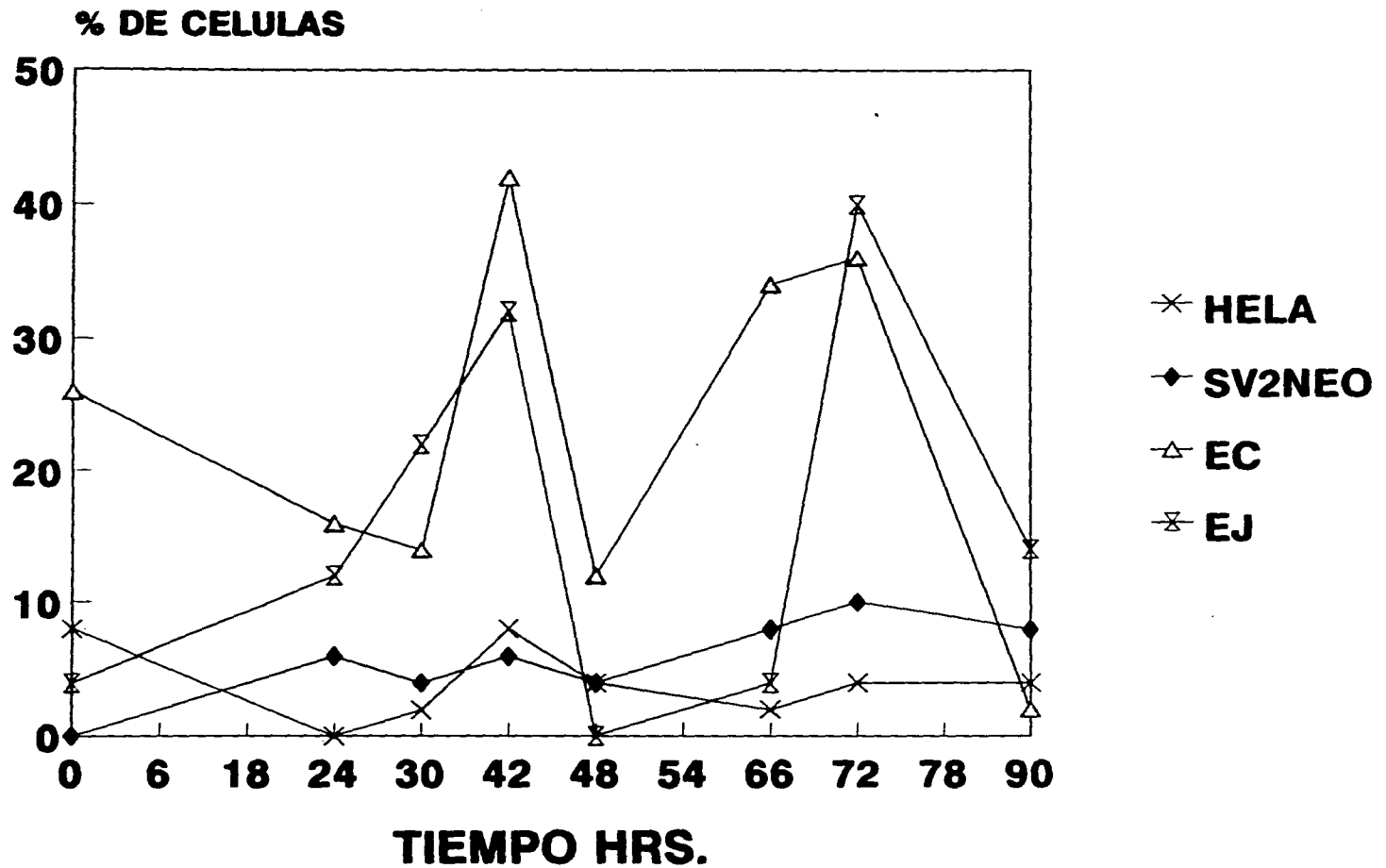


FIGURA 8: Porcentajes de células transfectadas que sobrepasan el porcentaje "normal" de cromosomas. Se considera que las metafases de las células HeLa tienen un límite de 106 cromosomas, con base en esto se graficaron los porcentajes de células transfectadas que sobrepasan este límite.

