



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS**

**"ESTUDIO DE ONCOGENES SOBRE  
FUNCIONES CELULARES DE  
INTEGRINAS"**

294261

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**LICENCIADO EN INVESTIGACION**

**BIOMEDICA BASICA**

**PRESENTA:**

**HECTOR DE JESUS RINCON ARANO**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA**

**MEXICO, D. F.**

**JULIO 2001**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Dedico esta Tesis a :**

**A mi padre y mi madre**

Gracias por haberme dado la vida,  
gracias por haber confiado en mí,  
gracias por haberme heredado las cosas buenas de ustedes.  
Ambos son mi tesoro el cual valoro y del cual me siento muy orgulloso.

La vida nos ha dado tragos amargos, tragos difíciles pero también nos ha sonreído. Espero que esas sonrisas pase lo que pase sean las que siempre nos mantenga unidos con toda la fuerza de nuestros corazones.

De la nada crearon un tesoro para mi: mi vida y la oportunidad de vivirla junto a ustedes.

Los quiero con todo mi corazón.....

### **A mi güereja (LORENA)**

Tu me has visto crecer de la nada a lo que ahora soy. Tu me has enseñado a conocer el amor en las buenas y en las malas. Tu forjado un castillo dentro de un solitario corazón. Tu eres mi aire el cual necesito respirar a cada latido de mi corazón. Tu .... eres mi presente y quiero que seas mi futuro.

El mejor amor es aquel que ante todo mantiene su amistad, confianza y pasión.

Tu eres mi ½ naranja y sé que eres el amor de mi vida. Lo que sigue en mi vida es para ti....

**Para Ivonne,**

Siempre serás mi niña, la niña que me ha enseñado que el respeto existe. Gracias por poner en mí toda tu confianza. Aunque me perdí de momentos importantes en tu vida, sé que los mejores momentos los estoy viviendo cerca de ti, actualmente. Eres la mejor te quiero muchísimo

**Para Marco,**

Aunque creas que no me interesas, siempre me has interesado. Fuiste mi compañero de la infancia y mi cómplice de miles de travesuras. Sin embargo crecimos y divergimos en nuestros caminos, me costó respetar tu camino. Espero que algún día llegues a respetar y entender el mío y mi forma de ser.

**Al Dr. Rosales,**

Por su paciencia, por enseñarme la parte divertida de la ciencia. Y sobre todo por haberme dado confianza y rienda suelta para la realización de este proyecto. Algún día seré un Lord Master of the universe ( aunque no lo creo superar ).

**A las ratas apestosas de Erick y Gerardo**

Gracias por cada momento y sonrisa, pero sobre todo por la amistad tan grande que me han brindado.

**A Nancy, Gerardo, Tania, Marbella, Rodris, Itzel y Yenisei,**

Los mejores amigos con los que el azar me premio, deseo que esta amistad sea por siempre .....p.d. Gracias por enseñarme a bailar.

**A Esperanza,**

Por enseñarme a valorar cada experimento y sobre todo la vida

**A Lorena R.P. y Mariely,**

La secundaria fue mi mejor etapa, y estoy feliz que todavía queden grandes trozos de esos tiempos en nuestra amistad. Mis hermanas siempre serán.....

**A Chelito y Yuriria ,**

Las sonrisas es lo mejor que puede existir a su lado, gracias

**Al cuevón, ( Francisco, Orvil, Holguer e Ivan)**

Su apoyo en diversos momentos fue fundamental para no enloquecer en esta fría ciudad.

**A mi abuelita Amparo**, por quererme muy a su modo, gracias.

A mis Abuelos (Carmen, Frutuoso y Ruben) con los que la vida no me permitió convivir como me hubiera gustado.

A mis Tías Carmen, Ursula, Beti, Silvia, Tére, Vilma, Lupita, Analuz. A Yolanda, Alma, Eva, Ximena, Margarita, Flor, la grupo funcional (Ester), la mimisa y la chiquis.

A mi Tio Güero, Jorge T., Isac y a todos mi primos y amigos.

A mi tía Elsa, y su familia que sin conocerme me tendió la mano.

A Doña Chole, gracia por su cariño y amistad, de grande quisiera ser como usted y seguirme riendo como usted solamente lo podía hacer, en donde quiera que este, gracias.(D.E.P)

Al Doctor Padilla, por su gran apoyo incondicional y su amistad

A David Naranjo, por ser como un padre académico que siempre confió en mí, e hizo realidad un sueño, conocer otra cultura, su cultura.

A Felix Recillas, por entrar al quite y por permitirme conocer mas de la ciencia.

A la familia Rosales Martinez por su ayuda, apoyo y espero algún día cortar flores de mi rosal para agradecerles.

A Nancy Mora, por su apoyo técnico y su amistad.

A los miembros del Labos: Merit Reyes, Gabriela Sánchez, Yazmín, la sra. Chuy, Oralia, y la Sra. Esther

A todos los que no mencionó pero viven en mi corazón de forma permanente... a todos, GRACIAS....

Contenido	i
Abreviaturas	iii
Resumen	iv
1 Introducción	1
1.1 Adhesión celular	1
Adhesión célula-célula	3
Adhesión a matriz extracelular	5
1.2 Moléculas de adhesión celular	7
Cadherinas	8
Selectinas	9
Moléculas de adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas	10
Integrinas	11
1.3 Integrinas: Receptores de matriz extracelular	12
Estructura	13
Familias de integrinas	15
Integrinas y contacto focales	15
Integrinas y cáncer	17
1.4 Transducción de señales	18
1.5 Regulación de Integrinas	19
Modulación de la afinidad de integrinas (activación)	20

	<b>Modulación de la agrupación de integrinas (avidez)</b>	<b>22</b>
	<b>1.6 R-Ras</b>	<b>24</b>
	<b>1.7 Cáncer Cérvico-Uterino</b>	<b>26</b>
<b>2</b>	<b>Planteamiento del problema</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>Hipótesis</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>Objetivos</b>	<b>30</b>
<b>5</b>	<b>Materiales y métodos</b>	<b>31</b>
<b>6</b>	<b>Resultados</b>	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>Discusión</b>	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>81</b>
<b>9</b>	<b>Referencias</b>	<b>82</b>

## **Abreviaturas**

PI-3K- Fosfatidil-inositol 3 cinasa

R-Ras- del ingles "Related Ras"

Fig. Figura (s)

h- horas

min- minutos

rpm- revoluciones por minuto

g- gramo (s)

**Palabras clave: Células de epitelio cérvico-uterino, R-Ras, PI-3K, Adhesión, Extensión celular.**

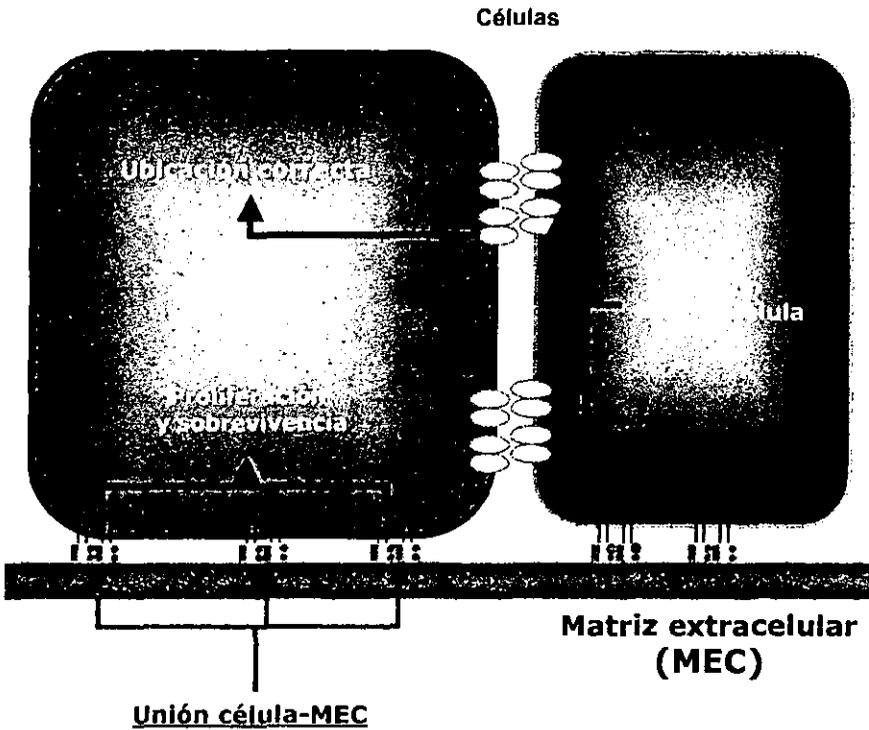
**RESUMEN.-** Las integrinas son los principales receptores de proteínas de matriz extracelular. La regulación de la adhesión mediada por integrinas ha demostrado ser de gran importancia para varios procesos celulares entre ellos la mitosis, diferenciación y transformación. R-Ras es una GTPasa de la superfamilia Ras que ha sido involucrada en la modulación de la afinidad (activación) de integrinas  $\beta 1$  que reconocen a fibronectina o colágenas. En este trabajo, nosotros demostramos que en células de epitelio cérvico-uterino R-Ras no activa integrinas  $\beta 1$  ni modula la adhesión inicial a fibronectina o a colágena tipo I. Sin embargo, R-Ras es capaz de modular, a través de fosfatidil-inositol 3 cinasa, la extensión celular sobre fibronectina y sobre colágena. Por otro lado, nosotros encontramos que las líneas celulares de epitelio cérvico-uterino son capaces de secretar metaloproteasas independientemente de la adhesión a matriz extracelular. Nuestros resultados exhiben una nueva función para R-Ras sobre las funciones celulares de integrinas, la cual consiste en modificar la extensión celular de forma independiente a la activación de integrinas.

## **1. Introducción**

### **1.1 Adhesión celular**

La adhesión celular es un proceso crítico para la génesis y la conservación de la organización tridimensional de cada tejido. Las células de un organismo multicelular se mantienen juntas por diversas interacciones moleculares adhesivas, las cuales se clasifican en adhesión célula-célula y en adhesión célula-matriz extracelular. La adhesión celular desencadena señales intracelulares que le permiten a una célula controlar su ciclo celular y localización dentro del tejido que la contiene. Las interacciones adhesivas han sido consideradas como mecanismos reguladores de procesos de proliferación y de diferenciación (Fig. 1). En condiciones fisiológicas, la mayoría de las células que pierden la adhesión a matriz extracelular, o la adhesión a otras células, sufren inestabilidad genómica y apoptosis (Fig. 2). De esta manera las interacciones adhesivas aseguran que una célula se mantenga en su sitio y se evita que adquiera una localización errónea [1].

A finales de los años 60's, se especulaba que las células poseían un mecanismo de adhesión que permitía la unión a diversas superficies, tanto celulares como proteicas [2]. Diferentes investigadores interesados en el tema suponían que las células deberían de poseer un código de ubicación, el cual determina la localización en tiempo y espacio para cada célula [3]. Años de estudios determinaron que este código de ubicación sí existe, y está determinado por diferentes entidades proteicas denominadas moléculas de adhesión.



**Fig. 1** Importancia de la adhesión celular. Las diversas interacciones que una célula realiza le proporcionan señales que le permiten proliferar. Estas interacciones son las que determinan la ubicación correcta de una célula. El diverso patrón de moléculas de adhesión que una célula posea, determina las interacciones que dicha célula realizará en su lugar (código de ubicación).

Para entender la serie de eventos que se producen durante la adhesión, se debe de determinar el funcionamiento de las moléculas que provocan dicho proceso. Las moléculas de adhesión son receptores que reconocen a sus ligandos sobre otras superficies celulares, o sobre las complicadas estructuras proteicas que rellenan los espacio extracelulares, denominada en conjunto como "Matriz Extracelular" [4]. Las moléculas de adhesión actúan como uniones indirectas entre la estructura extracelular que se reconoce como ligando y la compleja red de

microfilamentos de actina, microtúbulos o filamentos intermedios que componen intracelularmente al citoesqueleto [1, 5]. Dependiendo del tipo de adhesión y del tipo de receptor será el tipo de componente del citoesqueleto que responda a la interacción receptor-ligando. El resultado final será la modificación del comportamiento bioquímico celular que llevará a un cambio en la arquitectura celular [6].

Por otro lado, diversos estudios han determinado que la adhesión celular se ve comprometida también en diferentes patologías que afectan a los seres humanos, ya que la ausencia o alteración de los mecanismos de adhesión rompe la homeostasis del organismo [7, 8].

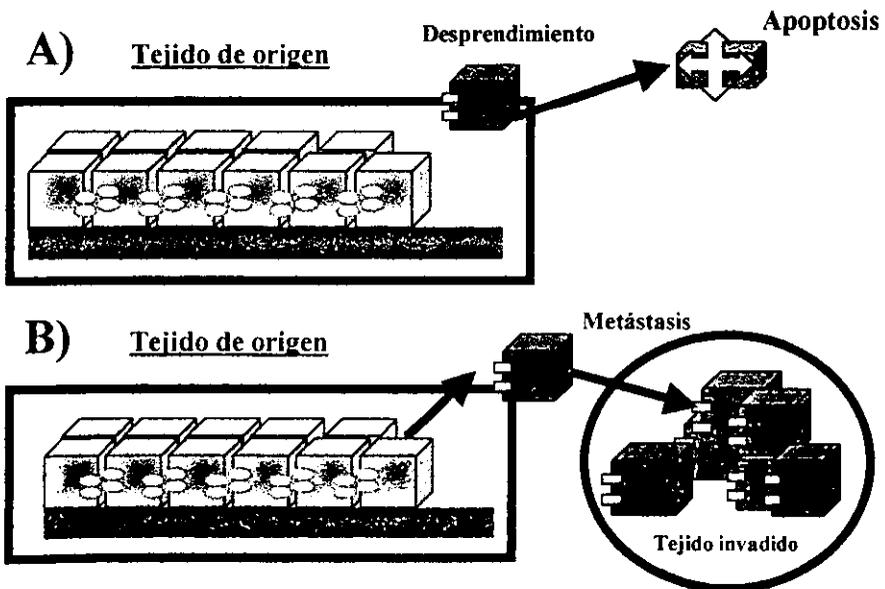


Fig. 2 Efectos originados por la falta de adhesión. A) En condiciones fisiológicas, una célula que se desprende de su ubicación sufre apoptosis, esto como mecanismo de control de ubicación. B) En cáncer, una célula transformada evade la dependencia de adhesión, por lo que no sufre apoptosis, y puede desprenderse de su ubicación correcta. Las nuevas habilidades adhesivas favorecen una ubicación errónea provocando metástasis.

## **Adhesión célula–célula**

El apropiado reconocimiento, la interacción, así como las señales entre células vecinas son procesos fundamentales para el desarrollo y manutención de la arquitectura y función de los tejidos [1, 9]. La interacción entre células vecinas desencadena señales que le permiten a una célula situarse apropiadamente dentro del tejido [2]. Esta clase de adhesión es realizada por moléculas de las familias de las cadherinas, de las selectinas, de la superfamilia de las inmunoglobulinas, y de las integrinas [6, 10]. La expresión diferencial de dichas moléculas entre varias estirpes celulares permite realizar interacciones y funciones específicas. Procesos como la repuesta inmunológica, homeostasis, e inflamación son en gran parte dependientes de las interacciones entre células [7].

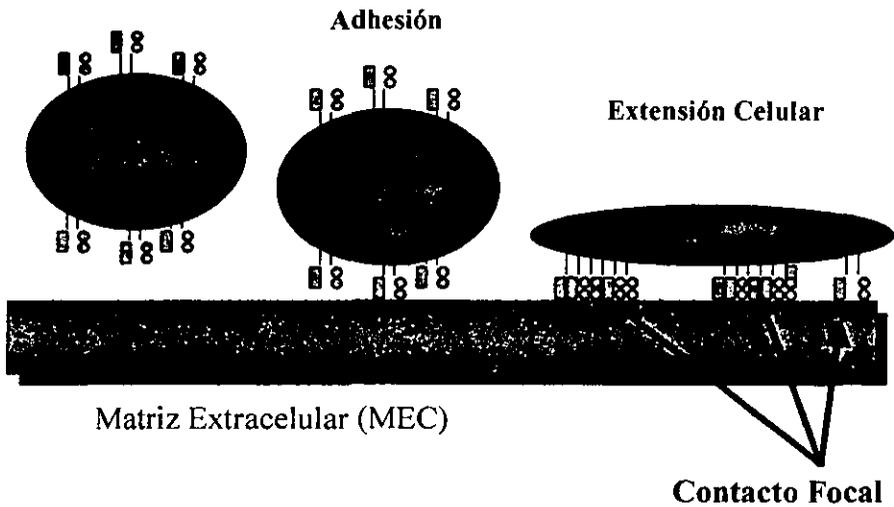
En la adhesión célula-célula se han caracterizado estructuras moleculares que se forman en respuesta a dicha adhesión, como son las uniones adherentes, las uniones desmosomales y las uniones cerradas [10]. La formación y manutención de tejidos sólidos son dependientes de las uniones adherentes. Las uniones desmosomales constituyen elementos de gran fuerza de tensión para tejidos de tipo cardiacos y epiteliales. Las uniones cerradas constituyen barrera de permeabilidad selectiva, formando interfaces entre dos compartimientos que necesitan mantenerse separados [10].

## **Adhesión a matriz extracelular**

La adhesión de las células a las proteínas que constituyen la matriz extracelular es crucial para la integridad de los tejidos. La matriz extracelular forma parte del microambiente que rodea a las células en organismos multicelulares. La migración, locomoción, extensión, diferenciación, la expresión de diferentes genes, entre otros procesos celulares son influenciados directamente por la matriz extracelular [11, 12]. La matriz extracelular está compuesta de colágenas, proteoglicanos y glicosaminoglicanos. Dichas moléculas se organizan para formar la matriz intersticial (compuesta principalmente de colágenas), y la membrana basal. La membrana basal cubre la superficie basal de casi todos los epitelios, rodeando a las fibras musculares o células nerviosas [11]. La membrana basal está constituida de glicoproteínas, incluyendo colágena IV, laminina, fibronectina, etc. Diversos estudios han demostrado que la matriz extracelular proporciona señales de supervivencia y proliferación, ya que en dicha red se concentran factores de crecimiento entre otros [1, 13, 14].

A diferencia de la adhesión célula-célula, en la cual la adhesión provoca una compactación celular, la adhesión a matriz extracelular resulta en una mayor extensión celular [15, 16]. Las integrinas son los principales receptores de proteínas de matriz extracelular y son los que llevan a cabo la extensión celular. Para dicha extensión se requiere de la polimerización y reorganización de los filamentos de actina, la extensión de protuberancias en la membrana (lamelipodia), interacción de las integrinas con la matriz extracelular y el agrupamiento de dichos receptores en las zonas de adhesión [17]. Actualmente, se ha demostrado que las interacciones iniciales de las integrinas con sus ligandos

disparan señales que regulan el proceso de extensión celular (Fig. 3) [18]. Sin embargo, existe la posibilidad de que la célula sea capaz de modular directamente la extensión celular, independientemente de la interacción inicial integrina-sustrato [10, 19, 20]. Nosotros pensamos que la adhesión inicial y la extensión son dos comportamientos diferentes realizados durante la interacción con la matriz celular. La manipulación de la densidad de la matriz extracelular es capaz de desencadenar por separado la adhesión y la extensión celular, ambos procesos mediados por integrinas [20].



**Fig. 3.-** Adhesión a matriz extracelular. Una célula en suspensión es capaz de interactuar con proteínas de la matriz extracelular utilizando integrinas. Posterior a los primeros contactos estables, la célula cambia su morfología de acuerdo a su entorno.

La matriz extracelular también juega un papel importante en metástasis, ya que las células tumorales tienen que atravesar la membrana basal para penetrar en otros tejidos [21-23]. El glaucoma o la deficiencia de adhesión de leucocitos son patologías también causadas por fallas en el proceso de adhesión a matriz extracelular [24, 25].

## **1.2. Moléculas de Adhesión Celular**

Los mecanismos de adhesión están dirigidos por moléculas especializadas (principalmente glicoproteínas transmembranales) que actúan como receptores para ligandos localizados sobre otra superficie celular. Así mismo, algunas moléculas de adhesión son capaces de reconocer ligandos sobre la matriz extracelular. Las moléculas de adhesión actúan como puentes que comunican a la estructura extracelular que se reconoce como ligando y a la compleja red de proteínas del citoesqueleto [18]. Es de importancia mencionar que las moléculas de adhesión reconocen a ligandos con baja afinidad [26]. Para que la adhesión sea estable, la célula agrupa moléculas de adhesión al sitio en donde se reconoció al ligando, proceso conocido como avidéz [27]. Lo anterior se puede explicar sobre la base de que una interacción débil es más fácil de modular o requiere menos energía que una interacción fuerte o de mayor afinidad.

Las moléculas de adhesión pertenecen a un limitado número de familias proteicas que incluyen a las integrinas, las cadherinas, las selectinas y la superfamilia de las inmunoglobulinas [28]. Estas familias de moléculas son capaces de actuar como receptores clásicos. En otras palabras estas moléculas son capaces de reconocer e integrar señales del espacio extracelular, y

desencadenar señales bioquímicas intracelulares que modulan, reprimen y/o cooperan con otras señales o funciones celulares [13, 29].

## **Cadherinas**

Las cadherinas son una familia de proteínas transmembranales dependientes de calcio involucradas, principalmente, en la adhesión célula-célula [30]. Dichas moléculas de adhesión participan en la formación de órganos y tejidos, por lo que se les conoce como receptores morforeguladores [31]. La adhesión se realiza a través del reconocimiento homotípico entre cadherinas de diferentes células [32, 33]. Hasta el momento se han caracterizado alrededor de 20 cadherinas, las cuales se han agrupado en dos subfamilias en base a su asociación con el citoesqueleto: las cadherinas clásicas y las desmogleinas [34]. Las cadherinas clásicas se encuentran en sitios denominados uniones adherentes, en los cuales dichas moléculas establecen interacciones con el citoesqueleto de actina. Las desmogleinas son un grupo de cadherinas asociadas a desmosomas capaces de interactuar con los filamentos intermedios de citoesqueleto [18].