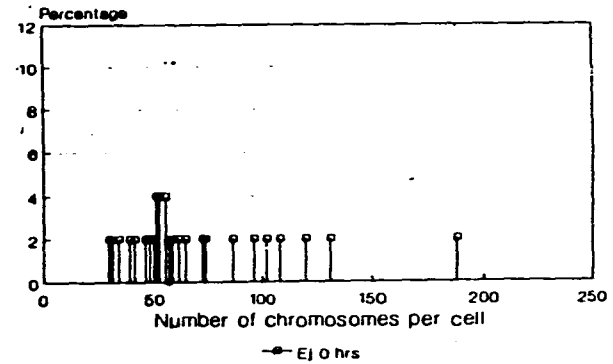
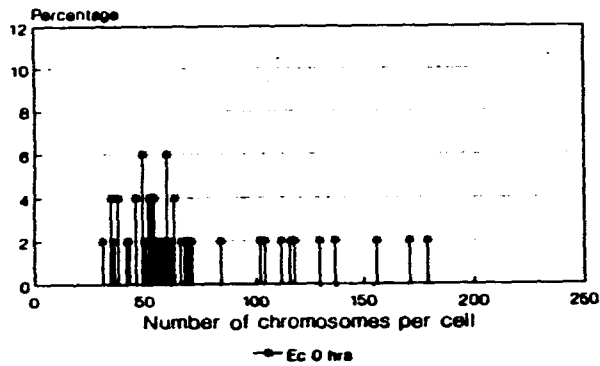
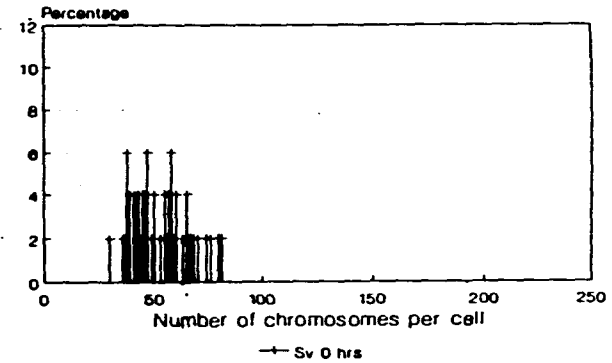
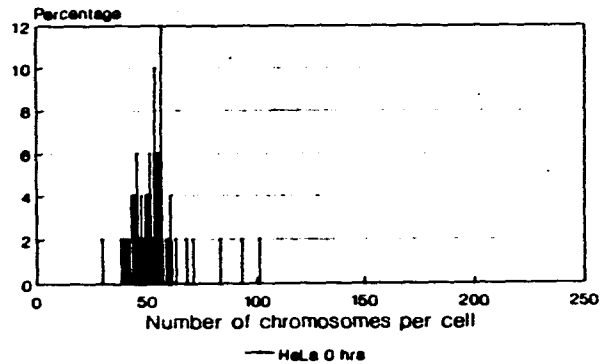
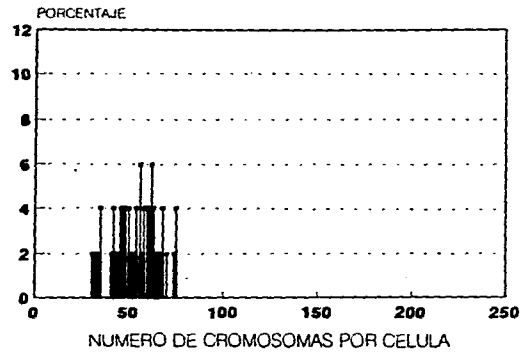
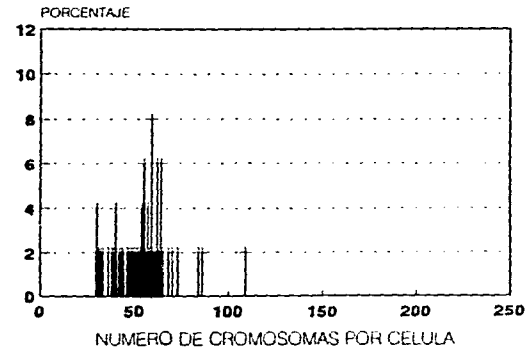


FIGURA 9: Porcentaje de metafases con diferente número de cromosomas al inicio del experimento.

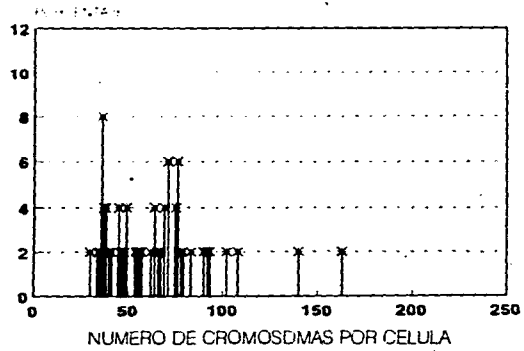
HeLa



Sv2 Neo



Ec



Ej

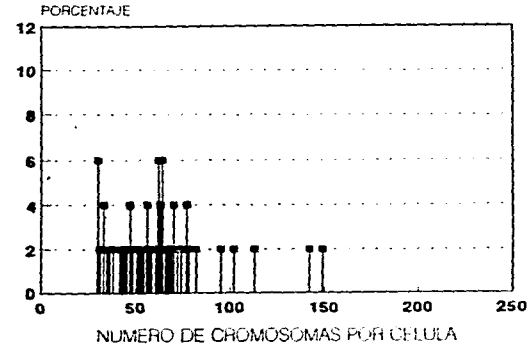
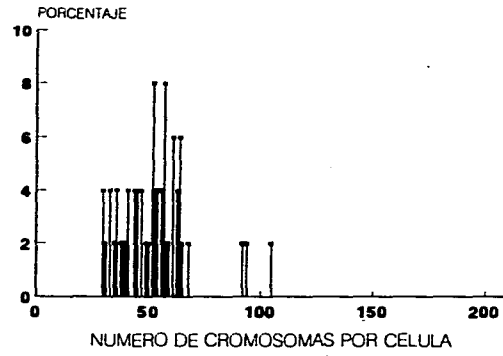
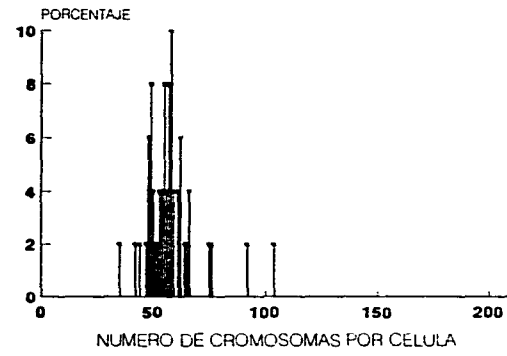


FIGURA 10: Porcentaje de metafases con diferente número de cromosomas despues de 24 horas de cultivo.

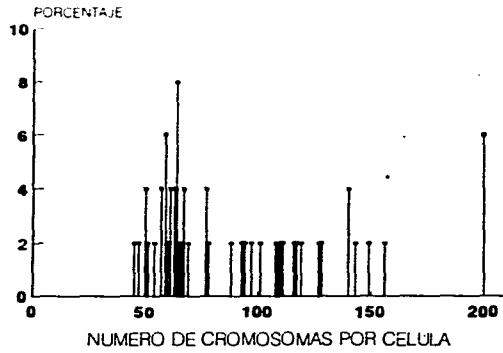
HeLa



SV2neo



Ec



Ej

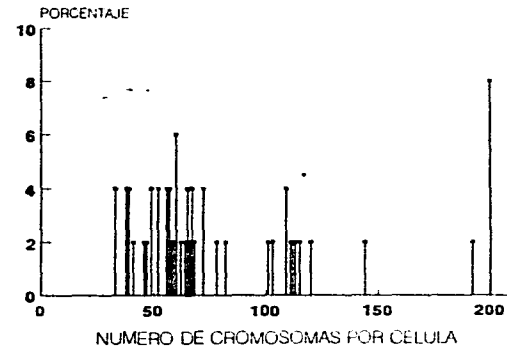
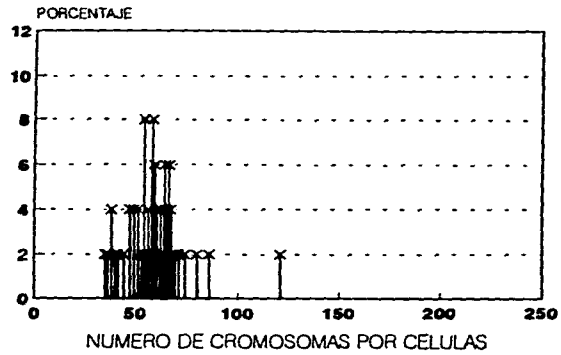
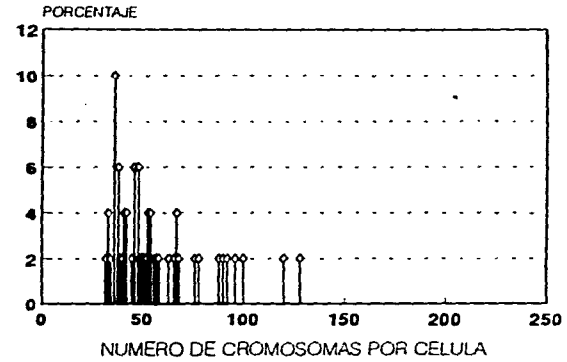