La estructura de las cadherinas consiste de un extremo amino terminal formado de 5 secuencias repetidas en tandem, conocidas como regiones o dominios tipo cadherinas. Dichas regiones contienen sitios adhesivos (unión al ligando) y sitios de interacción con cationes divalentes, principalmente para iones calcio. La función de las regiones tipo cadherina es la de proporcionar al dominio extracelular rigidez y estabilidad [35]. Seguido a dichos dominios se ubican las secuencias que determinan el segmento transmembranal y el segmento correspondiente al extremo carboxilo terminal. Este último segmento consiste de

alrededor de 150 aminoácidos ubicados intracelularmente. El dominio intracelular interactúa con proteínas denominadas cateninas, las cuales son claves para la interacción con el citoesqueleto [18, 28].

## **Selectinas**

Las selectinas son moléculas especializadas cuya función, principal, es la de mediar la adhesión de células endoteliales y plaquetas a carbohidratos de leucocitos. La familia de las selectinas es pequeña y está compuesta de la L- (Leucocito), E-(Endotelial) y P-(Plaquetas) selectinas. Los ligandos de las selectinas son principalmente glicoproteínas localizadas sobre otras superficies celulares [36].

Las selectinas poseen en su amino terminal una región, de unión a carbohidratos, parecida a módulos tipo lectina. Esta región requiere de calcio para el reconocimiento de los carbohidratos. La región tipo lectina va seguida de un dominio tipo factor de crecimiento epidermal. Después presentan varias secuencias repetidas en tandem parecidas a las de proteínas reguladoras del complemento, encontrándose 2 en L-, 6 en E- y 9 en P-selectina. Finalmente, las selectinas poseen un dominio transmembranal y un dominio citoplásmico corto hacia el extremo carboxilo terminal [37, 38].

Existe poca información relacionada a la transducción de señales por selectinas. Se ha observado que las selectinas deben jugar un papel importante en las señales desencadenadas ante la interacción de los leucocitos con el endotelio [39].

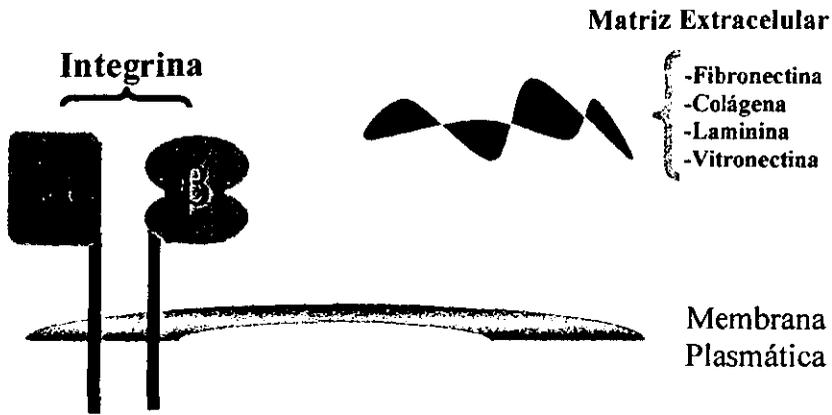
## **Moléculas de adhesión de la superfamilia de las Inmunoglobulinas**

Las moléculas de adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas participa, principalmente, en la adhesión célula-célula. Los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas ejercen sus funciones en una amplia variedad de células actuando en diferentes procesos, como por ejemplo: en inflamación y en la respuesta inmunológica [37, 40]. Esta familia es diversa y se han caracterizado alrededor de 100 miembros en vertebrados. Los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas participan en interacciones homofílicas, como la N-CAM (molécula de adhesión celular neuronal), o en interacciones heterofílicas reconociendo a otros miembros de la misma superfamilia, a integrinas o a proteínas de la matriz extracelular [37]. Esta familia se caracteriza por poseer, en el extremo extracelular, varias regiones o dominios tipo inmunoglobulina. Los dominios tipo inmunoglobulina son una estructura compacta de 60-100 aminoácidos. En dicha estructura se observan dos cisteínas separadas por aproximadamente 55 a 75 aminoácidos. La estructura secundaria de los dominios tipo inmunoglobulina se percibe como 2 estructuras  $\beta$ -planares antiparalelas. Los receptores de adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas posee una región amino terminal extracelular constituida por los dominios tipo inmunoglobulina. A estos dominios le siguen un segmento transmembranal y una cola intracelular constituida por la región carboxilo terminal [7].

## Integrinas

Los miembros de esta familia son los principales receptores de proteínas de matriz extracelular. Sin embargo, ligandos de ciertas integrinas pueden encontrarse sobre la superficie de otras células. Las integrinas juegan un papel importante en la adhesión a membranas basales, procesos dependientes de anclaje, en inflamación, en crecimiento, en la polarización de células, en apoptosis y migración a través de la matriz extracelular [41-43].

Las integrinas son proteínas transmembranales constituidas por dos diferentes subunidades unidas de forma no covalente. Dichas subunidades son denominadas como  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente (Fig. 4)[44]. Se han caracterizado alrededor de 18 subunidades  $\alpha$  y 9 subunidades  $\beta$  [45]. Las subunidades  $\beta$  son capaces de interactuar con diferentes subunidades  $\alpha$ . Así, las diferentes asociaciones  $\alpha\beta$  le dan diversidad a las interacciones que estos receptores de adhesión realizan. Hasta el momento se tienen caracterizadas alrededor de 25 integrinas [40]. Una característica sobresaliente de las integrinas es su capacidad de reconocer a diferentes ligandos o que diferentes integrinas reconozcan a un mismo ligando (Tabla 1). Las integrinas, aparte de mediar interacciones adhesivas, son capaces de desencadenar señales al interior de las células actuando como receptores clásicos [40].



**Fig. 4** Integrinas. Las integrinas están constituidas por dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente. Las diferentes combinaciones  $\alpha\beta$  son las que determinan el reconocimiento al ligando. Las integrinas  $\beta 1$  son los principales receptores de proteínas de matriz extracelular. Dentro de los ligandos que las integrinas  $\beta 1$  reconocen se encuentran las colágenas, fibronectina, laminina y vitronectina.

### 1.3. Integrinas: Receptores de matriz extracelular

Las integrinas actúan como puentes de comunicación entre la estructura extracelular que se reconoce y el citoesqueleto de las células. Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de las integrinas se encuentran expresadas diferencialmente entre diferentes estirpes celulares [46]. Dicha expresión resulta en la formación de heterodímeros específicos en cada célula en base al microambiente en donde dicha célula se localizará [47]. Los heterodímeros expresados ejercen diversas funciones tanto integrando señales del medio extracelular, como modulando el microambiente en el que las células se ubican [48, 49]. La estructura y función de las integrinas son determinantes para entender la adhesión a matriz extracelular.

**Tabla 1. Integrinas caracterizadas y sus respectivos ligandos.**

<u>Subunidad <math>\beta</math></u>	<u>Subunidad <math>\alpha</math></u>	<u>Ligando(s)</u>
$\beta_1$	$\alpha_1$	Lam, Col
	$\alpha_2$	Lam, Col
	$\alpha_3$	Lam, Col, Fn
	$\alpha_4$	Fn*, VCAM-1
	$\alpha_5$	Fn
	$\alpha_6$	Lam
	$\alpha_7$	Lam
	$\alpha_v$	Fn
$\beta_2$	$\alpha_L$	ICAM-1, ICAM-2
	$\alpha_M$	ICAM-1, iC3b Fb
$\beta_3$	$\alpha_X$	IC3b
	$\alpha_v$	Fn, Vn, Fb, VWF, TSP
	$\alpha_{Iib}$	Fn, Vn, Fb, VWF, TSP
$\beta_4$	$\alpha_6$	Lam
$\beta_5$	$\alpha_v$	Vn
$\beta_6$	$\alpha_v$	Fn

Asociación de subunidades de las integrinas y sus ligandos. Las diferentes combinaciones  $\alpha$  y  $\beta$  determinan el ligando a unir. Abreviaciones: ICAM-1, ICAM-2- molécula de adhesión intercelular 1 y 2-; iC3b - fragmento cortado de la proteína C3 del complemento-; Fb -Fibrinógeno-; Lam - Laminina-; Col -todos los tipos de Colágena-; Fn -Fibronectina-; Fn\* -variante por 'splicing' de Fibronectina-; VCAM-1 -Molécula de adhesión celular vascular 1-; Vn -Vitronectina-; VWF -Factor von Willebrand-; TSP -Trombospondina-.

## Estructura

Las integrinas están constituidas por dos diferentes subunidades unidas de forma no covalente, las cuales se denominan  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente (Fig. 4). Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  poseen un dominio extracelular, un segmento transmembranal y un pequeño extremo carboxilo terminal citoplásmico. La subunidad  $\beta_4$  posee un extremo citoplásmico de alrededor de 100 aminoácidos. El extremo extracelular de

las subunidades  $\alpha$  exhibe variabilidad en su secuencia, sin embargo la estructura se conserva. Dicho extremo contiene una serie de secuencias repetidas de aproximadamente 60 aminoácidos cada una. Cada secuencia repetida posee un sitio de probable unión a calcio. Algunas subunidades  $\alpha$  contienen una secuencia insertada entre el extremo amino y la primera secuencia de unión a calcio, denominada dominio I (Insertado) [45]. La estructura de las diferentes subunidades  $\beta$  es muy conservada entre sí. Las posiciones de 56 residuos de cisteína son conservadas entre las diferentes subunidades  $\beta$  secuenciadas hasta el momento. Muchas de estas cisteínas se encuentran en unidades repetidas de 4 residuos [45]. La caracterización bioquímica de las subunidades  $\beta$  ha demostrado que el extremo extracelular se dobla como una asa, la cual es estabilizada por puentes disulfuro entre cisteínas conservadas. La presencia de un dominio tipo I (de alrededor de 250 aminoácidos) en algunas subunidades  $\beta$  ha demostrado ser relevante para la función del heterodímero [50].

En términos de unión al ligando, diversos estudios han demostrado que ambas subunidades son necesarias para el reconocimiento del ligando [51]. Los dominios de mayor relevancia para el reconocimiento de ligandos son: a) Los sitios de unión a calcio y el dominio I localizados en la subunidad  $\alpha$ , y  $\beta$ ) el dominio tipo I localizado en la subunidad  $\beta$  [52]. La presencia de cationes divalentes (Calcio ó Magnesio) favorece el reconocimiento de la integrina por su ligando [53, 54].

## **Familias de Integrinas.**

Las diferentes combinaciones de heterodímeros  $\alpha/\beta$  determinan el ligando con el que se reconocerá. Las subunidades  $\beta$  interactúan con diferentes subunidades  $\alpha$ . Por lo cual se ha establecido que el nombre de las diferentes subfamilias de integrinas estará determinado por la subunidad  $\beta$  que posea dicho heterodímero (Tabla 1) [28, 55]. La familia de integrinas  $\beta 1$  es la principal responsable del reconocimiento de proteína de matriz extracelular [6]. La mayoría de las células expresan integrinas  $\beta 1$ , probablemente por la presencia de matriz extracelular en casi todos los tejidos. Las integrinas  $\beta 2$  se encuentran en células del sistema inmunológico, en el cual realizan interacciones célula-célula [7]. Las integrinas  $\beta 3$  se encuentran en plaquetas y en células epiteliales realizando interacciones a sustratos proteicos. Las familias restantes se expresan de forma diferencial en varios tejidos, realizando funciones diversas [1].

## **Integrinas y contactos focales**

La unión de las integrinas con sus ligandos conlleva al agrupamiento de dichos receptores en la zona de la membrana plasmática en donde se realizó la adhesión, dicha estructura es conocida como contacto focal [61]. Posteriormente, en estos contactos focales se reclutan filamentos de actina hacia los dominios citoplásmicos de las integrinas. Dicho reclutamiento es realizado por complejos proteicos que interactúan con el citoesqueleto y con los pequeños dominios citoplásmicos de las integrinas [62].

Los dominios citoplásmicos de las dos subunidades de las integrinas juegan papeles importantes en la formación de los contactos focales [16]. La subunidad  $\beta$  ha demostrado ser necesaria para dirigir a la integrina hacia los contactos focales [63]. Diferentes aminoácidos en el extremo citoplásmico de la subunidad  $\beta$  son determinantes para la interacción con proteínas que dirigen o estabilizan a la integrina en los contactos focales [64]. Por otro lado, la subunidad  $\alpha$  parece tener un papel negativo sobre la función de las integrinas. Ante la ausencia de unión a un ligando, los dominios citoplásmicos de las dos subunidades parecen estar muy cerca; dicha cercanía parece inhibir diversas funciones de la subunidad  $\beta$  (por ejemplo: el agrupamiento en los contactos focales) [65, 66]. La unión de la integrina con su ligando, así como señales intracelulares, retira el efecto negativo de la subunidad  $\alpha$  sobre la  $\beta$  [51]. Esta separación entre los dominios citoplásmicos permiten la interacción de la subunidad  $\beta$  con proteínas que interaccionan con el citoesqueleto [50]. El efecto de la subunidad  $\alpha$  es modulado por señales intracelulares que estimulan o inhiben el efecto negativo sobre la subunidad  $\beta$  (ver regulación de la adhesión en la sección 1.5) [67].

La formación de los contactos focales depende de la densidad de sustrato a la cual una célula se adhiere. Se ha demostrado que en bajas densidades de matriz extracelular, las células pueden adherirse pero no son capaces de extenderse sobre dicha superficie. En concentraciones altas de matriz extracelular, la extensión celular es acompañada de la formación de contactos focales [20]. La necesidad en la extensión celular de que las integrinas reconozcan una gran cantidad de ligando, propuso que las integrinas necesitan estar agrupadas para realizar dicho proceso. Posiblemente, la adhesión inicial este modulada por

eventos de reconocimiento y unión del ligando, o a través de señales intracelulares que favorecen la interacción integrina/ligando [68]. Por su parte, la extensión celular es un proceso dependiente, principalmente, de la formación de contactos focales y de la organización del citoesqueleto [16].

## **Integrinas y cáncer**

En condiciones fisiológicas, el desprendimiento de una célula de su lugar provoca la detención de su crecimiento y, subsecuentemente la muerte celular (Fig. 2A). En células adheridas, las integrinas desencadenan señales bioquímicas que permiten la proliferación y crecimiento celular, estos procesos son conocidos como dependientes de anclaje [29, 56]. La cinasa FAK y las GTPasas de la familia Ras son componentes primordiales de dichas señales bioquímicas. En procesos malignos, las células tumorales evaden la dependencia de anclaje con la ayuda de oncogenes [57]. Las células malignas pierden adhesividad y producen menor cantidad de matriz extracelular (Fig. 2B) [57]. Dichas células modulan las señales desencadenadas por integrinas en ausencia de adhesión, evitando la muerte celular [57, 58]. La pérdida de adhesividad de integrinas y de cadherinas en células tumorales favorece la migración a otros tejidos, proceso conocido como metástasis [8]. La metástasis es el proceso determinante en la malignidad de un tejido tumoral.

El papel de las integrinas es fundamental para la migración celular en un proceso invasivo. Algunas integrinas participan de forma más directa sobre la metástasis. La integrina  $\alpha v \beta 3$  es importante para la migración de melanomas [59].

En células tumorales de epitelio de mama, las integrinas modulan la expresión de metaloproteasas determinantes para la migración e invasión de dicho cáncer [60].

#### **1.4 Transducción de señales**

Las integrinas no sólo actúan como anclas de adhesión, si no que funcionan como receptores clásicos desencadenando señales bioquímicas capaces de modificar el comportamiento celular [69, 70]. En los contactos focales, las integrinas interactúan con diversas proteínas estructurales y de señalización. Moléculas como paxilina, talina y vinculina permiten la asociación y reclutamiento de proteínas del citoesqueleto, lo cual fortalece la adhesión a la matriz extracelular [71-73]. Los contactos focales son fuentes generadoras de señales intracelulares, las cuales pueden ser desencadenadas por moléculas como la cinasa asociada a integrinas (ILK) o la cinasa FAK [6, 73, 74]. Se ha demostrado que al menos 20 diferentes proteínas, incluyendo a las GTPasas Rho, Ras, las cinasas FAK, Raf y las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), son concentradas en los sitios de unión a matriz extracelular [61]. El reconocimiento de la matriz extracelular y el agrupamiento de integrinas provocaba un incremento en la fosforilación en tirosinas de diferentes moléculas intracelulares, entre ellas FAK [12, 75]. Dicha cinasa es capaz de interactuar con moléculas adaptadoras que modulan la actividad de proteínas involucradas en la división celular, por ejemplo a Ras y Src [76, 77]. Por otro lado, en varias transformaciones malignas (cáncer) en donde el requerimiento de adhesión es dispensable, la cinasa FAK se encuentra en estado activo [57, 78].

La familia de cinasas activadas por mitógenos (MAPK) forma parte esencial de las diversas señales desencadenadas por integrina [79]. Sus principales participantes son las cinasas ERK las cuales son capaces, a través de fosforilaciones, de modular otras vías de señalización o activar la expresión génica [80]. En leucocitos, el agrupamiento de integrinas en la superficie celular provoca la activación de ERKs para estimular la transcripción de interleucinas necesarias en los procesos inflamatorios [81].

### **1.5. Regulación de la adhesión: Señalización de adentro hacia fuera.**

La adhesión celular es muy dinámica, lo cual es causado por varios cambios rápidos que se establecen en las zonas de adhesión. Dichas zonas, consideradas inicialmente estables, han demostrado ser zonas de gran movilidad [43]. Las células pueden modular su estado adhesivo en respuesta a diferentes estímulos en cuestión de unos minutos. Esta modulación es desencadenada por vías de señalización intracelular, conocidas como señalización de adentro hacia fuera (del inglés "Inside-out signaling") [27]. La señalización de adentro hacia fuera es capaz de modular principalmente dos procesos: a) la afinidad de las integrinas (activación), y b) el agrupamiento de integrinas (avidéz) [44].

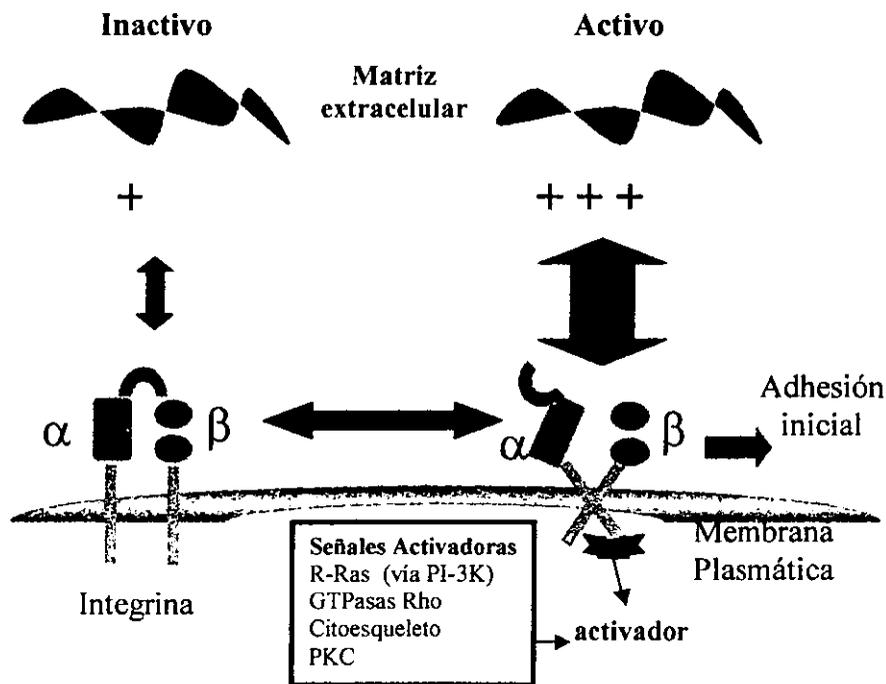
## **Modulación de la afinidad de la integrinas (Activación)**

Las células son capaces de desencadenar señales que provocan cambios en la afinidad de las integrinas por sus ligandos. La integrina de plaquetas,  $\alpha_{IIb}\beta_3$  fue la primer integrina caracterizada capaz de modular su afinidad. En plaquetas, la integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  es activada por trombina lo que permite la agregación de plaquetas en las zonas en donde existe una lesión. La trombina interacciona con receptores acoplados a proteínas G las cuales desencadenan señales que terminan un cambio conformacional de la integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Dicho cambio provoca que la integrina modifique su estado conformacional a un estado de mayor afinidad por su ligando, el fibrinógeno [19].

La caracterización estructural de la activación de las integrina ha empezado a conocerse. La integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ha sido utilizada como modelo experimental, con esta integrina se ha propuesto un mecanismo de "switch" de encendido y apagado. A través de resonancia magnética nuclear y utilizando péptidos miristilados, correspondientes a los dominios citoplásmico de la integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , se determinó que cambios conformacionales son transmitidos desde la región intracelular hasta el sitio de unión del ligando. Así mismo, dicho estudio determinó que la distancia entre las subunidades es inversamente proporcional al estado de activación [51]. Al parecer, la subunidad  $\alpha$  reprime la función de la subunidad  $\beta$ . Lo anterior es apoyado por estudios en los cuales se elimina el dominio citoplásmico de la subunidad  $\alpha$ , lo cual provoca que la integrina se mantenga en un estado de alta afinidad por su ligando [19, 73].