FIGURA 11: Porcentaje de metafases con diferente número de cromosomas después de 42 horas de cultivo.

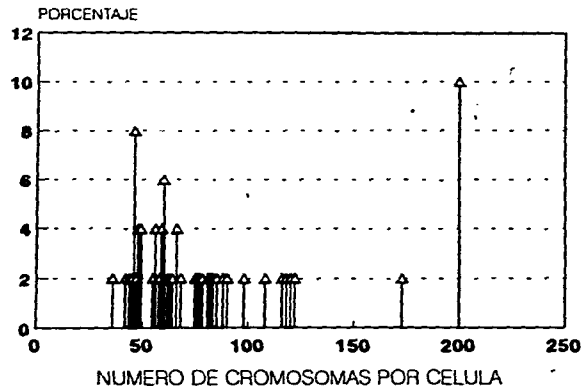
Hela



SV2 neo



Ec



Ej

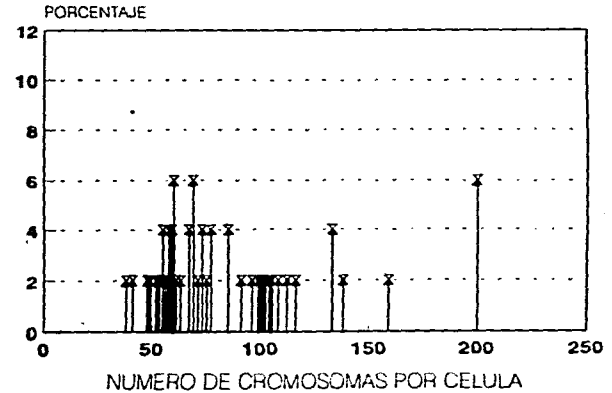


FIGURA 12: Porcentaje de metafases con diferente número de cromosomas después de 72 horas de cultivo.

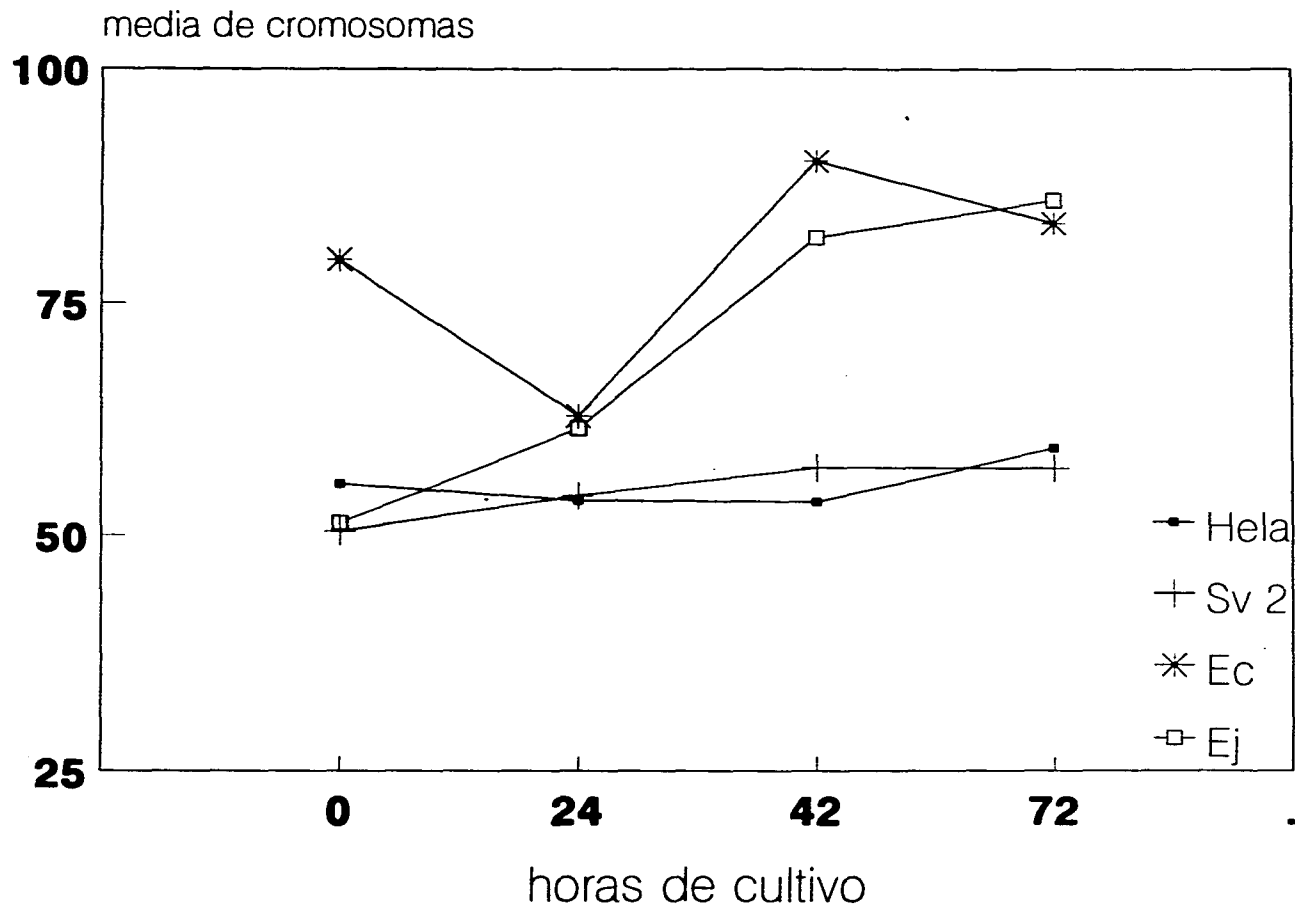


FIGURA 13: Comparación del número de cromosomas. Se muestra la media de cromosomas a diferentes tiempos para cada una de las cuatro clonas, se observan importantes incrementos en las clonas transfectadas con los genes ras normal (Ec) y ras mutado (Ej)