El modelo de "Swicht" propone que señales que modulan la adhesión alteran la cercanía de las regiones citoplásmicas del heterodímero  $\alpha/\beta$ . Una señal que active integrinas podría secuestrar la región citoplásmica de la subunidad  $\alpha$ , lo cual liberaría la región citoplásmica de la subunidad  $\beta$ . Dicha liberación se transmitiría hacia la región extracelular permitiendo la formación de un sitio de mayor afinidad por el ligando (Fig. 5). En el estado de baja afinidad, el dominio-I de la subunidad  $\alpha$  puede ser mantenido en una conformación cerrada, causado por la interacción alostérica de los dominios de unión a cationes en la subunidad  $\alpha$  y el dominio I en la subunidad  $\beta$  [51].

La activación de las integrinas es mediada por señales intracelulares que se desencadenan, principalmente, en respuestas a señales mitógenicas, entre otras. Integrinas de las familias  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  y  $\beta 7$  han demostrado tener la capacidad de activarse ante señales intracelulares [26, 27]. En los últimos 6 años, las GTPasas de la superfamilia Ras han sido involucradas como componente de las vías que conducen a la activación de integrinas. En un estudio diseñado para identificar supresores de la activación de integrinas, se demostró que H-Ras activado y su cinasa efectora Raf-1 inhiben la activación de integrinas [82, 83]. La GTPasa R-Ras, proteína homóloga de H-Ras, ha demostrado ser un regulador positivo de la activación de integrinas en varios tipos celulares [84]. Existe evidencia que involucra a la GTPasa Rho, componente de la superfamilia de Ras, en la activación de integrinas [85]. En resumen, las GTPasas parecen ser componentes importantes de las señales que modulan la afinidad de la integrinas [86] (Fig. 5)



**Figura 5.- Modelo propuesto para la activación de integrinas.-** La integrina en un estado de baja afinidad (+) acerca los dominios citoplásmicos de ambas subunidades, los cuales pueden acercarse por interacciones no covalentes. En dicho estado el dominio I de la subunidad α parece cubrir el sitio de unión del ligando. Ante la presencia de una señal activadora, la integrina aleja sus dominios citoplásmicos. Este cambio conformacional se transmite al dominio I de la subunidad α relajando su estructura, exhibiendo el sitio de unión al ligando y un estado de mayor afinidad (+++). Señales activadoras utilizan moléculas de señalización como R-Ras, Fosfatidil-inositol 3 cinasa (PI-3K), Proteína cinasa C (PKC), GTPasas Rho entre otras.

### Modulación del agrupamiento de integrinas (Avidéz).

La adhesión puede ser regulada a través de modular el agrupamiento de integrinas en los contactos focales, este proceso es conocido como avidéz (Fig. 6) [27]. El agrupamiento de las integrinas puede ser modulado por diferentes señales

intracelulares que remodelan las interacciones con el citoesqueleto o alteran la velocidad de difusión de las integrinas en la membrana plasmática (Fig. 6). Aunque para algunas integrinas la regulación de la activación y de la avidéz es determinante para la adhesión, para otras integrinas, tales como  $\alpha\text{L}\beta 2$  y  $\alpha 4\beta 1$ , la mayor regulación se observa en el ámbito de la avidéz [27].

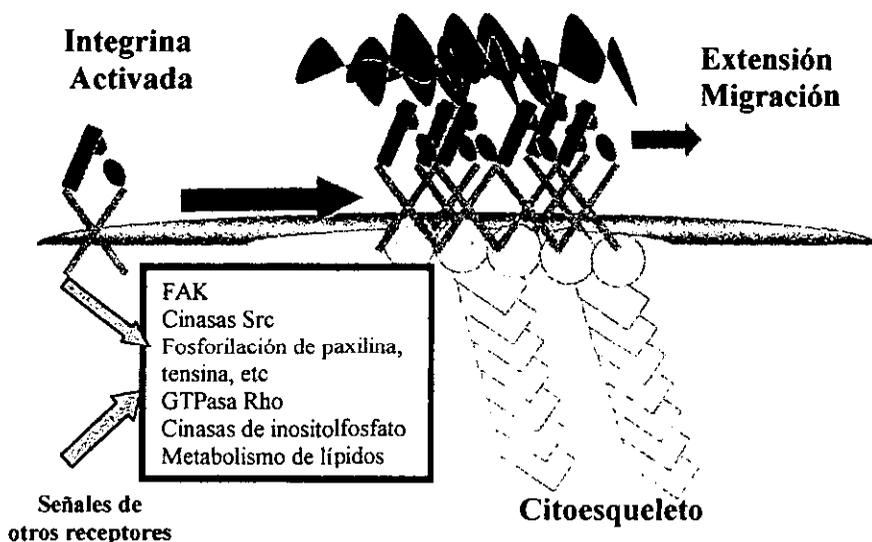


Fig. 6.- Modulación de la avidéz. Este proceso se basa en el agrupamiento de integrina en los puntos de contacto con la matriz extracelular. Las integrinas son reclutadas por diferentes proteínas (⊗) en respuesta a señales intracelulares. En estos contactos focales es donde el citoesqueleto se ancla.

Las señales que regulan la avidéz recaen en las proteínas que interaccionan con las integrinas y que modulan las interacciones con el citoesqueleto, como por ejemplo: Talina,  $\alpha$ -actinina y Filamina [87]. En este tipo de regulación la participación de las GTPasas de la superfamilia Ras es fundamental. Las GTPasas Rho, Rac y Cdc42 son capaces de modular las interacciones entre

las integrinas y el citoesqueleto, favoreciendo el ensamble de los contactos focales asociado con las fibras de estrés de actina [88]. En especial, la GTPasa Rho parece ser un modulador fuerte del citoesqueleto, ya que cambios en la actividad de dicha GTPasa modifican drásticamente a los filamentos de actina [88].

El citoesqueleto de actina forma diferentes clases de filamentos y la organización de estos es modulada por la formación de contacto focales [5]. La contractibilidad mediada por miosina ha demostrado ser fundamental para la génesis de los contactos focales [19]. La aplicación de tensión sobre la superficie adherida por integrinas es capaz de favorecer el agrupamiento de integrinas. Así mismo, agentes como citocalasina D (inhibidor del desensamble de actina) previenen el agrupamiento de integrinas [16].

## **1.6. R – Ras (del ingles ‘Related-Ras’)**

R-Ras es una GTPasa de la superfamilia de Ras involucrada en procesos de adhesión y apoptosis. R-Ras pertenece a esta superfamilia por su 55% de homología con H-Ras. R-Ras fue identificada por primera vez en 1986, a través de sondas semihomólogas a H-Ras y por hibridación no exigente [89]. R-Ras posee dos regiones, una contiene al sitio de GTPasa, que une a GTP con muy alta afinidad. Por otro lado, la región carboxilo terminal es procesada (famesilación y palmitoilación) para que la GTPasa se inserte en la membrana plasmática [90].

R-Ras ha sido involucrada en la activación de integrinas, modulando la afinidad de éstas por sus ligandos. En 1996 se describió que la expresión de R-Ras 38V (una forma constitutivamente activada de R-Ras) era capaz de incrementar la afinidad de la Integrina para fibronectina, reflejándose en un

incremento en la adhesión celular. Por otro lado, la expresión de una variante dominante negativa (R-Ras 43N) decrecía la adhesión a fibronectina [84]. Esos datos involucraron por primera vez a una GTPasa en la modulación de la afinidad de integrinas. Posteriormente, diferentes grupos han demostrado que R-Ras posee el mismo efecto en varios tipos celulares [67, 91, 92]. En 1999, se demostró que R-Ras ejerce su efecto sobre las integrina a través de modular los dominios citoplásmicos de la subunidad  $\alpha$  [67]. En dicho estudio R-Ras fue capaz de modular la migración y adhesión de epitelio de mama sobre colágena I, pero no sobre fibronectina. De esta manera se ha estipulado que lo efectores de R-Ras afectan a subunidades específicas de integrinas. El efecto de R-Ras ha demostrado ser dependiente de un sitio rico en prolinas que une a dominios SH3, los cuales producen interacciones proteína-proteína [93]. Los efectos de R-Ras sobre la adhesión y la apoptosis son dependientes, en muchos casos, de la cinasa PI-3K. Dicha cinasa ha demostrado ser capaz de interactuar directamente con R-Ras [91, 94].

Aunque los efectos de R-Ras sobre las integrinas están basados en la modulación de la afinidad, no se duda que la participación de R-Ras sea más compleja o involucre otros procesos.

## 1.7 Cáncer cérvico-uterino

El cáncer cérvico-uterino es una patología que provoca la muerte de 500,000 mujeres al año en todo el mundo. En México, este cáncer es la principal causa de muerte de mujeres [95]. La principal etiología asociada con el cáncer cérvico-uterino es el papilomavirus humano (HPV). Sin embargo, la formación de tumores de manera independiente a la infección con HPV es viable [95]. En dichos tumores la transformación se asocia a mutaciones en oncogénos como p53. Aunque la biología celular del cáncer de cérvix ha sido muy estudiada, poco se conoce en relación a los mecanismos de metástasis de dicho cáncer. Los estudios hasta el momento realizados se han basado en determinación inmunohistoquímica de ciertas moléculas de adhesión. Las cadherinas y las integrinas son las principales moléculas estudiadas, y cuyos patrones varían entre un tejido transformado y un tejido normal [108]. Dependiendo del estado de malignidad de un tumor de cérvix, diversos patrones de expresión de ciertas integrinas han sido detectados. La alteración de la expresión de las integrinas parece ser un marcador de malignidad.

Aunque estudios de expresión de moléculas de adhesión se han llevado a cabo, la función y regulación de estas no ha sido estudiada. Conocer los mecanismos que el epitelio de cérvix realiza permitirá conocer más sobre la biología de este epitelio en condiciones fisiológicas y en condiciones patológicas.

## 2. Planteamiento del problema

Las GTPasas juegan diversos papeles en la adhesión celular, tanto como moléculas de señalización de adhesión como moléculas reguladoras de dicho proceso. R-Ras es una GTPasa que participa en procesos celulares como apoptosis y adhesión celular. Las funciones biológicas de esta GTPasa y sus moléculas efectoras no son conocidas completamente. El estudio de los mecanismos que regulan la adhesión es determinante para entender procesos patológicos como el cáncer.

R-Ras es capaz de incrementar la afinidad de integrinas por fibronectina y colágena I en células de cáncer de epitelio de mama. Sin embargo, no se conoce el efecto de dicha GTPasa en célula de cáncer cérvico-uterino, la principal causa de muerte de mujeres en México. Nosotros nos interesamos en conocer si R-Ras afecta el estado de activación de las integrinas de células de cáncer cérvico-uterino. También, si R-Ras es capaz de modificar la adhesión de dichas célula a fibronectina y colágena I. Fosfatidil inositol 3 cinasa (PI-3K) es una molécula que modula los efectos celulares de varias GTPasas. En algunos tipos celulares R-Ras es capaz de interactuar con PI-3K, en células de epitelio cérvico-uterino, no existe reportes de interacción entre R-Ras y PI-3K, y por lo tanto desconoce su relevancia biológica.

Si R-Ras modula las funciones celulares de integrinas, dicha GTPasa probablemente modulará procesos posteriores a la adhesión celular, como la expresión de genes. En líneas celulares de epitelio de mama así como en otros tumores, las proteasas son fundamentales para la metástasis e invasión de nuevo tejidos. Nosotros pensamos que las líneas celulares de epitelio cérvico-uterino son capaces de secretar proteasas. Probablemente, las integrinas modulen la expresión de algunas proteasas secretadas por células de epitelio cérvico-uterino.

Este estudio pretende iniciar la caracterización de los mecanismos de adhesión de células de epitelio cérvico-uterino a matriz extracelular y su relación con procesos malignos.

### **3 Hipótesis de trabajo**

R-Ras es capaz de incrementar la adhesión de células de epitelio cérvico-uterino a fibronectina y colágena tipo-I. R-Ras puede incrementar el estado de activación de integrinas  $\beta 1$  de dichas células de epitelio cérvico-uterino y que dicho efecto puede ser modulado por PI-3K.

Las funciones celulares posteriores a la adhesión, como la secreción de proteasas, son moduladas por R-Ras.

#### **4 Objetivos**

Para probar las hipótesis planteadas se buscó completar los objetivos siguientes:

- Transfectar establemente células de epitelio cérvico-uterino con formas mutadas de R-Ras
- Hacer ensayos de adhesión a fibronectina y colágena I con células estables.
- Analizar el estado de activación de las integrinas  $\beta 1$  por citometría de flujo.
- Analizar el efecto de inhibidores de PI-3K sobre los efectos de R-Ras.
- Medir directamente la actividad enzimática de cinasas involucradas en la señalización de adentro hacia fuera.
- Analizar si las célula de epitelio cérvico-uterino producen proteasas de manera dependiente de la adhesión a fibronectina y colágena I
- Realizar zimogramas para conocer el efecto de R-Ras sobre la secreción de proteasas.

## **5 Materiales y Métodos**

### **Células**

Las líneas celulares de cancer cérvico-uterino C33 (ATCC), VIBO e INBL fueron cultivadas en medio DMEM (Gibco) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB), en ausencia de antibióticos y a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. La línea C33 es negativa para la presencia del virus de papiloma, mientras que las líneas celulares mexicanas VIBO e INBL son positivas para la presencia de virus del papiloma [95]. Las líneas celulares crecen en monocapa por lo cual se utiliza tripsina (Gibco) por 5 min a 37 °C para desprenderlas. Previo a cada ensayo, las células desprendidas se incuban 20 min a 37 °C en DMEM con el fin de que se recuperen del tratamiento con tripsina.

### **Inhibidores**

Para inhibir a la enzima fosfatidil-inositol 3 cinasa (PI-3K) se usó el inhibidor LY294002 (Calbiochem). Para detectar metaloproteasas se usaron EDTA (Sigma), quelante de iones divalentes, y 1-10 fenantrolina (Sigma), Inhibidor clásico para detectar metaloproteasas.

### **Anticuerpos**

Para la detección del epítipo de la hemaglutinina del virus de la influenza (HA) se utilizó el anticuerpo monoclonal (mAb) 12CA5 (Santa Cruz Biotechnology). La identificación de R-Ras se logró utilizando el anticuerpo policlonal anti-R-Ras C19 (Santa Cruz Biotechnology). Dicho anticuerpo reconoce los últimos 23 amino ácidos característicos de R-Ras. Para los ensayos de bloqueo de adhesión se

utilizan el mAb TS2/16 (anti-subunidad  $\beta 1$ ) y el mAb IB4 (anti-subunidad  $\beta 2$ ). El mAb 15/7 se utilizó para determinar el estado de activación de las integrinas  $\beta 1$ . Dicho anticuerpo fue gentilmente donado por el Dr. Ted A. Yednock (Athenas Neuroscience) [96]. Para inmunoprecipitar PI-3K se usó el anticuerpo monoclonal de conejo anti-PI-3K[p110 $\beta$ ] (Santa Cruz Biotechnology),

**Plásmidos:** La GTPasa R-Ras en sus formas mutadas R-Ras<sup>87L</sup> (constitutivamente activa) y R-Ras<sup>43N</sup> (dominante negativo) se clonaron en el plásmido retroviral pZIP. Del mismo modo, R-Ras87L se utilizó clonada en el plásmido pDCR. En dicha construcción R-Ras está fusionada al epítipo HA. Todos los plásmidos confieren resistencia a geneticina (G418)(Gibco), así como resistencia a ampicilina. Estas construcciones fueron donadas por la Dra. Adrienne D. Cox (University of North Carolina)[67].

### **Transfección de células C33**

*Método de co-precipitación de fosfato de calcio:*  $2 \times 10^5$  células se cultivan un día antes de la transfección en cada pozo de placas de 6 pozos. Se prepara el co-precipitado de fosfato de calcio y DNA agregando en un tubo de 12x75 mm 10  $\mu$ g del plásmido deseado, y completando a un volumen final de 105  $\mu$ l con agua desionizada. Se agregan entonces 105  $\mu$ l de 0.5 M CaCl<sub>2</sub>. Paralelamente, en otro tubo se agregan 210  $\mu$ l de una solución 2X HBS (280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12 mM D-Glucosa, 50 mM Hepes pH: 7.05), esterilizada por filtración. La mezcla de ADN y CaCl<sub>2</sub> se agrega por goteo al tubo con la solución 2X HBS. El tubo se agita suavemente y se incuba por 15 min a temperatura ambiente para permitir la formación del precipitado. Dicho precipitado se agrega

gota a gota a las células. Las células se incuban por 12 h a 37 °C. Posteriormente, las células se incuban con medio DMEM + 10% Glicerol por 3 min a temperatura ambiente. Después las células se lavan 3 veces con DMEM sin suero y se dejan incubando en DMEM con suero durante 36 h a 37°C. Después de esta última incubación, el medio se cambia por medio con G418 [DMEM + 10% SFB + 0.5 mg/ml de Geneticina (G418)] para seleccionar células que expresen R-Ras establemente. La presión de selección se mantuvo durante todo el estudio.

### **Transfección de células INBL y VIBO.**

*Método de transfección con Lipofectina:* se utilizó un método ya reportado de transfección rápida con lípidos catiónicos [97]. En dicho método, las células se agregan a la mezcla con ADN/Lípido y mientras las células se adhieren a la placa de cultivo, simultáneamente, se transfectan. Nosotros utilizamos el reactivo denominado lipofectina (Gibco), el cual es más recomendada para células de origen epitelial [97]. Para cada transfección, se diluyen el ADN (1 µg) y la lipofectina (3 µl) en 25 µl de medio DMEM cada uno por separado en una placa de 96 pozos. Las disoluciones de ADN y lipofectina se incuban por 5 minutos. Posteriormente, la disolución con lipofectina se mezcla con la disolución con ADN, y dicha mezcla se incuba durante 20 min a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos ADN/lipofectina. Por otro lado, se prepara una suspensión celular a una densidad de  $1 \times 10^3$  células/µl. Se toman 100 µl de la suspensión celular y éstos se agregan al pozo que contiene los complejos de ADN-lipofectina en la placa de 96 pozos. La mezcla de células con los complejos se incuba por 12 h a 37 °C. Pasada la última incubación, el medio de transfección

se retira y a las células adheridas se le agrega medio DMEM suplementado con 10% de suero. Las células se incuban por 24 h más a 37 °C. Finalmente, las células se incuban con el medio con G418 [DMEM + 10% SFB + 0.5 mg/ml de Geneticina (G418)] para seleccionar el crecimiento de células tranfectadas establemente. La presión de selección se mantuvo durante todo el estudio.

### **Cultivo de bacterias y purificación de plásmidos.**

Se prepara un cultivo de bacterias, previamente transformadas con los plásmidos de interés, en 5 ml de medio LB (Sigma) suplementado con 100 µg/ml de ampicilina a 37°C con agitación durante toda la noche. Dicho cultivo se añade a 500 ml de medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y se deja incubando durante toda la noche a 37°C en agitación. Las bacterias se recuperan centrifugando en frascos de 250 ml a 5000 rpm en un rotor JA-14 (Beckman) a 4°C durante 10 min. Se desecha el sobrenadante y el pellet de bacterias se resuspende en 10 ml de la solución P1 [50 mM glucosa, 25 mM Tris pH = 8, 10 mM EDTA y 5 mg/ml de lisozima], y se incuba por 15 min a temperatura ambiente. A la mezcla se le agrega 20 ml de la solución P2 [0.2 N NaOH, 1% SDS] y se deja incubando en hielo por 5 min. Finalmente, a la mezcla se le añade 15 ml de solución P3 [5 M acetato de potasio, 11.5% ácido acético glacial y agua bidestilada] fría y se deja incubando en hielo por 5 min.

Los lisados de bacterias se centrifugan 20 min a 10000 rpm a 4°C por 10 min en un rotor JA-14 (Bechman). El sobrenadante se transfiere a otro frasco y se le adiciona 25 ml de isopropanol. La mezcla se deja 15 min a temperatura ambiente para precipitar el ADN. La mezcla se centrifuga a 10000 rpm a 4°C por

30 minutos en un rotor JA-14 (Beckman), para recuperar el ADN. El sobrenadante se desecha y la pastilla de ADN se disuelve en TE [ 10 mM Tris pH=8, 1 mM EDTA], y se le agrega 4 g de CsCl y 300  $\mu$ l de bromuro de etidio (10 mg/ml). La mezcla se transfiere a tubos Quick-Seal Polyallomer de 13 x 15 mm [Beckman #342412] para gradientes de CsCl. Los tubos son sellados con calor y se colocan en un rotor NVT901 (Beckman). La centrifugación del gradiente se realiza a 85000 rpm por 3 h a 20 °C. La banda que contiene al plásmido de interés se recupera del gradiente y ésta se diluye en TE. Posteriormente, el exceso de bromuro de etidio se elimina por medio de extracciones con 1-butanol. La solución con ADN se dializa contra TE por al menos 2 h a 4 °C. Después de la diálisis, la solución con ADN se incuba con RNAsa [50  $\mu$ g/ml] por 1 h a 37 °C, y posteriormente con proteinasa K [50  $\mu$ g/ml] por otra hora. A cada tubo se añaden 300  $\mu$ l de cloroformo y 200  $\mu$ l de fenol para limpiar el ADN, luego los tubos se centrifugan a 14000 rpm durante 5 min en microcentrifuga. Se recupera la fase acuosa y este procedimiento se repite 3 veces. Para eliminar el exceso de fenol se agrega 300  $\mu$ l de cloroformo y se centrifuga a 14000 rpm durante 5 min en microcentrifuga, recuperándose la fase acuosa, lo anterior se repite 3 veces más. Para recuperar el ADN de la disolución final, se precipita el ADN con 2.5 volúmenes de etanol 100 % y 1/10 volúmenes de 3 M acetato de sodio. La mezcla con ADN y etanol se incuba por 24 h a -70 °C. Finalmente, los tubos se centrifugan a 14000 rpm por 5 min en microcentrifuga y la pastilla de ADN se resuspende en agua estéril y se guarda a -20 °C.