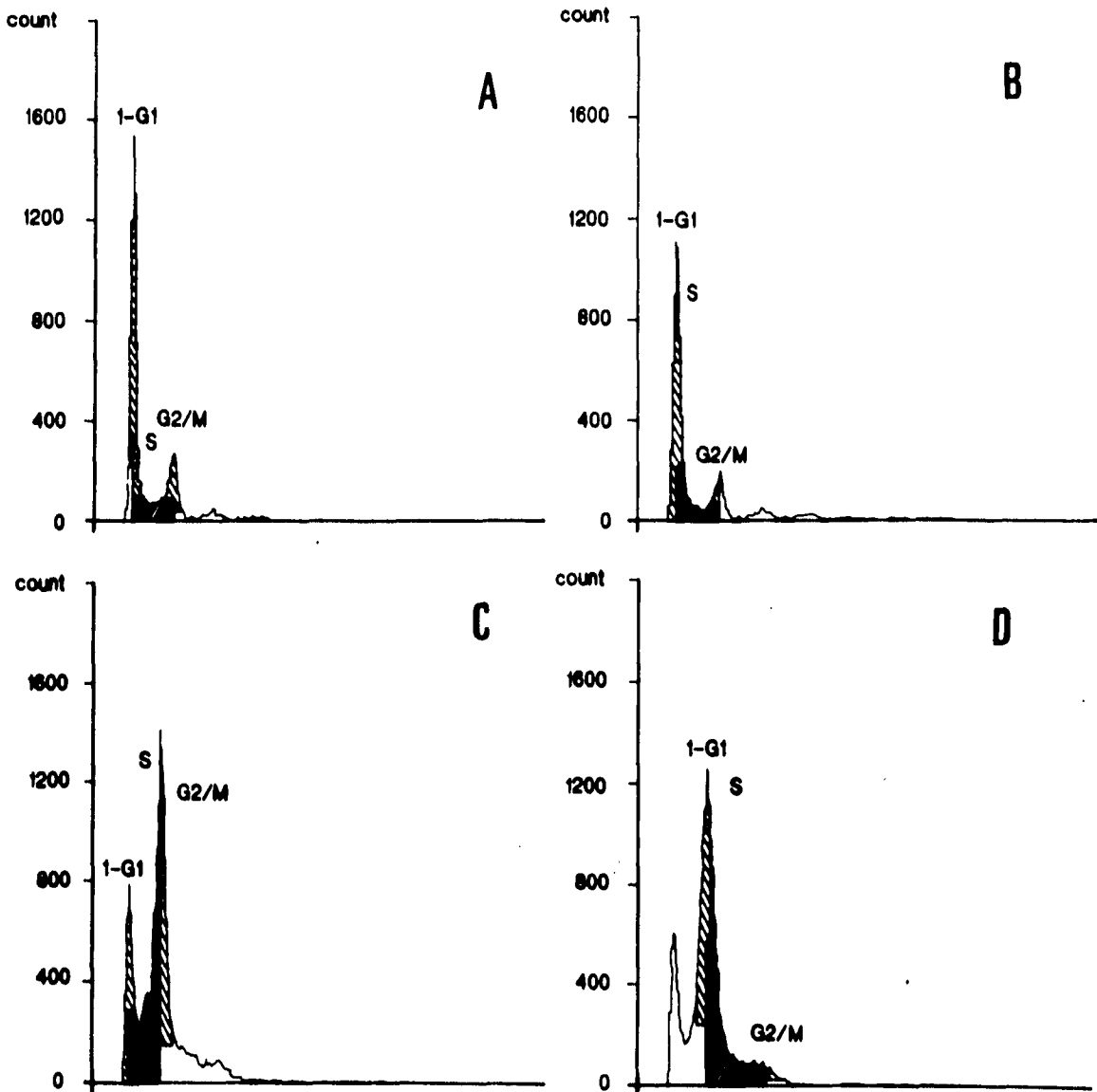


FIGURA 14: Diferencias en ciclo celular detectadas por citofluorimetría. Los histogramas muestran el número de núcleos analizados en función de su contenido de DNA. Esta figura representa el punto de las 42 horas para las células A) HeLa, B) SV2 neo, C) Ec neo y D) Ej neo. Se observa un arresto en la fase G2/M de las células transfectadas con los genes ras.