## **Ensayo de adhesión**

Placas de 96 pozos son recubiertas con proteínas de matriz extracelular, Colágena I (Col I), Fibronectina (FN), o albumina (BSA) a diferentes concentraciones, las cuales son descritas en los pies de figura. Las placas se incuban con las proteínas durante la noche a 4 °C, y posteriormente, son bloqueadas con 3% BSA en PBS [150 mM NaCl, 2 mM KCl, 5.6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH = 7.4] durante 2 h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se retira dicha solución. Finalmente, cada pozo de la placa es cubierto con 50 µl de 1% BSA en medio DMEM. Por otro lado, se prepara una suspensión celular a una concentración de 1000 células/µl en medio DMEM con 1% BSA. Se agregan 50 µl de la suspensión celular a cada pozo recubierto de proteína y las placas se incuban a 37 °C por 1 h. Transcurrido este tiempo, los pozos de la placa se lavan 3 veces suavemente con PBS, después cada pozo se incuba con 50 µl de una solución de cristal violeta [0.5 % cristal violeta, 20% metanol en PBS pH= 7.4] por 30 min a temperatura ambiente. La anterior incubación teñirá las membranas celulares. Finalmente, la placa es lavada con agua destilada 3 veces. Se agregan 100 µl de 1% SDS por pozo para lisar las células. El colorante que se desprende de las células se cuantifica en un lector de ELISA (Bio-Tek Instruments) a una longitud de onda de 590 nm.

## **Lisado de células**

1x10<sup>7</sup> células transfectadas establemente son centrifugadas a 6000 rpm por 1 min en una microcentrifuga. La pastilla celular se resuspende con 100 µl de una solución de lisis RIPA [150 mM de NaCl, 1% Triton X-100 (Sigma), 0.5 %

Deoxicolato de sodio, 0.5% de EDTA y 50 mM de Hepes] que contiene inhibidores de fosfatasa (1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  y 1 mM de p-nitrofenil fosfato) e inhibidores de proteasas (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Aprotinina, 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Leupeptina, 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Pepstatina, y 2 mM de PMSF)]. La mezcla formada se incuba en hielo durante 20 min y posteriormente se centrifuga a 14,000 rpm durante 5 min a 4 °C en una microcentrifuga. Finalmente, el sobrenadante se recupera y se pasa a un tubo nuevo para ser congelado a -70 °C o para ser usado inmediatamente.

### **Electroforesis**

La cámara de electroforesis (BioRad) se monta como lo sugiere el fabricante. Se preparan geles (resolvedor) al 7.5% de acrilamida para detectar a PI-3K y al 12 % de acrilamida para detectar a R-Ras. Los geles al 7.5% de acrilamida se preparan mezclando 1.25 ml de solución amortiguadora de corrida [48 mM de HCl, 3 M Tris base, pH= 8.9], 1.875 ml de la solución de acrilamida al 40 % [38.96 g de acrilamida (BioRad), 1.04 g de bis-acrilamida (Bio Rad) en agua desionizada], 100  $\mu\text{l}$  de 10% dodecil sulfato de sodio (SDS), 100  $\mu\text{l}$  de 10% persulfato de amonio (APS), 10  $\mu\text{l}$  de TEMED y llevando todo a 10 ml con agua desionizada. A la mezcla resultante se le permite polimerizar en la cámara de electroforesis, así mismo por encima del gel se coloca una capa de n-butanol para dejar el borde superior del gel uniforme. Después de la polimerización del gel, el n-butanol se retira.

Para los geles al 12% se mezclan 1.25 ml de solución amortiguadora de corrida, 3 ml de la solución de acrilamida al 40 %, 100  $\mu\text{l}$  de 10% SDS , 100  $\mu\text{l}$  de 10% APS, 10  $\mu\text{l}$  de TEMED y llevando todo a 10 ml con agua desionizada. A la

mezcla se le permite polimerizar y se sigue el procedimiento hecho con los geles al 7.5%.

Para formar el gel concentrador (al 3.5% de acrilamida) se mezclan 1.25 ml de solución amortiguadora concentradora [500 mM Tris base pH= 6.7 en agua desionizada], 0.75 ml de acrilamida 40%, 100  $\mu$ l de 10% SDS, 100  $\mu$ l de 10% APS, 10  $\mu$ l de TEMED y llevando todo a 10 ml con agua desionizada]. A la cámara de electroforesis (con los geles de 12 o 7.5% de acrilamida) se le instala un peine de 0.5 mm y sobre el gel resolvedor polimerizado se agrega la mezcla del gel concentrador, a este último se le permite polimerizar. Las muestras de interés son mezcladas con el amortiguador de muestras [ 5 ml de la solución amortiguadora concentradora, 1 g SDS, 4 ml de glicerol, 5 mg de azul de bromofenol], posteriormente, las muestras son hervidas durante 5 min a 100°C y cargadas en los geles. Los geles se corren en una solución amortiguadora de corrida [25 mM Tris base, 190 mM glicina y 1 % SDS en agua desionizada] a 20 mA por aproximadamente 1.5 h.

### **Western Blot**

La membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) se moja con metanol por 15 segundos, se enjuaga con agua destilada y se incuba 15 min en solución amortiguadora de transferencia [ 25 mM de Tris-HCl, 192 mM glicina y 20 % de Metanol, pH= 8.3]. Por otro lado, el gel en donde se resolvieron las proteínas de interés se monta en el dispositivo de transferencia. El dispositivo se monta colocando: una esponja, papel filtro, el gel, la membrana de PVDF, una segunda capa de papel filtro y por último otra esponja. La transferencia se realiza en

aparatos para minigeles (BioRad) siguiendo las instrucciones del fabricante colocando la membrana en dirección al polo positivo, a 500 mA por 2 h.

La membrana de PVDF con las proteínas transferidas, se lava dos veces con PBS y se deja en una solución bloqueadora [ 5% de leche Carnation libre de grasas, 1% de BSA y 0.05 % de Tween-20 en PBS] durante toda la noche. Posteriormente, la membrana se incuba durante 1 hr a temperatura ambiente con el anticuerpo deseado [ 1µg/ml de anti-HA, 0.1 µg/ml anti-p110β o una dilución de 1/500 de anti-R-Ras C19] diluido en la solución bloqueadora. La membrana se lava cinco veces con PBS y se deja incubando durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario [anti-IgG de ratón o anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa] diluido en la solución bloqueadora. La membrana se lava cinco veces con PBS y se transfiere a un recipiente que contenga el substrato quimioluminiscente "SuperSignal" (PIERCE) durante 5 min. Finalmente, la membrana se expone por 10 min o más a una placa fotográfica para rayos X.

### **Inmunoprecipitación**

100 µl de lisado celular se colocan en un tubo eppendorf y se le agrega 1 µg del anticuerpo deseado. La mezcla se incuba durante 2 h a 4 °C en agitación en una rueda giratoria. Posteriormente, al lisado se le agregan 40 µl de proteína A-Sefarosa (Pharmacia Biotech.) disuelta en PBS y todo se incuba por 4 h a 4 °C en la rueda giratoria. Después, la mezcla se centrifuga a 3000 rpm durante 1 min en microcentrifuga y el botón de safarosa se lava dos veces con la solución RIPA y cinco veces con PBS. Posteriormente, la proteína A-Sefarosa se mezcla con 35 µl de solución amortiguadora de muestra y se hierve a 100 °C durante 5 min. La

mezcla resultante se centrifuga a 3000 rpm durante 1 min en microcentrifuga y se recupera el sobrenadante. El contenido del sobrenadante se analiza por Western blot.

### **Citometría de Flujo**

Por cada anticuerpo a usar,  $1 \times 10^6$  células son resuspendidas en 100  $\mu$ l de la solución de FACS ( 0.5 % BSA, 1% sucrosa en PBS) fría y se incuban por 10 min en hielo. Se agrega entonces el anticuerpo de interés [50  $\mu$ l de una dilución 1/1000 de líquido de asitis o 50  $\mu$ l de anticuerpo purificado a 1  $\mu$ g/ml] y se incuban en hielo durante 45 min. Las células se lavan 3 veces con PBS centrifugando a 6000 rpm por 1 min en microcentrifuga. Posteriormente, las células se resuspenden en 100  $\mu$ l de solución de FACS y se agregan 20  $\mu$ l de una dilución 1/10 de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> anti-IgG de ratón marcado con isothiosianato de fluoresceína (FITC). Finalmente, las células se lavan 3 veces con PBS y se les agregan 500  $\mu$ l de 1% paraformaldehído en PBS. Las células se registran en un aparato para FACScan (Beckton Dickinson), registrándose la emisión del FITC a longitud de onda de 520 nm.

### **Zimogramas**

500  $\mu$ l de sobrenadante (medio condicionado) de las líneas celulares crecidas a confluencia son colectados en tubos eppendorf. Los tubos se centrifugan 2 min a 14000 rpm en microcentrifuga para eliminar restos celulares. A 150  $\mu$ l de medio condicionado se les agregan 50  $\mu$ l de amortiguador de muestra Laemmli 4X [10% SDS, 40% Glicerol, 50% amortiguador espaciador y se lleva a 10 ml con agua desionizada]. Las muestras se pueden usar al momento o

congelar inmediatamente a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para la electroforesis se prepara un gel resolvidor mezclando 1.25 ml de amortiguador resolvidor, 2.125 ml de acrilamida 40%, 100  $\mu\text{l}$  de 10% SDS, 100  $\mu\text{l}$  de 10% APS, 4 ml de solución 5 mg/ml de gelatina (gelatina de piel de porcino tipo A - SIGMA-) y 10  $\mu\text{l}$  de TEMED. La gelatina ha ido usada como un sustrato promiscuo para la identificación de proteasas.

Para el gel concentrador al 3.5% de acrilamida se mezclan 1.25 ml de solución amortiguadora concentradora [500 mM Tris base pH=6.7 en agua desionizada], 0.75 ml de acrilamida 40%, 100  $\mu\text{l}$  de 10% SDS, 100  $\mu\text{l}$  de 10% APS, 10  $\mu\text{l}$  de TEMED y llevando todo a 10 ml con agua desionizada]. A la cámara de electroforesis (con los geles de 12 o 7.5% de acrilamida) se le instala un peine de 0.5 mm y sobre el gel resolvidor polimerizado se agrega la mezcla del gel concentrador, a este último se le permite polimerizar. Las muestras de los medios condicionados son corridas a 25 mA en la fase concentradora y a 30 mA en la fase resolvidora, la corrida dura aproximadamente 1 h y se realiza a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Terminada la corrida, se desarman las cámaras de electroforesis y se recupera el gel. El gel se lava durante 30 min 5 veces con PBS en agitación a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, el gel es incubado en una solución para proteasas [Tris-base 50 mM pH= 7.8, 150 mM de NaCl, 5 mM de  $\text{CaCl}_2$ ] durante 24 ó 48 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, el gel es teñido con una solución de azul de coomassie [5 g de Azul de Coomassie, 600 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ , 300 ml de metanol, 100 ml de ácido acético glacial] durante 30 min. Pasado este tiempo, el gel es decolorado con la solución desteñidora [ 45% de metanol, 10% de ácido acético glacial, 45% de  $\text{H}_2\text{O}$ ]. La degradación de la gelatina (proteólisis) se registra en las zonas claras enmarcadas por el fondo azul. Para

caracterizar el tipo de proteasas se utilizan los inhibidores EDTA (6 mM) y 1-10 fenantrolina (1 mM) en la solución para proteasas durante el tiempo de incubación [98].

### **Ensayo de extensión celular ("cell spreading").**

Placas de 12 pozos se recubren con Colágena tipo I, Fibronectina o BSA a una concentración de 15  $\mu\text{g/ml}$  (aprox. 2  $\mu\text{g/cm}^2$ ). La placa se incuba durante una noche en agitación a 4 °C, después se elimina la solución con la proteína. 100  $\mu\text{l}$  de una suspensión celular (2 x 10<sup>5</sup> células/ml en DMEM) se agregan en el centro de cada pozo de la placa. Las células se incuban por 1.5 h a 37 °C. Posteriormente, se agregan 100  $\mu\text{l}$  de una solución fijadora [ 2.5% formaldehído, 2.5% de glutaraldehído en PBS pH= 7.3] y se incuba por 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se cuentan 120 células de campos diferentes al azar y se registra cuántas células se expandieron [98].

Las células de los ensayos de extensión celular fueron estudiadas por microscopia para determinar el área de la extensión. Utilizamos un microscopio invertido (Nikon), con un aumento de 40X y el área en pixeles se determinó utilizando el programa de computación Scion Image versión Win98 1998 (Scion Corporation. Inc).

### **Ensayos de actividad de PI-3K**

Inicialmente, PI-3K fue inmunoprecipitada de lisado de células C33 con 1  $\mu\text{g}$  de anticuerpo anti-PI-3K (subunidad p110 $\beta$ ) por 2 hr a 4 °C. A la mezcla se agregó 20  $\mu\text{l}$  de la proteína A-Safarosa y todo se incubó por 2 h más a 4 °C. Las perlas de

safarosa fueron lavadas 3 veces con PBS frío suplementado con 1% NP-40 y 1 mM ortovanadato de sodio, la mezcla se lavó 3 veces con 100 mM Tris pH=7.4 y dos veces con un amortiguador TNE (10 mM de Tris pH= 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA) y 100  $\mu$ M de ortovanadato de sodio. Los inmunoprecipitados fueron resuspendidos en 70  $\mu$ l de amortiguador para ensayo de cinasa (10 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 100 mM  $MgCl_2$ , 0.88 mM ATP, 7.5  $\mu$ Ci [ $\gamma$ - $^{32}P$ ] ATP -0.11 TBq/mmol; 2 mCi/ml- y 20  $\mu$ g de L- $\alpha$ -fosfatidil-inositol). La mezcla fue incubada a temperatura ambiente por 30 min y la reacción fue detenida agregando 20  $\mu$ l de 6 N HCl. Los lípidos fueron extraídos de la mezcla con 100  $\mu$ l de  $CHCl_3:CH_3OH$  (1:1 v/v), mezclando fuertemente y centrifugando a máxima velocidad en una microcentrifuga por 5 min. 50  $\mu$ l de la fase orgánica fueron colocados a una placa de sílica gel oxilada. Los lípidos fueron resueltos por cromatografía de capa fina usando una mezcla de disolventes  $CHCl_3:CH_3OH:H_2O:NH_4OH$  (60:47:11.3:2 v/v). La actividad de PI-3K fue detectada exponiendo la placa de sílica gel a una placa de autoradiografía, la exposición duró alrededor de dos semanas a  $-70$  °C. Para evaluar que la cantidad de PI-3K inmunoprecipitada, una alícuota de la muestra fue separada y se aplicó un ensayo de Western Blot utilizando el anticuerpo anti-PI-3K (subunidad p110 $\beta$ ).

## 6. RESULTADOS

### *Las células de cáncer cérvico-uterino son capaces de adherirse a fibronectina o colágena tipo-1 a través de integrinas $\beta 1$ .*

Hasta el momento no existe una caracterización de la adhesión de células de epitelio cérvico-uterino. Así, nosotros determinamos inicialmente, a través de ensayos de adhesión, si las células de epitelio cérvico-uterino C33 reconocían específicamente a proteínas de matriz extracelular. Células C33 fueron incubadas en placas recubiertas con colágena tipo-I, fibronectina, ó albúmina (control negativo). La adhesión a albúmina fue baja o casi nula. La adhesión a fibronectina o a colágena tipo-I fue mayor respecto a la adhesión con albúmina (Fig. 6). La adhesión a fibronectina fue mayor que a colágena tipo-I, aun cuando ambas proteínas se encontraban en la misma concentración (Fig. 6). Estos datos muestran que las células C33 de epitelio cérvico-uterino son capaces de reconocer y adherirse específicamente a fibronectina y colágena I.

Como las integrinas  $\beta 1$  son los principales receptores de matriz extracelular en una gran variedad de células nosotros determinamos si la adhesión a proteínas de matriz extracelular era dependiente de integrinas  $\beta 1$ . Utilizando anticuerpos contra integrinas  $\beta 1$ , nosotros estudiamos el bloqueo de la adhesión a fibronectina. Previo al ensayo de adhesión, incubamos las células C33 con anticuerpos anti- $\beta 1$  (TS2/16) o anti- $\beta 2$  (IB4). La adhesión a fibronectina fue completamente bloqueada con el anticuerpo TS2/16 (Fig. 7). El anticuerpo anti- $\beta 2$  (IB4) no afectó la adhesión de las células C33 a fibronectina. Por lo tanto, las integrinas  $\beta 1$  en células de cérvix modulan la adhesión a fibronectina.

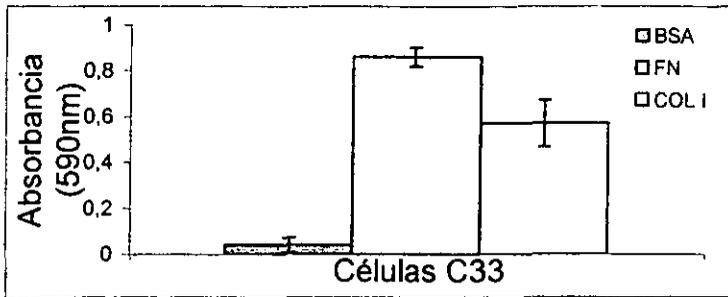


Fig. 6.- Adhesión de células C33 a proteínas de matriz extracelular. Las células C33 fueron incubadas durante 1 h a 37°C en una placa de 96 pozos recubierta, con albúmina (BSA), con fibronectina (Fn) o con colágena I (Col I) ( 10 µg/cm<sup>2</sup>). Las células adheridas fueron teñidas con cristal violeta y la absorbancia del colorante se registró a una longitud de onda de 590 nm. Experimento representativo de 3 determinaciones. Los datos son promedios ± error estandar de quintuplicados.

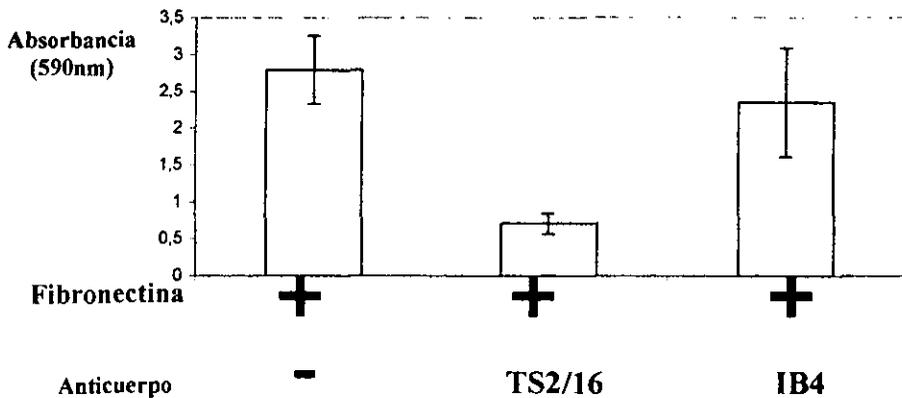


Fig. 7.- La adhesión de células C33 a fibronectina es mediada por integrinas β1. Las células C33 fueron preincubadas con los anticuerpos que anti-β1 (TS2/16) o anti-β2 (IB4) durante 30 min a 37°C. Posteriormente, las células se incubaron en placas para ensayos de adhesión recubiertas de fibronectina (10 µg/cm<sup>2</sup>). La células adheridas se cuantificaron tiñendo con cristal violeta y la absorbancia del colorante se registró a una longitud de onda de 590 nm. Ensayo representativo de 3 determinaciones. Los datos son el promedio ± error estandar de triplicados.

### ***Expresión de formas mutantes de R-Ras en líneas celulares de epitelio cérvico-uterino***

La línea celular C33 de epitelio cérvico-uterino fue transfectada por el método de co-precipitación de fosfato de calcio. La eficiencia de transfección en esta línea celular con dicho método es de 20 % (dato no mostrado). Las células C33 fueron transfectadas con la mutante constitutivamente activa de R-Ras (R-Ras87L), con la mutante dominante negativa (R-Ras43N), así como con los respectivos vectores en los cuales dichos mutantes fueron clonados (Tabla 2). Al menos 6 subclonas (líneas estables) fueron aisladas para cada plásmido.

La transfección de las células VIBO e INBL por el método de co-precipitación de fosfato de calcio fue de una eficiencia muy baja. Lo anterior dio como resultado que no se obtuvieran células transfectadas establemente. Para la obtención de células estables de las líneas VIBO e INBL se utilizó el método de transfección por Lipofectina (Tabla 2). La transfección con lípidos catiónicos (Lipofectina) fue 5 veces más eficiente en estas líneas celulares, lo cual favoreció la obtención de poblaciones de células transfectadas establemente en presencia de geneticina. Las líneas VIBO e INBL fueron transfectadas con la forma activada de R-Ras87L o con el vector pDCR en el que esta mutante fue clonado. Posteriormente, 5 subclonas de células estables fueron aisladas a través de diluciones seriales.

Para demostrar que las células C33 expresaban establemente a las mutantes de R-Ras, la presencia de dichas moléculas fue evaluada por Western Blot. El gen de la mutante R-Ras87L se encuentra fusionado al epítipo de hemaglutinina (HA) del virus de la influenza, lo que facilita su identificación. Las

células transfectadas con R-Ras87L o el vector vacío (pDCR) fueron lisadas y la presencia del epítipo HA fue determinada con el anticuerpo monoclonal 12CA5 (Fig. 8A). Las células positivas para el anticuerpo 12CA5 fueron, exclusivamente, las transfectadas con el oncogén R-Ras87L, lo que nos dice que dicho oncogén es expresado establemente.