Análisis de ciclo celular por citofluorometría

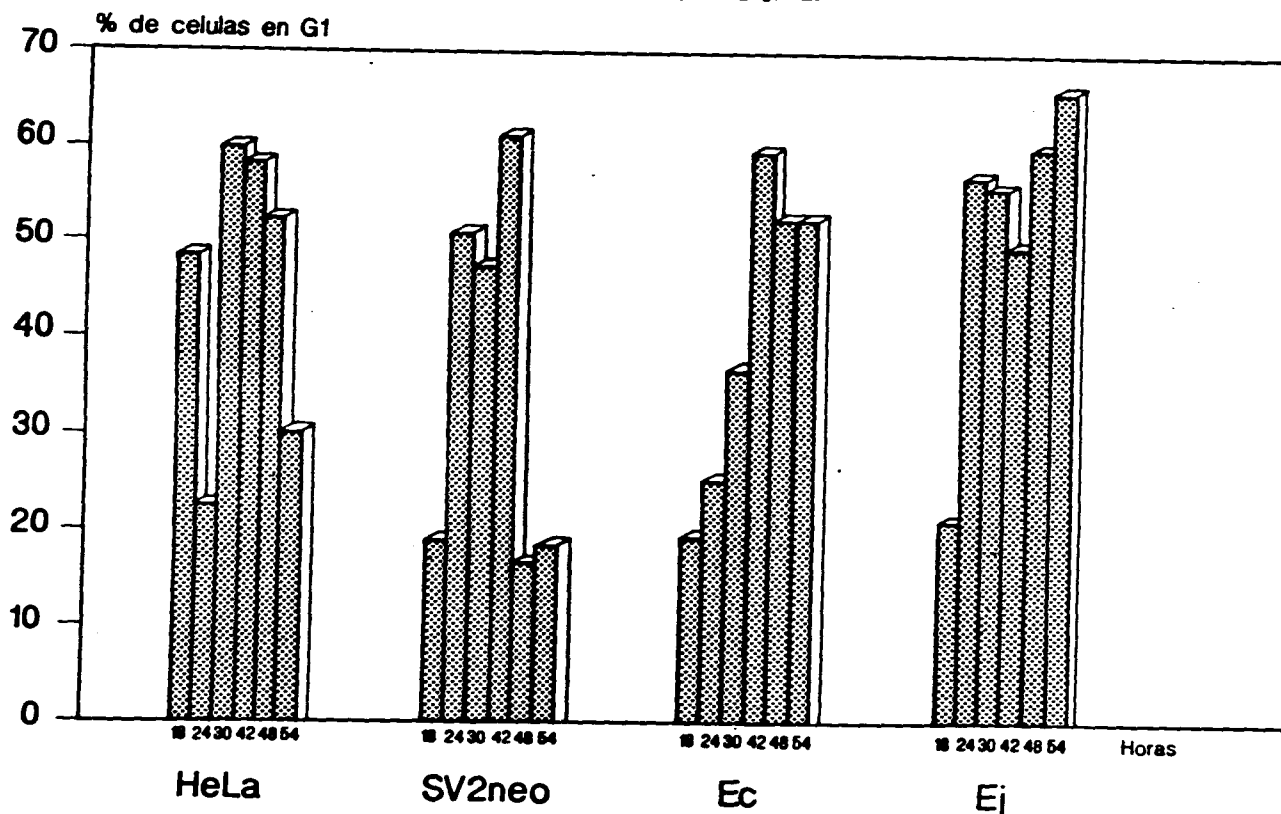


FIG 15: Cambios en el número de células en G1 a través del tiempo. Se muestran las alteraciones del ciclo celular de las células transfectadas en comparación con los controles. Esta figura se realizó tomando en cuenta los porcentajes de células en la fase G1, sabiendo que cierto número de células que están ciclando necesitan determinado tiempo para volver a alcanzar el porcentaje del cual partió, es así que vemos altas y bajas para para las células HeLa y SV2neo, mientras que para las clones Ec y Ej pareciera que los porcentajes en G1 se mantienen casi constantes a través del tiempo.