**Tabla 2.- Líneas celulares transfectadas establemente.**

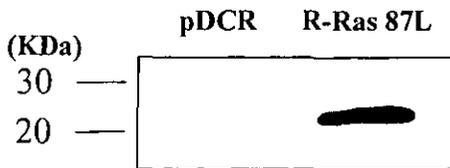
<i>Línea celular</i>	<i>Plásmido transfectado</i>	<i>Mutación</i>	<i>Efecto</i>
<b>C33 control<sup>^</sup></b>	PDCR		vector vacío
<b>C33 p87L</b>	R-Ras 87L en pDCR <sup>+</sup>	R-Ras Q87L	GTPasa constitutivamente activa
<b>C33 control</b>	pZIP		vector vacío
<b>C33 87L</b>	R-Ras 87L en pZIP (87L)	R-Ras Q87L	GTPasa constitutivamente activa
<b>C33 43N</b>	R-Ras 43N en pZIP	R-Ras S43N	GTPasa dominante negativa
<b>VIBO control<sup>*</sup></b>	PDCR		vector vacío
<b>VIBO p87L</b>	R-Ras 87L en pDCR <sup>+</sup>	R-Ras Q87L	GTPasa constitutivamente activa
<b>INBL control<sup>*</sup></b>	PDCR		vector vacío
<b>INBL p87L</b>	R-Ras 87L en pDCR <sup>+</sup>	R-Ras Q87L	GTPasa constitutivamente activa

<sup>^</sup> Transfectada por co-precipitación de fosfato de calcio, <sup>\*</sup>Transfectadas con lipofectina. <sup>+</sup>Este plásmido expresa a R-Ras87L fusionada al epítipo HA.

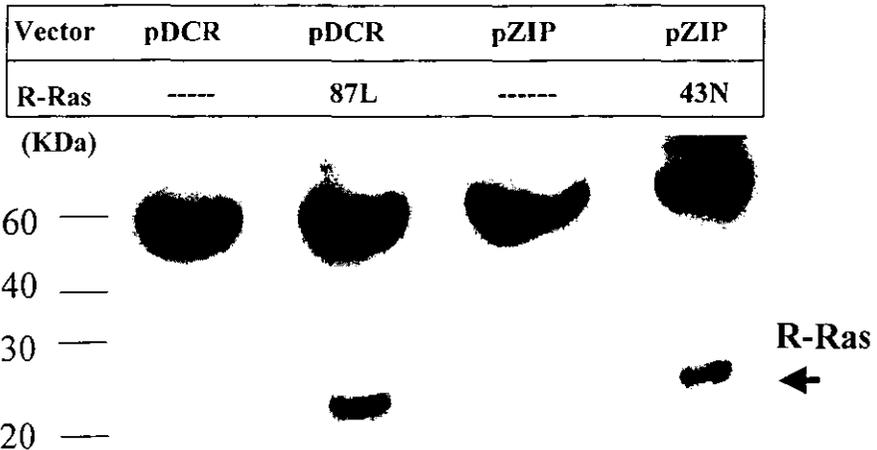
Para comparar la expresión de las variantes de R-Ras con los niveles endógenos de dicha molécula, lisados de células C33 se probaron por Western Blot con el anticuerpo anti-R-Ras C19 (Fig. 8B). Los niveles endógenos de R-Ras en las células transfectadas con los vectores vacíos fueron bajos. Por otro lado,

los niveles de R-Ras en las células transfectadas con las formas mutantes de R-Ras fueron superiores a los de las células transfectadas establemente con los vectores vacíos (C33 zip y C33 pDCR). Lo anterior nos dice que las líneas celulares C33 p87L y C33 43N sobreexpresan las formas mutantes de R-Ras en niveles semejantes.

A) WB: anti-HA



B) WB: anti-R-Ras

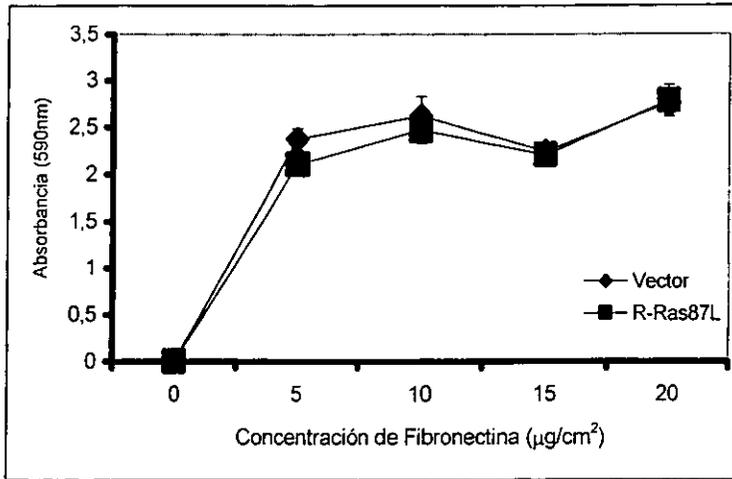


**Fig. 8 .-** Expresión estable de las formas mutantes de R-Ras. (A) Lisados de células C33 transfectadas establemente con R-Ras 87L o con el vector pDCR fueron examinadas por Western Blot con el mAb 12CA5 (anti-HA) (PAGE=7.5%). (B) Sobreexpresión de R-Ras 87L y R-Ras 43N. Los niveles de R-Ras fueron detectados en lisados de células transfectadas establemente con las mutantes R-Ras87L, R-Ras43N o el vector vacío. La expresión se determinó por Western Blot con el anticuerpo policlonal R-Ras C19 (PAGE=12%).

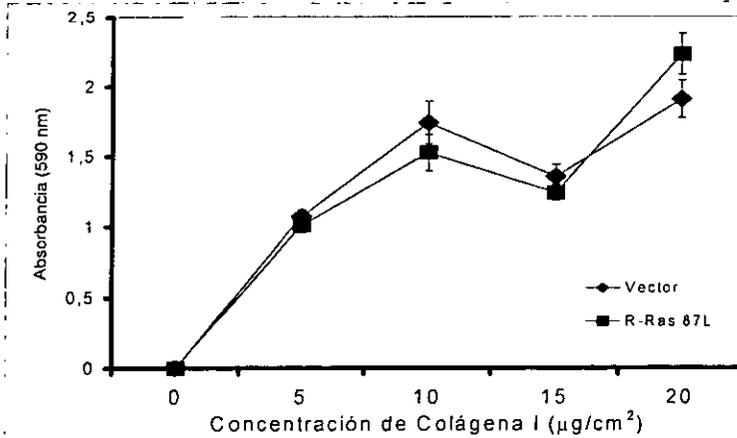
***La presencia de las mutantes de R-Ras en la células de epitelio cérvico-uterino no altera la adhesión a matriz extracelular.***

Se sabe que mutantes oncogénicas de R-Ras son capaces de incrementar la adhesión a fibronectina o colágena I de varias líneas celulares, a través de activar integrinas  $\beta 1$  [84]. Para determinar si R-Ras 87L era capaz de alterar la adhesión de células de cáncer cérvico-uterino a proteínas de matriz extracelular, nosotros realizamos ensayos clásicos de adhesión [98]. Células C33 transfectadas establemente con R-Ras87L o con el vector vacío, fueron incubadas en placas recubiertas de colágena I o fibronectina. Las células transfectadas con R-Ras87L se unieron a fibronectina o colágena I con la misma capacidad que las células transfectadas con el vector vacío (Figs. 9 y 10). Estos resultados muestran que la expresión forzada de la forma constitutivamente activa de R-Ras no tiene ningún efecto sobre la adhesión a colágena I o fibronectina, en las células C33.

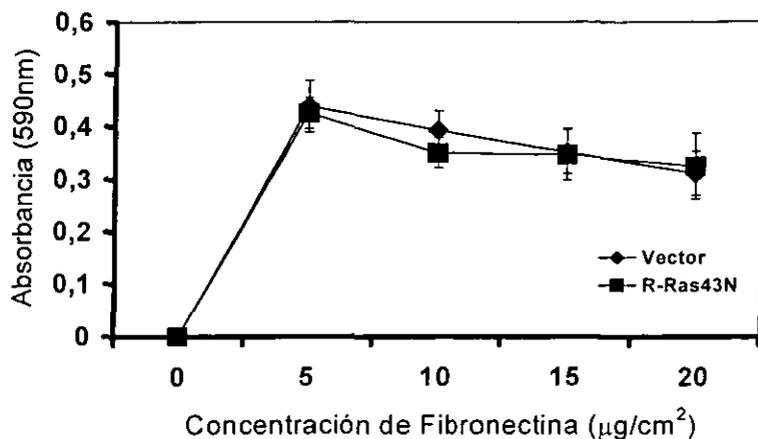
Para excluir que el efecto observado se debiera a que las células poseían ya una capacidad de adhesión máxima, que encubriera el efecto de la forma activada de R-Ras, nosotros probamos el efecto de la forma dominante negativa de dicha GTPasa. La adhesión de las células C33-R-Ras 43N a fibronectina no fue diferente respecto a las células transfectadas con el vector vacío (Fig. 11). El resultado anterior también se observó en la adhesión a colágena I (Fig. 12). Estos resultados sugerían que la presencia de la forma dominante negativa de R-Ras en células C33 tampoco altera la adhesión a colágena I o a fibronectina, en estas células.



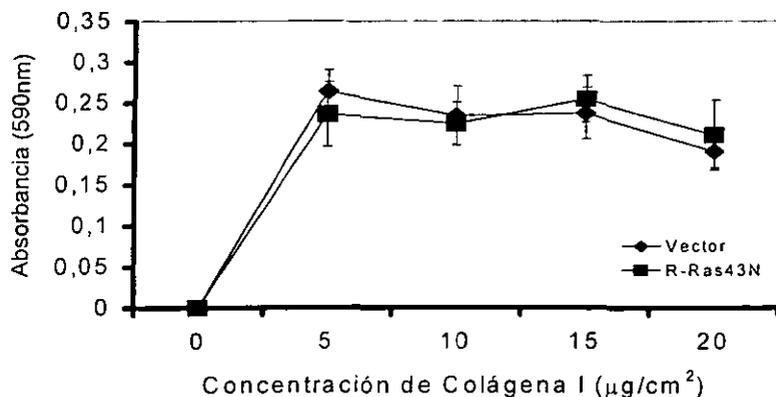
**Fig. 9** R-Ras activado no altera la adhesión a fibronectina.  $5 \times 10^4$  células transfectadas establemente con R-Ras 87L (□) o el vector pDCR (♦) fueron incubadas en placas recubiertas de fibronectina a las concentraciones indicadas. Las células se incubaron durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, las células adheridas se tiñeron con cristal violeta en PBS/metanol y el colorante se disolvió en SDS. La placa se leyó en un lector de ELISA a una longitud de onda de 590 nm. Experimento representativo de 7 determinaciones. Los datos son promedio  $\pm$  error estándar de quintuplicados.



**Fig. 10** R-Ras activado no altera la de adhesión a colágena I.  $5 \times 10^4$  células transfectadas establemente con R-Ras 87L (□) o el vector pDCR (♦) fueron incubadas en placas recubiertas de colágena I a las concentraciones indicadas. Las células se incubaron durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, las células adheridas se tiñeron con cristal violeta en PBS/metanol y el colorante se disolvió en SDS. La placa se leyó en un lector de ELISA a una longitud de onda de 590 nm. Experimento representativo de 7 determinaciones. Los datos son promedio  $\pm$  error estándar de quintuplicados.



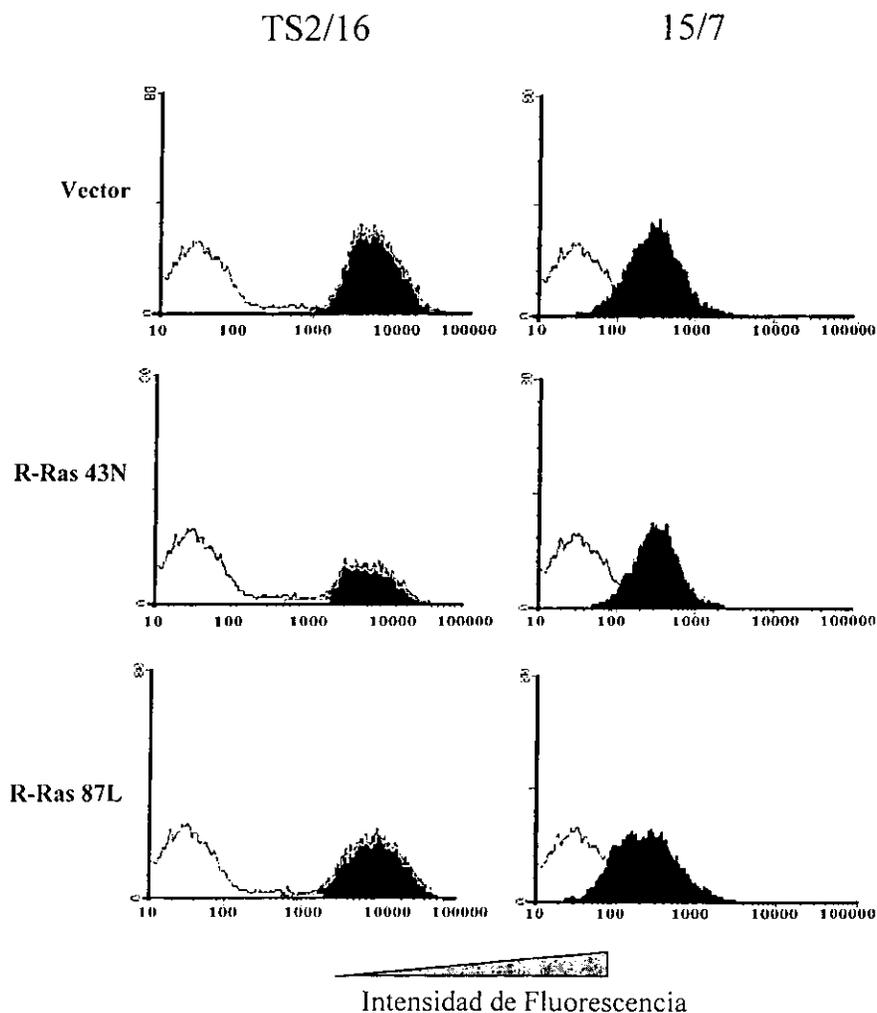
**Fig. 11** La forma dominante negativa de R-Ras no altera la adhesión a Fibronectina.  $5 \times 10^4$  células C33 transfectadas establemente con R-Ras 43N ( $\square$ ), o con el vector vacío ( $\blacklozenge$ ), fueron incubadas en placas recubiertas de fibronectina a las concentraciones descritas. El ensayo de adhesión se realizó durante 1 h a 37 °C. Experimento representativo de 5 pruebas realizadas por separado. Los datos son promedios  $\pm$  error estándar de quintuplicados.



**Fig. 12** La forma dominante negativa de R-Ras no altera la adhesión a colágena I.  $5 \times 10^4$  células C33 transfectadas establemente con R-Ras 43N ( $\square$ ), o con el vector vacío ( $\blacklozenge$ ) fueron incubadas en placas recubiertas de colágena I a las concentraciones descritas. El ensayo de adhesión se realizó durante 1 h a 37 °C. Experimento representativo de 5 pruebas realizadas por separado. Los datos son promedios  $\pm$  error estándar de quintuplicados.

***R-Ras no altera la expresión, ni la activación de las integrinas  $\beta 1$  de células C33.***

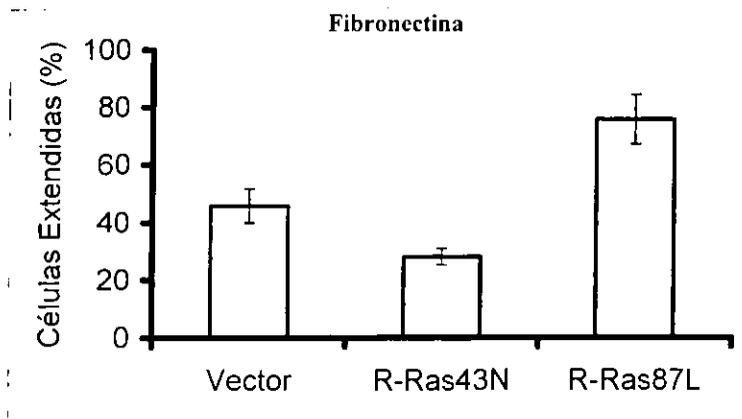
R-Ras es capaz de llevar a las integrinas  $\beta 1$  a un estado de mayor afinidad por su ligando (activación por afinidad), sin alterar la cantidad de integrinas en la membrana celular [84]. Inicialmente, nosotros quisimos determinar los niveles de las integrinas  $\beta 1$  en células de C33 estables. Para determinar los niveles de las integrinas  $\beta 1$ , realizamos ensayos de citometría de flujo utilizando el anticuerpo TS2/16 (anti- $\beta 1$ ). Nuestros datos muestran que los niveles de expresión de las integrinas  $\beta 1$  se mantiene en las células que sobreexpresan a R-Ras 87L o R-Ras 43N (Fig. 13). Las integrinas en su estado de mayor afinidad exponen epítopes nuevos, dependientes de activación [73]. El anticuerpo 15/7 detecta un epítope que sólo se expone sobre integrinas  $\beta 1$  activadas. Para determinar el nivel de activación de integrinas  $\beta 1$ , nosotros utilizamos el anticuerpo 15/7 en ensayos de citometría de flujo. La sobreexpresión de R-Ras 87L o R-Ras43N no modificó el nivel de activación basal de las integrinas  $\beta 1$  en células C33 (Fig. 13). Dichos resultados muestran que R-Ras, en células de cáncer cérvico-uterino, no es capaz de aumentar la afinidad o expresión de integrinas  $\beta 1$ .



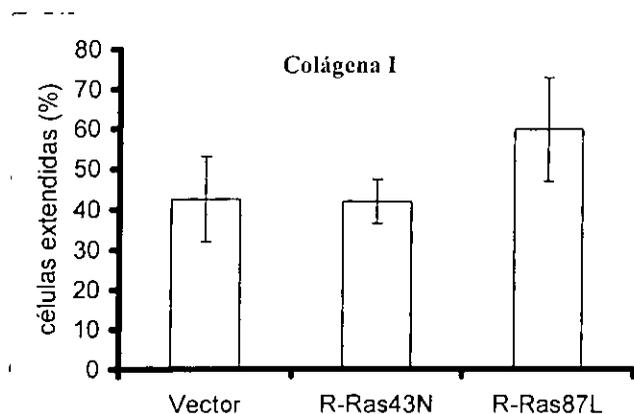
**Fig. 13** R-Ras no altera la expresión y ni la activación de integrinas  $\beta 1$ . Para determinar los niveles de expresión y activación hicimos uso de la citometría de flujo (FACS). Células transfectadas establemente, con R-Ras 87L, R-Ras 43N, o el vector pPCR vacío, fueron incubadas con 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de los anticuerpos anti- $\beta 1$ [TS2/16] o anti- $\beta 1$  activada [15/7] (zonas oscuras). Las células estables con los anticuerpos ya mencionados fueron comparadas con células incubadas solamente con el anticuerpo secundario (zonas claras).

## ***R-Ras modula el proceso de extensión celular sobre fibronectina y colágena I***

Hasta el momento nuestros datos demostraban que R-Ras no alteraba la afinidad de las integrinas  $\beta 1$  por su ligando de células C33. Sin embargo, nosotros observamos por microscopía que las células transfectadas con la forma activada se encontraban más extendidas al estar adheridas. R-Ras no altera la afinidad de las integrinas  $\beta 1$ , pero morfológicamente parecía estar afectando una función dependiente de integrinas, la extensión celular. Por lo tanto, nos interesamos en saber si R-Ras era capaz de alterar la morfología celular sobre proteínas de matriz extracelular. La habilidad de cambiar la morfología celular en respuesta a proteínas de matriz extracelular se ha estudiado a través de conocer el grado de extensión ("spreading") de una células sobre una proteína determinada [98]. Para determinar el grado de extensión, células estables con R-Ras 87L, R-Ras 43N o el vector vacío fueron incubadas sobre placas recubiertas con fibronectina o con colágena I. Pasado el tiempo de incubación, nosotros registramos el porcentaje de células que se habían extendido. Un 50 % de la población celular se extendió sobre fibronectina o sobre colágena tipo-I (Vector vacío; Fig. 14 y 15). Las células C33 R-Ras 43N disminuyeron su capacidad de extensión sobre fibronectina (Fig. 14). Sobre colágena I, las células C33 R-Ras 43N no tuvieron un efecto importante (Fig. 15). Interesantemente, las células C33 R-Ras 87L incrementaron su capacidad de extensión tanto sobre fibronectina como sobre colágena I (Fig. 14 y 15). Estos resultados sugerían que R-Ras participa en el proceso de extensión de células C33 sobre fibronectina o colágena tipo-I.



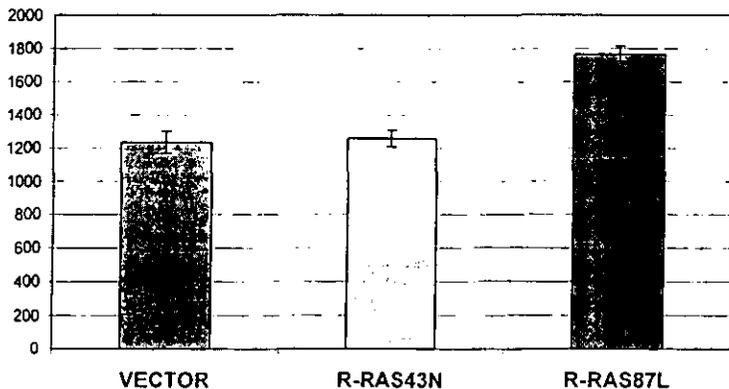
**Fig. 14** R-Ras modula la extensión de células C33 sobre fibronectina. Células transfectadas establemente con R-Ras 87L, con R-Ras 43N, o con el vector vacío, fueron incubadas en placas recubiertas con fibronectina ( $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), durante 2 h. El registro se realizó a doble ciego, contando en un microscopio invertido 3 campos al azar (aumento 40X). Se contaron aproximadamente 120 células por campo y se registró el porcentaje de células que se habían expandido. La gráfica muestra el porcentaje de célula extendidas. Los datos son promedio  $\pm$  desviación estándar.



**Fig. 15** R-Ras modula la extensión de células C33 sobre colágena I. Células transfectadas establemente con R-Ras 87L, con R-Ras 43N, o con el vector vacío, fueron incubadas en placas recubiertas con colágena I ( $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), durante 2 h. El registro se realizó a doble ciego, contando en un microscopio invertido 3 campos al azar (aumento 40X). Se contaron aproximadamente 120 células por campo y se registró el porcentaje de células que se habían expandido. La gráfica muestra el porcentaje de célula extendidas. Los datos son promedio  $\pm$  desviación estándar.

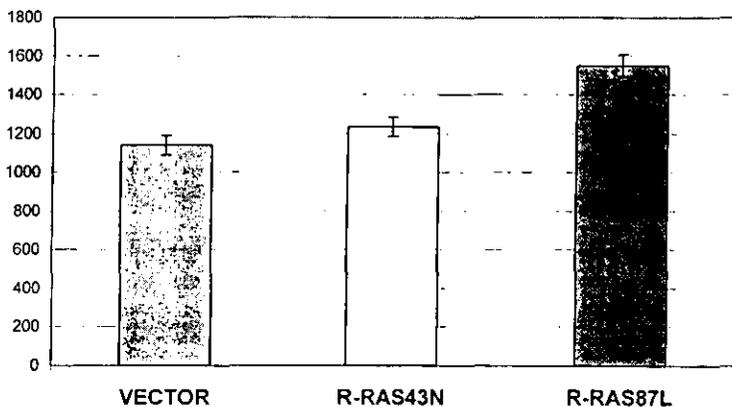
En varios tipos celulares un incremento en la capacidad de extenderse correlaciona con un incremento en el área celular [1]. Nosotros cuantificamos el área relativa de las células sobre fibronectina y colágena I. En fibronectina o en colágena I, el área promedio de las células C33 transfectadas con el vector vacío fue de aproximadamente 1200 píxeles cuadrados. Sobre fibronectina, dicha área se incrementó a 1800 píxeles cuadrados en las células transfectadas con la forma activa de R-Ras (87L) (Fig. 16). Sobre colágena I, las células C33 R-Ras 87L incrementaron su área a 1600 píxeles cuadrados. La presencia de R-Ras activado provocó una mayor área celular sobre fibronectina que sobre colágena I (Fig. 17). Por otro lado, la presencia de la forma dominante negativa no tuvo ningún efecto sobre el área celular promedio ni sobre fibronectina, ni sobre colágena I (Fig. 16). R-Ras 43N no alteró el área relativa basal de las células al extenderse sobre colágena I o sobre fibronectina. Interesantemente, nuestros datos sugerían un nuevo efecto de R-Ras sobre las funciones celulares de integrinas  $\beta 1$ : modular la extensión de células C33 dependiente de integrinas  $\beta 1$ , sin alterar el estado funcional de dichos receptores.

Area relativa (pixeles<sup>2</sup>)      Fibronectina



**Fig. 16.-** R-Ras incrementa el área celular de células C33 sobre fibronectina. El área de las células de los ensayos de extensión fue cuantificada por microscopia (aumento 40X) utilizando el programa Scion Image. Se contaron aproximadamente 150 células por cada condición. Datos del área relativa promedio (en pixeles cuadrados)  $\pm$  error estándar.

Area relativa (pixeles<sup>2</sup>)      Colágena I

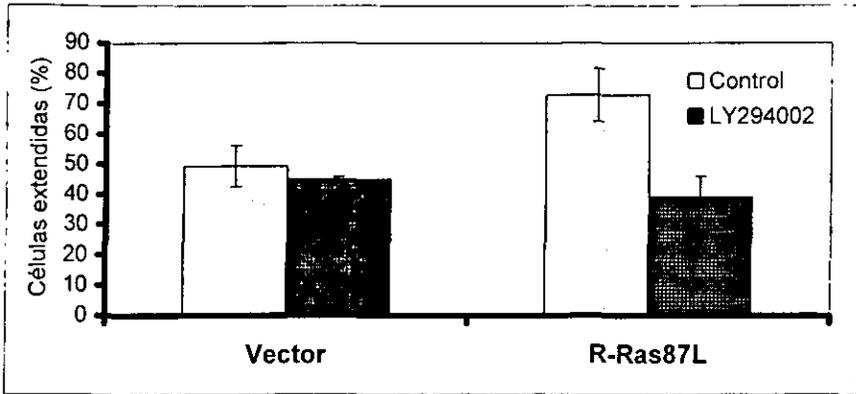


**Fig. 17.-** R-Ras incrementa el área celular de células C33 sobre colágena I. El área de las células de los ensayos de extensión fue cuantificada por microscopia (aumento 40X) utilizando el programa Scion Image. Se contaron aproximadamente 150 células por cada condición. Datos del área relativa promedio en pixeles cuadrados  $\pm$  error estándar.

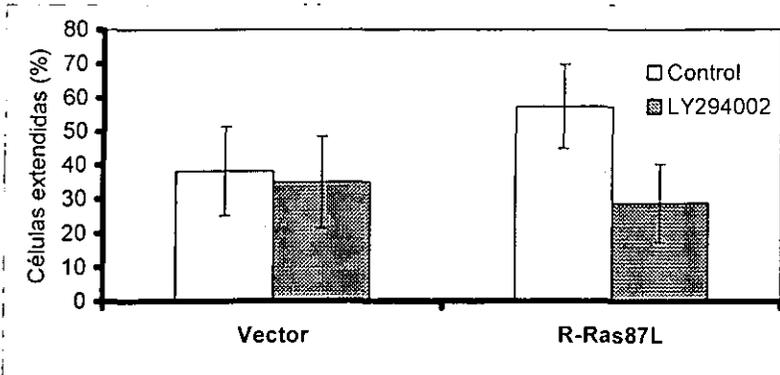
***PI-3K participa en la extensión celular mediada por R-Ras en células de C33.***

Fosfatidil-inositol 3 cinasa (PI-3K) es un molécula transductora de señales que participa en varios efectos mediados por R-Ras [85, 94]. Nosotros nos interesamos en conocer si PI-3K participa en la modulación de la extensión celular mediada por R-Ras en células C33. Se realizaron ensayos de extensión con células C33 R-Ras 87L en presencia o ausencia del inhibidor específico para PI-3K, LY294002. La extensión basal sobre fibronectina ó sobre colágena tipo-I no se vio alterada por la presencia del inhibidor de PI-3K (Fig. 18 y 19). Sin embargo, el incremento provocado por R-Ras 87L (oncogénico) en la extensión celular, en presencia de LY294002, se reduce a niveles comparables a los de las células control. La reducción de la extensión celular se observó tanto sobre fibronectina como sobre colágena tipo-I (Fig. 18 y 19). Estos experimentos sugerían el incremento sobre la extensión celular provocado por la forma oncogénica de R-Ras (87L) es dependiente de PI-3K.

El área relativa de las células transfectadas con el vector vacío no se ve alterada por la presencia del inhibidor específico de PI-3K (Fig. 20). El incremento en el área celular provocado por la forma activa de R-Ras en las células C33 fue abolido ante el inhibidor de PI-3K a niveles comparados con los de las células control, tanto en fibronectina (Fig. 20) como en colágena I (Fig. 21). Los datos anteriores sugerían que R-Ras es capaz de alterar la extensión de células C33 a través de fosfatidil-inositol 3 cinasa (PI-3K).



**Fig. 18** PI-3K modula la extensión celular provocada por R-Ras sobre fibronectina. Células transfectadas establemente con R-Ras 87L o con el vector vacío fueron incubadas con y sin LY294002, durante 30 min a 37°C. Las células se incubaron en placas recubiertas con fibronectina durante 2 h. El registro se realizó a doble ciego, contando aproximadamente 120 células por campo y se registró la proporción de células extendidas. La gráfica muestra el porcentaje de célula extendidas. Los datos son promedio  $\pm$  desviación estándar.



**Fig. 19** PI-3K modula la extensión celular provocada por R-Ras sobre colágena I. Células transfectadas establemente con R-Ras 87L o con el vector vacío fueron incubadas con y sin LY294002, durante 30 min a 37°C. Las células se incubaron en placas recubiertas con colágena I durante 2 h. El registro se realizó a doble ciego, contando aproximadamente 120 células por campo y se registró la proporción de células extendidas. La gráfica muestra el porcentaje de célula extendidas. Los datos son promedio  $\pm$  desviación estándar.

## Fibronectina

Area relativa (pixeles<sup>2</sup>)

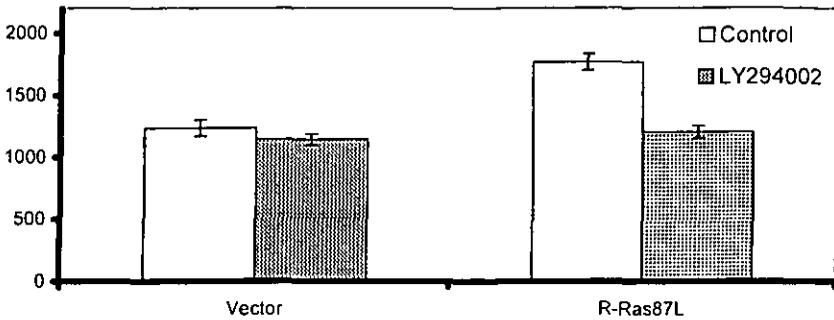


Fig. 20.- PI-3K modula el incremento en el área celular de células C33 sobre fibronectina provocado por R-Ras. El área relativa de células extendidas sobre fibronectina, en presencia o ausencia de LY294002, fue capturada y cuantificada por microscopia (aumento 40X) utilizando el programa Scion Image. Se contaron aproximadamente 150 células por condición. Se muestra el área relativa promedio en pixeles  $\pm$  error estándar.

## Colágena I

Area relativa (pixeles<sup>2</sup>)

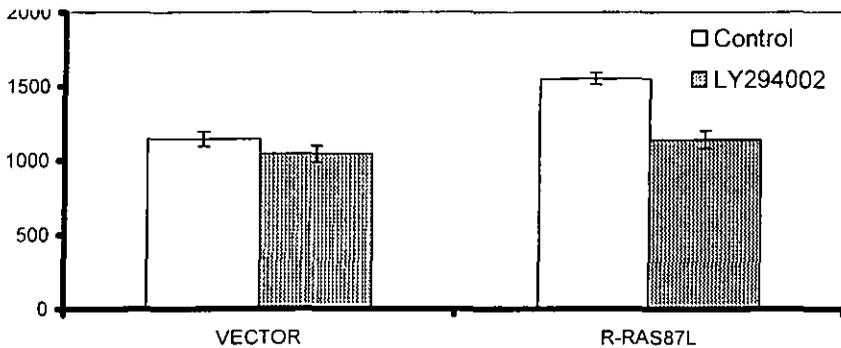


Fig. 21.- PI-3K modula el incremento en el área celular de células C33 sobre colágena I provocado por R-Ras. El área relativa de células extendidas sobre colágena I, en presencia o ausencia de Ly294002, fue capturada y cuantificada por microscopia (aumento 40X) utilizando el programa Scion Image. Se contaron aproximadamente 150 células por condición. Se muestra el área relativa promedio en pixeles  $\pm$  error estándar.

Para corroborar que PI-3K se encuentra en la vía desencadenada por R-Ras, nosotros estudiamos el estado funcional de dicha cinasa en células transfectadas con las formas mutantes de R-Ras. En células transfectadas con el vector vacío o con el dominante negativo de R-Ras (43N) la capacidad de PI-3K de fosforilar al anillo de inositol es muy reducida. Sin embargo, la presencia de R-Ras 87L en las células C33 incrementa la actividad de la cinasa (Fig. 22). El estado funcional de R-Ras modula la actividad cinasa de PI-3K. Estos resultados sugirieron que PI-3K es una molécula efectora de R-Ras.

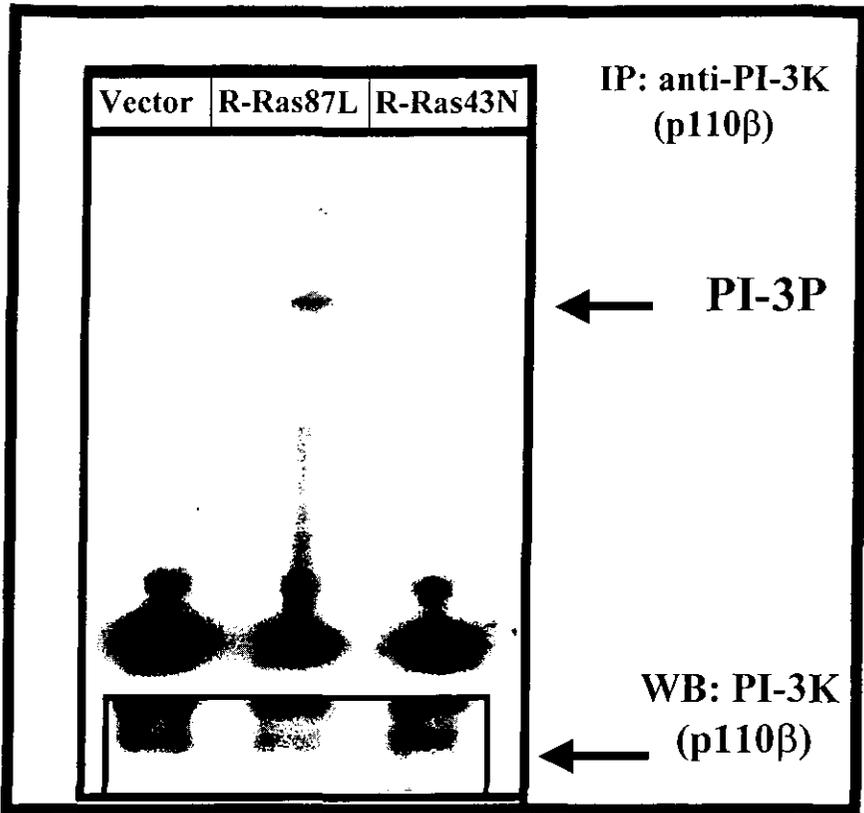
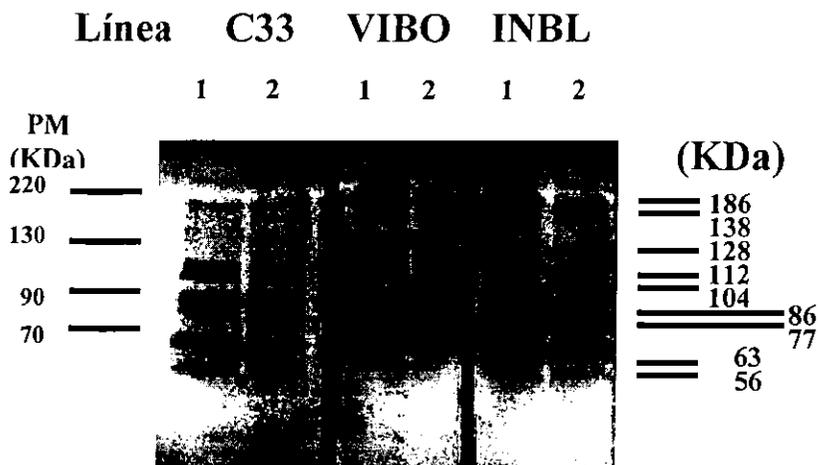


Fig. 22 Actividad de PI-3K en células C33. PI-3K fue inmunoprecipitada de lisados de células C33 transfectadas con R-Ras87L, R-Ras 43N o con el vector vacío. El inmunoprecipitado se incubó con fosfatidil-inositol en presencia de ATP (marcado con fósforo 32). El fosfatidil-inositol se separó por cromatografía de capa fina de sílica. La placa de cromatografía se expuso a una placa de rayos X. La parte inferior muestra un Western Blot de la subunidad p110 $\beta$  de PI-3K como control de cantidad de proteína inmunoprecipitada.

### ***Las células de cáncer cérvico-uterino secretan metaloproteasas.***

Las funciones celulares dependientes de integrinas  $\beta 1$  son diversas, entre ellas está la de modular la expresión de genes específicos [6]. Las proteasas son enzimas cuya expresión en determinadas estirpes celulares es regulada por integrinas [99, 100]. Para determinar el efecto de R-Ras sobre funciones celulares de integrinas posteriores a la adhesión, nosotros analizamos la actividad proteolítica del medio condicionado por células de cáncer cérvico-uterino. Inicialmente, nosotros nos interesamos en saber si células de dicho epitelio secretan proteasas. Para determinar si existe actividad proteolítica en medio condicionado por células de cérvico-uterino, nosotros realizamos zimogramas. Los zimogramas son ensayos en los que se separan proteínas en un gel SDS/PAGE, el cual posee un sustrato promiscuo para proteasas (gelatina). Muestras de medio condicionado de células VIBO, INBL y C33 fueron corridas en SDS/PAGE/gelatina. Los geles se incubaron en un amortiguador de activación por tiempos determinados. La actividad proteolítica se registró como zonas claras en fondo azul en los geles desteñidos de una tinción de azul de coomassie. Las líneas celulares de epitelio cérvico-uterino secretan aproximadamente nueve proteasas, pero curiosamente, su presencia es independiente de la línea celular de la cual se tomó la muestra (Fig. 23) y de la presencia de suero o no en el medio de cultivo (dato no mostrado). Las proteasas encontradas registran un peso molecular aproximado de 180, 138, 112, 104, 86, 77, 63 y 53 KDa. Dichos pesos fueron calculados por regresión lineal de la distancia recorrida por los pesos moleculares de las proteína de referencia.

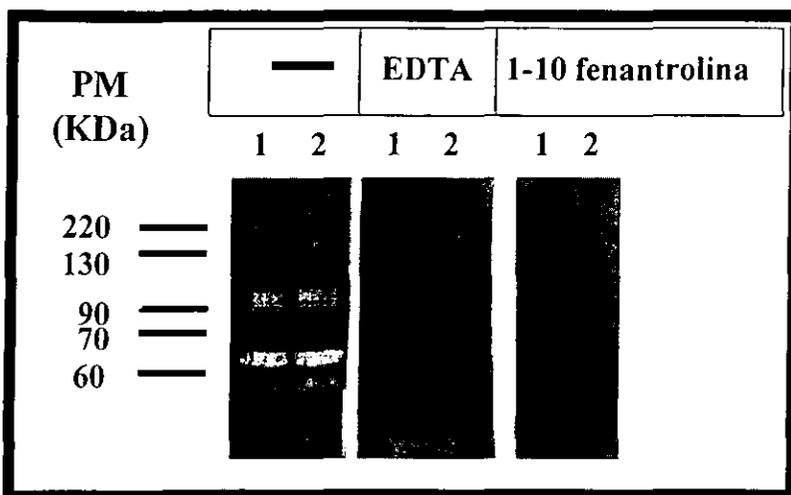


**Fig. 23** Actividad proteolítica de sobrenadantes de células de cáncer cérvico-uterino.  $1 \times 10^5$  células fueron crecidas a confluencia (48 h) en placas de 12 pozos. Los sobrenadantes de dicho cultivo fueron colectados y corridos en un SDS/PAGE/Gelatina (Zimograma). Los geles se incubaron por 48 h en amortiguador de activación. La actividad proteolítica se registró como zonas blancas en fondo azul. La actividad del sobrenadante de cada línea celular fue ensayada por duplicado. Se muestra la imagen al negativo. Al lado derecho de la imagen se marcan los pesos moleculares de las proteasas encontradas.

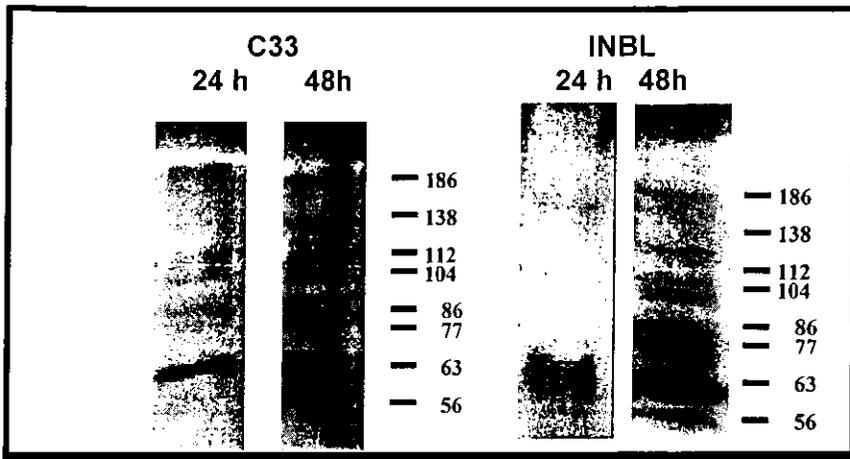
Para determinar el tipo de proteasas secretadas por células de célula de epitelio cérvico-uterino, nosotros incubamos los zimogramas en presencia de inhibidores de metaloproteasas. El EDTA es un quelante de cationes divalentes, el secuestro de dichos iones inhibe la actividad de proteasas dependientes de cationes. Otro inhibidor específico de metaloproteasas es la 1-10 fenantrolina. Dicho inhibidor afecta a proteasas de la familia de las metzicinas [101]. Sorprendentemente, la actividad proteolítica desapareció con ambos inhibidores (Fig. 24). Lo anterior sugiere que todas las proteasas son dependientes de metales (metaloproteasas) y miembros de la familia de las metzicinas.