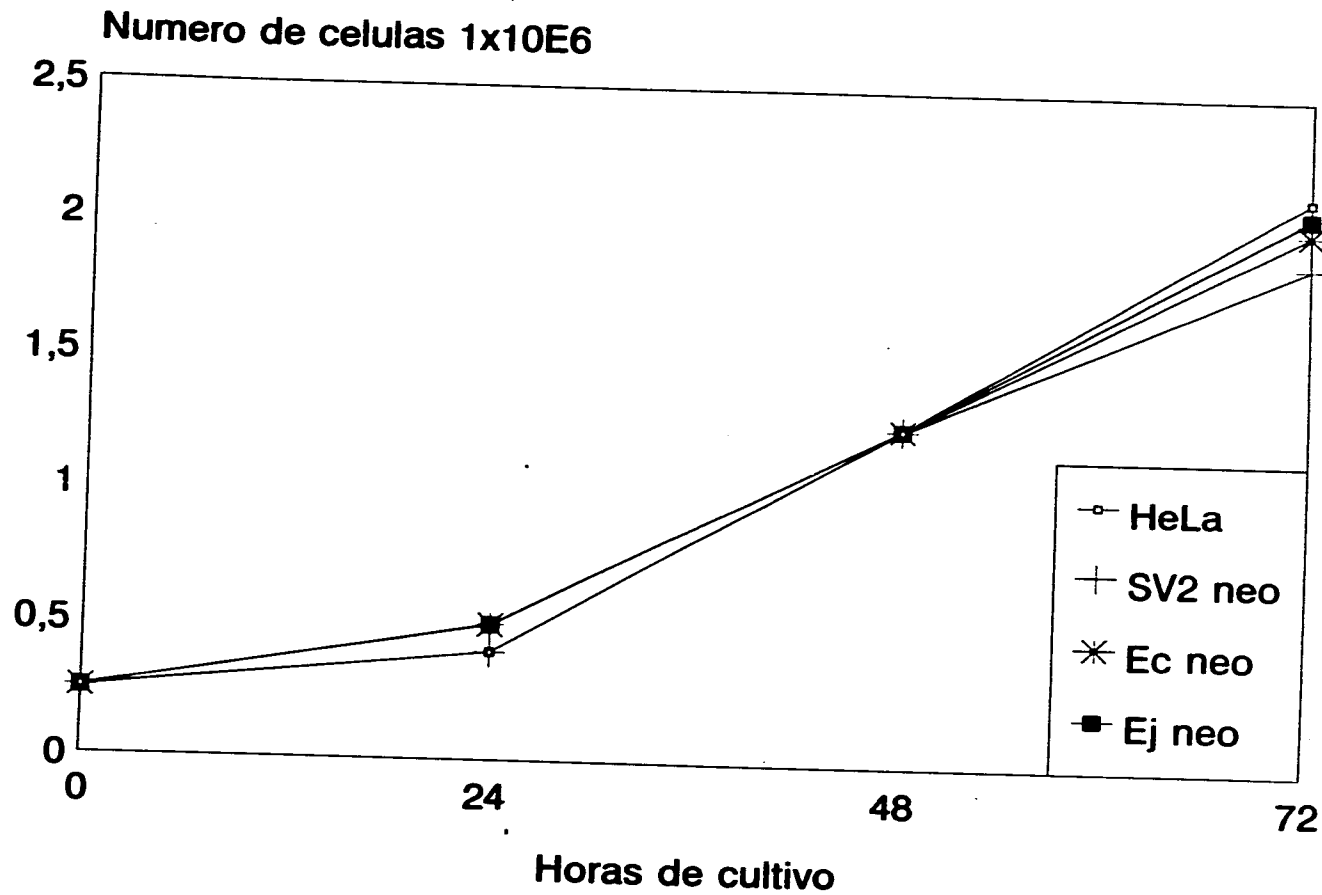


FIGURA 16: Viabilidad a través del tiempo. La figura muestra el número final de células después de 72 horas de cultivo.

ANEXO A

TABLA DE DATOS:
MEDIA DE CROMOSOMAS +/- D.S.

Clona	0 hr.	24 hr.	30 hr	42 hr	48 hr	66 hr	72 hr	90 hr
HeLa	55.68 +/- 15.68	53.80 +/- 11.7	52.34 +/- 10.02	53.66 +/- 17.14	56.10 +/- 15.94	55.58 +/- 13.31	59.58 +/- 22.95	55.54 +/- 13.41
SV2neo	50.41 +/- 10.98	54.34 +/- 15.0	48.09 +/- 19.31	57.46 +/- 11.64	51.17 +/- 18.20	63.02 +/- 17.83	57.37 +/- 23.77	61.29 +/- 30.24
Ec	79.52 +/- 50.33	62.94 +/- 26.96	59.04 +/- 42.92	90.02 +/- 41.30	58.94 +/- 25.98	80.78 +/- 41.02	83.48 +/- 47.13	50.15 +/- 13.17
Ej	51.30 +/- 14.68	61.70 +/- 25.18	72.61 +/- 39.63	81.92 +/- 47.27	51.84 +/- 13.70	53.36 +/- 12.16	85.92 +/- 39.60	64.40 +/- 35.92

ANALISIS ESTADISTICO

ANEXO B:

0 horas	SV2 neo	Ec	Ej
HeLa	0.0572	0.0019 *	0.1569
SV2 neo		0.0001 *	0.7349
Ec			0.0002 *
24 horas			
HeLa	0.0835	0 *	0 *
SV2 neo		0.0460 *	0.0764
			0.8135
42 horas			
HeLa	0.2024	0*	0.0001*
SV2 neo		0 *	0.0006*
Ec			0.3582
72 horas			
HeLa	0.6408	0.0124*	0.0001 *
SV2 neo		0.0059*	0 *
Ec			0.4860

Análisis estadístico correspondiente a la figura 7 (media de cromosomas). Se aplicó una t de student para cada uno de los puntos de la gráfica con ayuda del programa TADPOLE III.

* Valores con diferencia significativa, comparados con una $p < 0.05$