Como la velocidad de división de las diferentes líneas celulares utilizadas no es la misma, nosotros fuimos incapaces de comparar la cinética de expresión

entre las líneas celulares. Sin embargo, nuestros experimentos mostraron que el tiempo de incubación de los zimogramas era determinante para detectar la actividad proteolítica. A las 24 h de incubación, la actividad proteolítica se observó en las proteasas de 180 y 63 KDa. A las 48 h, las proteasas de 180 y 63 mantienen su actividad, y por otro lado la actividad proteolítica de las proteínas de 138, 112, 104, 86, 77 y 53 KDa se presenta. Lo anterior se observa entre las diferentes líneas celulares utilizadas (Fig. 25). Esto nos indica que las proteasas que se encuentran en mayor proporción son las de 180 y 63 KDa. La cantidad de las proteasas restantes debe ser menor, ya que para registrar su actividad se requiere de tiempo de incubación más largos.



**Fig. 24** Inhibición de actividad proteolítica por inhibidores de metaloproteasas. Medio sobrenadante de células C33 fue corrido en un SD/PAGE/gelatina. Los geles fueron incubados por 48 h en la solución amortiguadora de activación en ausencia (—) y presencia de inhibidores de metaloproteasas (EDTA y 1-10 fenantrolina). La actividad proteolítica de cada línea celular fue probada por duplicado (1 y 2). Ensayo representativo de al menos dos repeticiones. Se muestra Imagen real.



**Fig. 25** Cinética temporal de proteólisis de células de cáncer cérvico-uterino.  $5 \times 10^5$  células fueron cultivadas en placas de 12 pozos e incubadas por 48 h. Muestras de los sobrenadante son corridas en un SDS/PAGE/Gelatina. Posteriormente, los geles se incuban por 24 o 48 h en amortiguador de activación. Se muestra la imagen al negativo de la actividad proteolítica registrada.

La expresión de proteasas puede ser dependiente de la interacción de integrina con proteínas de matriz extracelular. Para determinar si la adhesión a matriz extracelular promueve la expresión de proteasas, nosotros realizamos zimogramas de medios condicionados por células C33 crecidas sobre fibronectina o sobre colágena I. La preincubación de las células C33 sobre fibronectina o colágena I no afectó la expresión de las metaloproteasas (Fig. 26).

Se encontró que existe la misma actividad proteolítica en el medio condicionado de todas las líneas celulares de epitelio cérvico-uterino. La proteólisis observada se debe a la presencia de metaloproteasas secretadas por las células al medio condicionado. La presencia de estas metaloproteasas entonces no depende de la interacción integrina-fibronectina ó integrina-colágena tipo-I. En consecuencia a la falta de efecto de la interacción integrina-matriz extracelular, nosotros pensamos que R-Ras no altera la expresión de las proteasas detectadas en este estudio.

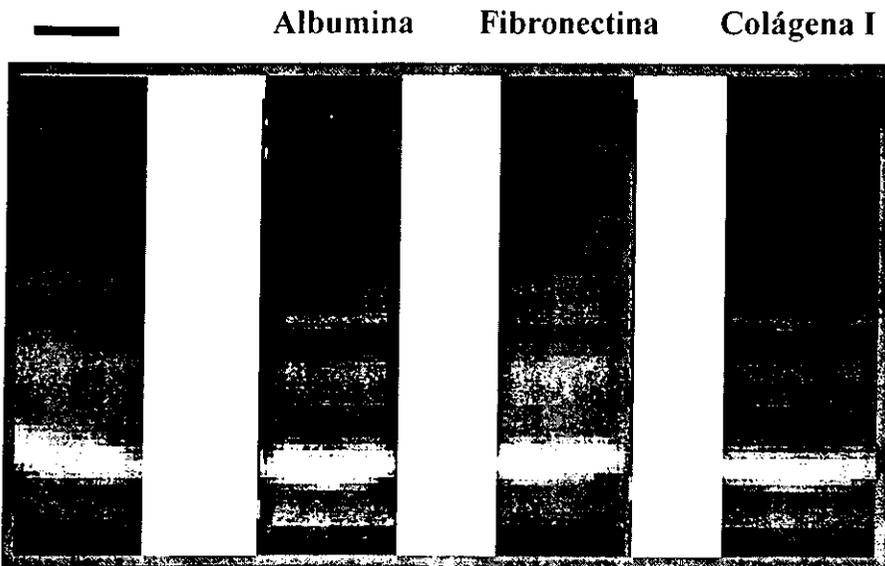


Fig. 26 La secreción de metaloproteasas de células de cáncer cérvico-uterino no depende de fibronectina o colágena tipo-I.  $5 \times 10^5$  células fueron cultivadas en placas recubiertas de fibronectina, colágena tipo-I, albúmina o sobre la placa sin proteína (■) durante 48 h. Muestras de sobrenadante son corridas en SDS/PAGE/Gelatina. Posteriormente, los gels se incubaron por 48 h en amortiguador de activación. Se muestra la imagen real de la actividad proteolítica detectada.

## **7. Discusión**

Las funciones celulares de integrinas en procesos fisiológicos y patológicos es un campo muy estudiado. La regulación de la adhesión mediada por integrinas ha demostrado ser complicada y dependiente de diversos factores. Entre estos factores encontramos a la expresión diferencial de diversas integrinas, diferentes mecanismos moduladores y diversos agentes que estimulan o inhiben la adhesión [43, 102]. En esta tesis nosotros identificamos a la GTPasa R-Ras como un componente modulador de las interacciones adhesivas de células de epitelio cérvico-uterino a proteínas de matriz extracelular.

### **Líneas celulares de epitelio cérvico-uterino y su adhesión a Fibronectina y Colágena-I**

Nosotros decidimos realizar el estudio en líneas celulares de epitelio cérvico uterino, en primer lugar por ser dicho cáncer la principal causa de mortalidad entre mujeres mexicanas. En segundo lugar por el desconocimiento de los mecanismos de adhesión que poseen estas células. En nuestro estudio utilizamos principalmente a la línea C33, así como a las líneas VIBO e INBL, dichas líneas son de epitelio cérvico-uterino en diferentes fases de malignidad [95]. La línea C33 es una línea comercial (ATCC) que no presenta papilomavirus (HPV) 16 o 18, agentes causantes de cáncer. Las líneas celulares mexicanas VIBO e INBL son positivas para la presencia de HPV 16 y 18, respectivamente [95]. Inicialmente, el análisis por citometría de flujo reveló que las tres líneas celulares poseen patrones parecidos en la expresión de integrinas (datos sin publicar Dr. Rosales). La subunidad  $\beta 1$  se encuentra en todas las líneas, así como las subunidades

$\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  y  $\alpha v$ . La subunidad  $\beta 2$  como es de esperarse no es expresada en este tipo de tejidos, ya que dicha integrina se sintetiza exclusivamente en leucocitos [41, 42]. Interesantemente, la subunidad  $\beta 3$  y  $\beta 4$  son expresadas de forma diferencial entre las diferentes líneas celulares de cérvix. Las células VIBO expresan a la subunidad  $\beta 3$  y las INBL a la subunidad  $\beta 4$ , a diferencia de las C33, las cuales no expresan a ninguna de esas dos subunidades. Lo anterior nos permite preguntarnos si dichas moléculas fueron adquiridas durante el proceso maligno o si algunas subunidades se pierden al azar durante el proceso de transformación. Por ensayos de inmunohistoquímica en lesiones malignas en epitelio de cervix, varios grupos han determinado que la expresión de integrinas cambia respecto al tejido normal. Sin embargo, esos estudios se han realizado en un reducido número de subunidades de integrinas [108]. Estos estudios pueden llevar al desarrollo de marcadores que permitan identificar y diferenciar tejidos en procesos de transformación de epitelios normales.

La presencia de diferentes subunidades nos puede dar idea de los tipos de integrinas que se forman. Sin embargo, para demostrar que la presencia de integrinas correlaciona con su capacidad de reconocer componentes de la matriz extracelular, se realizaron ensayos de adhesión. En estos ensayos las células reconocieron y se adhirieron específicamente a fibronectina y a colágena tipo I. La adhesión de células de epitelio cérvico-uterino a proteínas de matriz extracelular es dependiente de integrinas  $\beta 1$ . Las integrinas capaces de reconocer fibronectina son  $\alpha 4\beta 1$  y  $\alpha 5\beta 1$  [44], sin embargo, la ausencia de la subunidad  $\alpha 4$  en las líneas celulares nos permite pensar que  $\alpha 5\beta 1$  es la responsable de reconocer fibronectina.  $\alpha 2\beta 1$  ha sido reportada como el principal receptor para colágena I, sin

embargo, otras integrinas también pueden reconocerla (Tabla 1) [44, 67]. La falta de datos sobre la expresión *in vivo* de ciertas integrinas en un tejido normal de cérvix nos impide saber si la habilidad de reconocer a proteínas de matriz extracelular fue obtenida durante la transformación maligna o si se poseía *in situ*. Por otro lado, los papeles que las integrinas juegan en la transformación y migración de células de epitelio cérvico-uterino no han sido caracterizados completamente. Diferentes datos sugieren que la migración de dicho cáncer a otros tejidos se realiza atravesando la membrana basal que delimita al epitelio cérvical [108]. La constitución de la membrana basal (formada por colágenas y fibronectina) forma la frontera por la cual células transformadas deben de traspasar para localizarse en otro tejidos. La presencia de integrinas en células de cáncer cérvico-uterino, que reconozcan elementos de la membrana basal, debe ser determinante para la metástasis de dicho cáncer. Probablemente, las integrinas son usadas como anclas para caminar, mas no para fijarse a un determinado lugar.

R-Ras es una GTPasa que ha sido involucrada en la activación de integrinas  $\beta 1$  [84, 103]. Nosotros nos interesamos en conocer si dicha GTPasa era capaz de activar integrinas  $\beta 1$  en células de cáncer cérvico-uterino. Así, decidimos expresar establemente la forma constitutivamente activa o la forma dominante negativa de R-Ras. La expresión estable de una proteína nos asegura que toda la población a estudiar posea el fenotipo que dicha proteína le proporcione.

Varios métodos de transfección fueron probados en las diferentes líneas celulares usadas. La transfección con co-precipitación de fosfato de calcio fue eficiente para la línea C33, pero no para las líneas VIBO e INBL. Para estas dos

últimas líneas celulares la transfección con lipofectina resultó más efectiva para la formación de células estables. Las diferencias en la eficiencia de transfección entre las líneas celulares puede deberse a que provienen de procesos malignos diferentes con cambios diferentes. Por lo tanto diferentes técnicas de transfección tendrán eficiencias variables de acuerdo a los cambios que una línea celular haya sufrido durante la transformación. Una menor eficiencia de transfección explicaría la necesidad de una mayor cantidad de células transfectadas. Lo anterior incrementaría la probabilidad de eventos de integración de nuestras secuencias de interés, y en consecuencia, una mayor probabilidad de formación de células estables.

Nosotros observamos que las formas mutadas de R-Ras son sobreexpresadas establemente en las células C33. La presencia de formas mutadas de R-Ras en varios tipos celulares ha demostrado no tener un efecto letal sobre las células [67, 84, 85], en nuestras líneas celulares dicha característica se conserva. Decidimos realizar los estudios en la línea C33 por ser una línea que no poseía secuencias de papilomavirus. Sin embargo cabe remarcar que en la células VIBO e INBL se observan los mismos resultados (datos no mostrados).

### **R-Ras no activa integrinas $\beta 1$ en células de epitelio cérvico-uterino**

Varios grupos han demostrado que la presencia forzada de formas mutadas de R-Ras es capaz de alterar la adhesión mediada por integrina, en varios tejidos celulares [67, 84, 85]. La transfección, tanto estable como transitoria, de formas constitutivamente activas de R-Ras (R-Ras 38V y 87L) son capaces de incrementar en más de un 20% la adhesión a fibronectina o colágena [67, 84]. En

ese estudio se muestra que R-Ras 43N disminuye la adhesión a fibronectina o colágena tipo-I. El efecto de R-Ras 43N demostró ser dominante sobre el R-Ras endógeno en ensayos clásicos de adhesión. El papel de R-Ras en la adhesión inicial mediada por integrinas es innegable en los tipos celulares COS, monocitos, epitelio de mama, entre otros [67, 84, 92]. Contradictoriamente a estos reportes, nosotros observamos que la presencia de la forma constitutivamente activa de R-Ras o de la forma dominante negativa es incapaz de alterar la adhesión de células de cérvico-uterino a fibronectina o colágena I. Los datos anteriores sugieren fuertemente que R-Ras no afecta la adhesión a través de integrinas de estas líneas celulares. Lo anterior diverge de lo esperado, ya que se sugería en la literatura que R-Ras es una molécula usada en una variedad de tejidos para activar integrinas. Probablemente, esta GTPasa puede ser usada de una manera tejido específica. En células de epitelio cérvico-uterino otras GTPasas podrían estar modulando la activación de integrinas, entre ellas H-Ras o Rho.

R-Ras altera la afinidad de integrinas  $\beta 1$  y  $\beta 3$  por sus ligandos en varias estirpes celulares [84, 103]. Un incremento en la afinidad de las integrinas se refleja en un incremento en la adhesión [84]. La falta de efecto de las mutantes de R-Ras sobre la adhesión de nuestras células, nos llevó a determinar el estado funcional de la integrinas  $\beta 1$ . El uso de anticuerpos contra integrinas activadas facilita el análisis del estado funcional de las integrinas. El anticuerpo monoclonal 15/7 reconoce un epítotope que se expone en condiciones de mayor afinidad de integrinas  $\beta 1$  por su ligando [96]. Nosotros observamos que existe un nivel de activación basal de integrinas  $\beta 1$ . Así mismo, los niveles de integrinas  $\beta 1$  no se ven alterados por la sobreexpresión de formas mutadas de R-Ras. Contrario a lo

ya reportado para otras célula [67, 84], nosotros encontramos que en epitelio cérvico-uterino R-Ras es incapaz de modular los niveles de activación de integrinas  $\beta 1$ . Lo anterior explica la homogeneidad en la adhesión a fibronectina y a colágena tipo I de células transfectadas establemente con las formas mutadas de R-Ras. Cabe mencionar, que aunque nosotros no observamos efectos sobre integrinas  $\beta 1$ , existe la posibilidad que las integrinas  $\beta 3$  puedan ser activadas por R-Ras en célula VIBO. Las integrinas  $\beta 3$  tiene la capacidad de ser moduladas por R-Ras en células COS-7, por lo que nosotros no podemos excluir un efecto de esta GTPasa sobre dicha integrina [84].

#### ***R-Ras modula la extensión celular***

Aunque R-Ras no modula afinidad (activación) de integrinas  $\beta 1$  por proteínas de matriz extracelular en células de epitelio cérvico-uterino. La morfología de las células transfectadas con la forma activa de R-Ras en ensayos de adhesión se presentaba alterada. Las células aparecían más extendidas. Lo anterior nos intrigó, por lo que decidimos saber si R-Ras era capaz de alterar un proceso diferente a la activación, pero dependiente de integrinas. Los ensayos de extensión celular ("Spreading") son pruebas en las cuales se registra la capacidad de una población celular de extenderse sobre un sustrato en un determinado tiempo [98]. Interesantemente, las células trasfectadas con la forma activada de R-Ras poseen una mayor capacidad de extenderse sobre fibronectina y sobre colágena tipo I. Por otro lado, la presencia de la forma dominante negativa de R-Ras disminuyó la capacidad de las células de extenderse sobre fibronectina, aunque no sobre colágena I. Los dato anteriores correlacionan con el área

exhibida por la células involucradas en los ensayos de extensión. De esta manera, nuestros datos aportan evidencia de que R-Ras es capaz de modular la extensión celular. Patricia Keely, et al, en 1999 demostraron que R-Ras era capaz de estimular la migración de células de epitelio de mama por medio de integrinas específicas ( $\alpha2\beta1$ ). En este estudio se sugería que el efecto de R-Ras era sobre la afinidad de las integrinas, lo cual provocaba una mayor migración celular [67]. Lo anterior no excluye que R-Ras posea el efecto directo sobre la extensión celular en epitelio de cérvico-uterino.

Recientemente, se reportó que la inhibición de la extensión celular, provocada por la sobreexpresión de dominio citoplásmicos  $\beta1$ , era revertida por la presencia de las formas activadas de PI-3K, PKC, RAC y R-Ras. Este grupo propone que R-Ras es capaz de intervenir en la modulación de la extensión celular mediada por integrinas. Sin embargo, no se excluye que el efecto observado sea independiente de la activación de integrinas [17]. Estos estudios se realizaron sobre colágena tipo I y sobre fibrinógeno [17]. De manera similar, nosotros mostramos que R-Ras afecta la extensión sobre colágena I y sobre fibronectina. Nuestros resultados muestran que el efecto de R-Ras sobre la extensión celular es independiente de la proteína sobre la cual las células de cérvix se extienden. En resumen, R-Ras probablemente regule la adhesión celular de forma tejido específico.

Los mecanismos por los cuales la extensión celular se modula, no son bien conocidos, pero es claro que el citoesqueleto y la formación de contactos focales son determinantes en dicho proceso [19, 20]. Diversos estudios apuntan a que señales mediadas por las GTPasa Rho/Ras son necesarias para la extensión celular [88]. El dominio citoplásmico de las integrinas  $\beta1$  es importante para la

formación de contactos focales[63]. Recientemente se demostró que la extensión celular puede ser inhibida por la sobreexpresión de dominios citoplásmicos  $\beta 1$ , pero puede ser recuperada por la sobreexpresión de la forma activa de R-Ras [17]. Probablemente, el efecto de R-Ras en células de cáncer cérvico-uterino se basa en la modulación de los dominios  $\beta 1$  citoplásmicos, ó de las proteínas que interaccionan con dicho dominio. Muchas de las proteínas involucradas en los contactos focales, pueden ser blancos de señales que incrementen la avidéz de las integrinas, como por ejemplo Talina, L-plastina, Vinculina y los propios filamentos de actina [19]. La presencia de R-Ras puede afectar algún componente de lo contactos focales y de esta manera modular la extensión celular.

### **PI-3K modula el efecto de R-Ras sobre la extensión celular**

Los efectos de R-Ras, así como de otras GTPasas, parecen converger sobre fosfatidilinositol 3 cinasa (PI-3K) [85, 104]. Nosotros demostramos que el efecto de R-Ras es abolido por el inhibidor específico de PI-3K, LY294002, y que la actividad de dicha cinasa se encuentra estimulada en presencia del oncogene R-Ras activado (87L). Lo anterior nos permite proponer que PI-3K participa en la extensión celular de células de epitelio cérvico-uterino. Diversos grupos han demostrado que PI-3K participa en las vía de señalización y adhesión de integrinas [25], en algunos tipos celulares dicha cinasa es necesaria para la extensión celular [105, 106]. En 1997 se demostró que las GTPasas Rac y Cdc42 son capaces de estimular la migración de células de epitelio de mama, y que dicha migración es dependiente de PI-3K [85]. La migración de células de epitelio de mama mediada por R-Ras demostró ser dependiente de PI-3K. Existen reportes

que muestran que R-Ras es capaz de interactuar directamente con PI-3K y activarla [94]. Nosotros intentamos co-inmunoprecipitar a ambas moléculas pero no detectamos una interacción directa entre estas dos moléculas. Lo cual podría ser explicado porque la interacción R-Ras/PI-3K es débil o bien temporalmente muy corta. El epitelio cérvico-uterino en su constante remodelación desencadena de manera dinámica y ordenada la extensión y migración celular a través de R-Ras/PI3K. Probablemente, en cáncer la señalización de la vía R-Ras/PI-3K sea sobreactivada y permita una mayor extensión y migración. En el laboratorio nos proponemos realizar ensayos de migración para determinar el efecto de R-Ras y PI-3K sobre dicho proceso.

La participación de PI-3K en las vías de señalización de las GTPasas Rho, Cdc42, Rac y H-Ras ha demostrado que las funciones de las cinasas de lípidos son relevantes para procesos desencadenados por GTPasas [105, 107]. Las GTPasas Rac, Cdc42 y R-Ras regulan la migración celular en varias estirpes celulares, esta regulación es dependiente de PI-3K [85, 67]. En las funciones conocidas de R-Ras, PI-3K parece ser un efector necesario en las vías desencadenadas por esa GTPasa. En epitelio cérvico-uterino no es conocido si PI-3K está involucrada en los procesos de transformación y de metástasis. Nuestro estudio es el primero en empezar a estudiar la adhesión y extensión celular en líneas de epitelio cérvico-uterino.

## **Las células de epitelio cérvico-uterino secretan metaloproteasas**

Las proteasas son enzimas necesarias para la remodelación de tejidos, así como en condiciones patológicas son necesarias para la metástasis de tumores malignos [101]. La invasión de la membrana basal es un paso limitante para establecimiento de metástasis en otros tejidos. La conducta invasiva de un tumor maligno es un mecanismo dependiente de varios procesos. Entre estos procesos encontramos a la adhesión, proteólisis y migración a lo largo de la matriz extracelular. Los tres procesos están interrelacionados y, actualmente, es claro que la proteólisis en muchos casos depende de la adhesión mediada por integrinas. Las señales intracelulares desencadenadas por integrinas modulan la expresión génica de proteasas específicas [99]. Por otro lado, se ha demostrado que ciertas integrinas son capaces de reconocer y unir directamente proteasas [100].

En esta tesis nosotros demostramos que las células de epitelio cérvico uterino son capaces de secretar al menos 9 metaloproteasas. Este es el primer reporte en el que se registran la actividad proteolítica de sobrenadantes de líneas celulares de epitelio de cérvix. El rol biológico que juega cada proteasa en la malignidad del cáncer cérvico-uterino no se ha establecido, probablemente, las proteasas sean utilizadas en la metástasis o invasión de otros tejidos. La utilización de gelatina como un sustrato promiscuo de proteasas ha demostrado ser efectivo para la detección de la mayoría de las proteasas conocidas. Sin embargo, se sabe que algunas proteasas prefieren sustratos como caseína o proteínas de matriz extracelular [101]. Por lo cual no debemos excluir la posibilidad de que existan otras proteasas.

El tratamiento de los sobrenadantes de células de epitelio cérvico-uterino con EDTA y 1-10 fenantrolina permitió identificar que las nueve proteasas secretadas son dependientes de iones metálicos. La inhibición con 1-10 fenantrolina establece que las proteasas sensibles a este compuesto son de la familia de las metzincinas [101]. Para determinar la probable identidad de las proteasas encontradas, nosotros realizamos una búsqueda en bases de datos. Aunque hasta en el momento, nosotros no podemos identificar exactamente a cada proteasas, proponemos las siguientes identidades, en base a su peso molecular:

<i>Peso estimado (KDa)</i>	<i>Candidatos de la familia Metzincina</i>
53	<u>MMP-8</u> , <u>MMP-14</u> , <u>MMP-10</u> y <u>MMP-11</u>
63	<u>MMP-16</u> , <u>MMP-14</u>
77	<u>MMP-2</u> , <u>MMP-15</u>
86	<u>MMP-9</u>
90-220	????????????????

Nota: Proteasas capaces de degradar gelatina se muestran subrayadas. No se encontró ninguna proteasas de la familia de las metzincinas que posean un peso molecular mayor a 90 KDa (marcadas como: ??).

Curiosamente, encontramos que los pesos estimados por arriba de 90 KDa no correlacionan con ningún miembro conocido en la familia de las metzincinas. Existen dos posibilidades para explicar la presencia de esas proteasas, la primera es que la bandas correspondan a agrupaciones conformadas por dímeros o trimeros de algún monómero. Por otro lado, una posibilidad atractiva es que sean proteasas no identificadas previamente. En los geles se observan bandas muy cercanas entre sí, lo cual podría representar la detección de la proteasa activa y

de su zimógeno (Forma precursora no activada).

Un hallazgo interesante de estos estudios es que las tres líneas utilizadas en esta tesis (C33, VIBO e INBL) producen al parecer las mismas proteasas. Si esas proteasas son el resultado de la transformación maligna o si el tejido normal ya las poseía, es un hecho que no se conoce. Si el tejido normal posee proteasas, la función de dichas enzimas sería importante para conocer su biología en el epitelio del cérvix. Una posibilidad es que el epitelio sufra periódicamente remodelaciones y que las proteasas sean utilizadas en dicho proceso. Si las proteasas detectadas en este estudio son el resultado de la transformación, este hecho sugeriría que no importando el mecanismo de transformación (con o sin papilomavirus), siempre se expresaran las mismas proteasas. Probablemente, estas proteasas serían necesarias para la metástasis de tumores de cérvix. El ahondar en estos estudios nos permitirá identificar más marcadores de malignidad, así como conocer más acerca de las células del epitelio cérvico-uterino.

La expresión de proteasas en líneas de epitelio cérvico-uterino parece ser diferencial. La incubación del zimograma por 24 h permite detectar la actividad proteolítica de dos proteasas principalmente (63 y 186 KDa). La incubación del zimograma por 48 h permite detectar la actividad enzimática de las proteasas restantes. Probablemente, la cantidad de cada proteasa secretada sea regulada por las células de cérvix. Otra posibilidad sería el hecho de que las proteasas de 63 y 186 KDa tienen una actividad proteolítica mayor que las proteasas restantes. Tal vez, las células de epitelio cérvix necesitan expresar ciertas enzimas primero, y posteriormente otras. Hasta el momento no existe información sobre la producción

o regulación de proteasas en células de cáncer cérvico-uterino. Sería interesante identificar a las proteasas, ya sea por secuenciación o por anticuerpos monoclonales, con el fin de conocer el papel que juegan en metástasis. Cabe mencionar que estos resultados han abierto una nueva área de estudio en el laboratorio.

Nuestro principal interés sobre la proteasas fue determinar si alguna de estas enzimas dependía de la interacción de integrina con sus ligando. Sin embargo, el crecimiento de células de epitelio cérvico-uterino sobre proteínas de matriz extracelular no tiene ningún efecto sobre la expresión de proteasas. Lo anterior contrasta con un estudio que demuestran que la enzima stromielisina 1 es modulada por la integrina para colágena I [99]. La utilización de células transfectadas con las mutantes de R-Ras tampoco alteró la expresión de las metaloproteasas encontradas en este estudio (dato no mostrado). El sustrato que nosotros utilizamos es promiscuo para una variedad de proteasas. Proteínas como la metaloproteína de matriz 11 (MMP-11) prefiere como sustrato a proteínas de Matriz extracelular. Nosotros creemos que otras proteasas pueden estar siendo producidas por células de cáncer cérvico-uterino, y tal vez la gelatina no sea un sustrato apropiado para estas. El uso de otros sustratos promiscuos como caseína o proteínas de matriz extracelular podría llevar a una mejor caracterización del perfil proteolítico de estas células. Así mismo, el uso de inhibidores de proteasas específicos facilitaría la caracterización e identificación de dichas proteasas.

## **8. Conclusiones**

- La célula de epitelio cérvico-uterino unen a fibronectina y colágena por medio de integrinas  $\beta 1$ .
- R-Ras no participa en la modulación de la afinidad (activación) de integrinas  $\beta 1$ .
- R-Ras participa en los mecanismos de señalización adentro hacia fuera que modulan la extensión de células epitelio cérvico-uterino.
- Fosfatidil-inositol 3 cinasa (PI-3K) participa en la extensión celular modulada por R-Ras.
- Las células de epitelio cérvico-uterino secretan metaloproteasas
- La secreción de proteasas es independiente de la interacción integrina- matriz extracelular, por lo que R-Ras no modula la expresión de proteasas a través de integrinas.

## 9. Referencias

1. Darnell, J., H. Lodish, and D. Baltimore, *Molecular Cell Biology*. 1993: Scientific American Books.
2. Ruoslahti, E., *How cancer spread*. Scientific American, 1996(September):72-77.
3. Meyer, R.L., *Roger Sperry and his chemoaffinity hypothesis*. *Neuropsychologia*, 1998. **36**(10):957-980.
4. Dogic, D., B. Eckes, and M. Aumailley, *Extracellular matrix, integrins and focal adhesions*. *Current Topics In Pathology*, 1999. **93**:75-85.
5. Small, J.V., K. Rottner, and I. Kaverina, *Functional design in the actin cytoskeleton*. *Current Opinion in Cell Biology*, 1999. **11**:54-60.
6. Rosales, C., *et al.*, *Signal transduction by cell adhesion receptors*. 1995. **1242**:77-98.
7. Rosales, C. and R. Juliano, *Signal transduction by cell adhesion receptors in leukocyte*. *Journal of Leukocyte Biology*, 1995. **57**:189-198.
8. Hart, I. and A. Saini, *Biology of tumor metastasis*. *The Lancet*, 1992. **339**:1453-1457.
9. Alberle, H., H. Schwartz, and R. Kemler, *Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function*. *The Journal of Cell Biochemistry*, 1996. **61**:514-523.
10. Gumbiner, B.M., *Cell adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis*. *Cell*, 1996:345-357.
11. Schwarzbauer, J., *Basement membranes: Putting up the barriers*. *Current Biology*, 1999. **9**(7): R242-4.
12. Boudreau, N.J. and P.L. Jones, *Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come*. *Biochemical Journal*, 1999. **339 ( Pt 3)**: 481-8.
13. Porter, J.C. and N. Hogg, *Integrins take partners: cross-talk between integrins and other membrane receptors*. *Trends in Cell Biology*, 1998. **8**: p. 390-396.
14. Schwartz, M.A. and V. Baron, *Interactions between mitogenic stimuli, or, a thousand and one connections*. *Current Opinion in Cell Biology*, 1999. **11**:197-202.
15. Troyanovsky, S.M., *Mechanism of cell-cell adhesion complex assembly*. *Current Opinion in Cell Biology*, 1999. **11**:561-566.
16. Sarkar, S., *Focal adhesions*. *Current Biology*, 1999. **9**(12):R428.
17. Berrier, A.L., *et al.*, *Activated R-Ras, Rac1, PI-3K and PKC $\epsilon$  can each restore cell spreading inhibited by isolated integrin  $\beta 1$  cytoplasmic domains*. *The Journal of Cell Biology*, 2000. **151**(7):1549-1560.
18. Hynes, R.O., *Cell Adhesion: old and new questions*. *Trends in Biological Science*, 1999. **24**(12):M33-M37.
19. Burrige, K. and M. Chrzanowska-Wodnicka, *Focal adhesions, contractility, and signaling*. *Annual Review in Cell Development Biology*, 1996. **12**: 643-519.
20. Massia, S.P. and J.A. Hubbell, *An RGD spacing of 440 nm is sufficient for integrin  $\alpha \beta 3$ -mediated fibroblast spreading and 140 nm for focal contact*

- and stress fiber formation*. The Journal of Cell Biology, 1991. **114**:1089-1100.
21. Sheetz, M.P., D.P. Felsenfeld, and C.G. Galbraith, *Cell migration: regulation of force on extracellular matrix-integrin complexes*. Trends in Cell Biology, 1998. **8**: 51-54.
  22. Schwartz, M.A., *Signaling by integrins: Implications for tumorigenesis*. Cancer Research, 1993. **53**:1503-1506.
  23. Masumoto, A., S. Arao, and M. Otsuki, *Role of  $\beta 1$  integrins in adhesion and invasion of hepatocellular carcinoma cells*. Hepatology, 1999. **29**:68-74.
  24. La\_Rosa, F.A. and D.A. Lee, *Collagen degradation in glaucoma: will it gain a therapeutic value?* Current Opinion in Ophthalmology, 2000. **11**(2):90-3.
  25. Archelos, J.J., S.C. Previtali, and H. Hartung, *The role of integrins in immune-mediated diseases of the nervous system*. Trends in Neuroscience, 1999. **22**:30-38.
  26. Chen, L.L., et al., *Multiple Activation States of Integrin  $\alpha 4\beta 1$  Detected through Their Different Affinities for a Small Molecule Ligand*. The Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(19):13167-13175.
  27. Hughes, P.E. and M. Pfaff, *Integrin affinity modulation*. Trends in Cell Biology, 1999. **8**:359-364.
  28. Humphries, M.J. and P. Newham, *The structure of cell adhesion molecules*. Trends in Cell Biology, 1998. **8**:78-83.
  29. Juliano, R., *Cooperation between soluble factors and integrin-mediated cell anchorage in the control of cell growth and differentiation*. Bioessays, 1996. **18**(11):911-7.
  30. Adams, C. and W. Nelson, *Cytomechanics of cadherin-mediated cell-cell adhesion*. Current Opinion in Cell Biology, 1998. **10**:572-577.
  31. Vlemminckx, K. and R. Kemler, *Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signaling*. BioEssays, 1999. **21**(3):211-220.
  32. Yap, A.S., et al., *Lateral clustering of the adhesive ectodomain: a fundamental determinant of cadherin function*. Current Biology, 1997. **7**:308-315.
  33. Knudsen, K.A., et al., *A role for cadherins in cellular signaling and differentiation*. Journal of Cellular Biochemistry Supplements, 1998. **31**:168-176.
  34. Kohmura, N., *Diversity revealed by a novel family of cadherins expressed in neurons at a synaptic complex*. Neuron, 1998. **20**:1137-1151.
  35. Shapiro, L., et al., *Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins*. Nature, 1995. **374**:327-337.
  36. Tedder, T.F., et al., *The selectins: vascular adhesion molecules*. FASEB Journal, 1995. **9**(10):866-73.
  37. Petruzzelli, L., M. Takami, and H.D. Humes, *Structure and function of cell adhesion molecules*. American Journal Of Medicine, 1999. **106**(4):467-76.
  38. Moore, K.L., *Structure and function of P-selectin glycoprotein ligand-1*. Leukemia and Lymphoma, 1998. **29**(1-2):1-15.
  39. Zimmerman, G.A., T.M. McIntyre, and S.M. Prescott, *Adhesion and signaling in vascular cell-cell interactions*. Journal of Clinical Investigation, 1996. **98**:1699-1702.

40. Aplin, A.E., *et al.*, *Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: The Role of integrins, cadherins, immunoglobulin - cell adhesion molecules, and selectins*. *Pharmacological Review*, 1998. **50**:197-263.
41. Shimizu, Y., D.M. Rose, and M.H. Ginsberg, *Integrins in the immune system*. *Advances In Immunology*, 1999. **72**:325-80.
42. Sánchez-Madrid, F. and M.A. Del Pozo, *Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions*. *The EMBO journal*, 1999. **18**(3):501-511.
43. Lodish, H., *et al.*, *Integrating Cells into Tissues*, in *Molecular Cell Biology*, S. Tenney, Editor. 2000: New York. p. 969-998.
44. Hynes, R.O., *Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion*. *Cell*, 1992. **69**:11-25.
45. Berman, A.E. and N.I. Kozlova, *Integrins: structure and functions*. *Membrane and Cell Biology*, 2000. **13**(2):207-44.
46. De\_Arcangelis, A. and E. Georges\_Labouesse, *Integrin and ECM functions: roles in vertebrate development*. *Trends in Genetics*, 2000. **16**(9):389-95.
47. Hansen, R.K. and M.J. Bissell, *Tissue architecture and breast cancer: the role of extracellular matrix and steroid hormones*. 2000. **7**(2):95-113.
48. Howe, A., *et al.*, *Integrin signaling and cell growth control*. *Current Opinion in Cell Biology*, 1999. **10**:220-231.
49. Sakai, T., J.M. De la Pena, and D.F. Mosher, *Synergism among Lysiphosphatidic acid, b1A integrins, and Epidermal growth factor or platelet-derived growth factor in mediation of cell migration*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999. **274**(22):15480-15486.
50. Hughes, P.E., *et al.*, *Breaking the integrin hinge: A defined structural constraint regulates integrin signaling*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996. **271**:6571-6574.
51. Vinogradova, O., *et al.*, *A structural basis for integrin activation by the cytoplasmic tail of the  $\alpha_{11\beta}$ -subunit*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000. **97**(4):1450-1455.
52. Emsley, J., *et al.*, *Structural basis of collagen recognition by integrin  $\alpha_2\beta_1$* . *Cell*, 2000. **100**:47-56.
53. Springer, T.A., *Folding of the N-terminal, ligand-binding region of the integrin  $\alpha$ -subunits into a  $\beta$ -propeller domain*. *Biochemistry*, 1997. **94**:65-72.
54. Gailit, J. and E. Ruoslahti, *Regulation of the fibronectin receptor affinity by divalent cations*. *The Journal of Cell Biochemistry*, 1988. **263**:12927-12934.
55. De Melker, A.A. and A. Sonnenberg, *Integrins: alternative splicing as a mechanism to regulate ligand binding and integrin signaling events*. *BioEssays*, 1999. **21**:499-509.
56. Ivins, J.K., P.D. Yurchenco, and A.D. Lander, *Regulation of neurite outgrowth by integrin activation*. *Journal of Neuroscience*, 2000. **20**(17):6551-60.
57. Ruoslahti, E., *Fibronectin and its integrin receptors in cancer*. *Advances In Cancer Research*, 1999. **76**:1-20.
58. Sherr, C.J., *Cancer cell cycles*. *Science*, 1996. **276**:1672-1676.
59. Marshall, J.F. and I.R. Hart, *The role of  $\alpha$ -integrins in tumor progression and metastasis*. *Seminars in Cancer Biology*, 1996. **7**:129-138.

60. Murphy, G. and J. Gavrilovic, *Proteolysis and cell migration: creating a path?* Current Opinion in Cell Biology, 1999. **11**:614-621.
61. Miyamoto, S., S.K. Akiyama, and K.M. Yamada, *Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function.* Science, 1995. **267**(5199):883-5.
62. Critchley, D.R., *Focal adhesion - the cytoskeletal connection.* Current Opinion in Cell Biology, 2000. **12**:133-139.
63. Mastrangelo, A.M., et al., *Amino acid motif required for isolated  $\beta$  cytoplasmic domain to regulate 'in trans'  $\beta$ 1 integrin conformation and function in cell attachment.* Journal of Cell Science, 1999. **112**:217-229.
64. Eigenthaler, M., et al., *A conserved sequence motif in the integrin  $\beta$ 3 cytoplasmic domain is required for its specific interaction with  $\beta$ 3-endonexin.* The Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**:7693-7698.
65. Wang, H., et al., *Role of the  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 integrin cytoplasmic domains in cell morphology, motility and responsiveness to stimulation by the protein kinase C pathway.* Cell Adhesion and Communication, 2000. **7**(4):281-97.
66. Briesewitz, R., A. Kern, and E.E. Marcantonio, *Assembly and function of integrin receptors is dependent on opposing  $\alpha$  and  $\beta$  cytoplasmic domain.* Molecular Biology of the Cell, 1995. **6**:997-1010.
67. Keely, P.J., et al., *R-Ras signals through specific integrin  $\alpha$  cytoplasmic domains to promote migration and invasion of breast epithelial cells.* Journal Of Cell Biology, 1999. **145**(5):1077-88.
68. Copolino, M.G. and S. Dedhar, *Bi-directional signal transduction by integrin receptors.* International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2000. **32**(2):171-88.
69. Miller, L.A., et al., *The engagement of  $\beta$ 1 Integrins on promonocytic cells promotes phosphorylation of Syk and formation of a complex containing Lyn and  $\beta$ 1.* European Journal of Immunology, 1999. **29**:1426-1434.
70. Planus, E., et al., *Binding of urokinase to plasminogen activator inhibitor type-1 mediates cell adhesion and spreading.* Journal of Cell Science, 1997. **110**:1091-1098.
71. Hemler, M.E., *Integrin associated proteins.* Current Opinion in Cell Biology, 1998. **10**:578-585.
72. Knezevic, I., T.M. Leisner, and S.-T. Lam, *Direct binding of the platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (GPIIb-IIIa) to talin.* The Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**:16416-16421.
73. Humphries, M.J., *Integrin cell adhesion receptors and the concept of agonism.* Trends in Protein Structure, 2000. **21**:29-32.
74. Guan, J.L., J.E. Trevithick, and R.O. Hynes, *Fibronectin/integrin interaction induces tyrosine phosphorylation of a 120-kDa protein.* Cell Regulation, 1991. **2**(11):951-64.
75. LaFlamme, S.E., S.K. Akiyama, and K.M. Yamada, *Regulation of fibronectin receptor distribution [published erratum appears in J Cell Biol 1992 Jul;118(2):491].* Journal of Cell Biology, 1992. **117**(2):437-47.
76. Juliano, R. and S. Haskill, *Signaling transduction from extracellular matrix.* Journal of Cell Biology, 1993. **120**:577-585.

77. Cary, L.A., J.F. Chang, and J.-L. Guan, *Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn*. Journal of Cell Science, 1996. **109**:1787-1794.
78. Frisch, S.M., *et al.*, *Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase*. Journal of Cell Biology, 1996. **134**(3): p. 793-9.
79. Robinson, M.J. and M.H. Cobb, *Mitogen-activated protein kinase pathways*. Current Opinion in Cell Biology, 1997. **9**:180-186.
80. Su, B. and M. Karin, *Mitogen-activated protein kinase cascade and regulation of gene expression*. Current Opinion in Immunology, 1996. **8**:402-411.
81. Renshaw, M., D. Toksoz, and M. Schwartz, *Involvement of the small GTPase rho in integrin-mediated activation of mitogen-activated protein kinase*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**:21691-21694.
82. Shibayama, H., *et al.*, *H-Ras is involved in the inside-out signalling pathway of interleukin-3-induced integrin activation*. Blood, 1999. **93**(5):1540-1548.
83. Hughes, P.E., *et al.*, *Suppression of integrin activation: A novel function of a Ras/Raf-initiated MAP Kinase Pathway*. Cell, 1997. **88**:521-530.
84. Zhang, Z., *et al.*, *Integrin Activation by R-ras*. Cell, 1996. **85**(April):61-69.
85. Keely, P.J., *et al.*, *Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K*. Nature, 1997. **390**(11 December):632-636.
86. Kinashi, T., *et al.*, *Distinct mechanisms of alpha 5beta 1 integrin activation by Ha-Ras and R-Ras*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(29):22590-6.
87. Kooyk, Y. and C.G. Figdor, *Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion*. Current Opinion in Cell Biology, 2000. **12**:542-547.
88. Nobes, C.D. and A. Hall, *Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complex associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia*. Cell, 1995. **81**:53-62.
89. Lowe, D.G., *et al.*, *Structure of the Human and Murine R-Ras Genes, Novel Genes Closely Related to ras Proto-oncogenes*. Cell, 1987. **48**(January): 137-146.
90. Bos, J.L., *Ras-like GTPases*. Biochimica et Biophysica Acta, 1997. **1333**:M19-M31.
91. Osada, M., *et al.*, *Differential roles of Akt, Rac, and Ral in R-Ras-mediated cellular transformation, adhesion and survival*. Molecular and Cellular Biology, 1999. **19**(9):6333-6344.
92. Sethi, T., *et al.*, *The small GTP-binding protein R-Ras can influence integrin activation by antagonizing a ras/raf-initiated integrin suppression pathway*. Molecular Biology of the Cell, 1999. **10**:1799-1809.
93. Wang, B., *et al.*, *R-Ras contains a Proline-Rich Site That Binds to SH3 Domains and is Required for Integrins Activation by R-Ras*. The Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(7):5222-5227.
94. Suzuki, J., Y. Kaziro, and H. Koide, *An activated mutant of R-Ras inhibits cell death caused by cytokine deprivation in BaF3 cell in the presence of IGF-I*. Oncogene, 1997. **15**:1689-1697.
95. Monroy, G.A., *et al.*, *Establecimiento de siete estirpes celulares provenientes de biopsias de cérvix normal y con cáncer cérvico uterino y*

- sus diferentes contenidos y localizaciones de desmogleína 1*. Revista Mexicana de Oncología, 1992. **7**:69-76.
96. Rowin, M.E., et al., *Intracellular calcium requirements for integrin activation*. Journal of Cellular Physiology, 1998. **175**:193-202.
  97. Pichet, J.-P., *Transfection of mammalian cells in 96-Well plates with Lipofectamine 2000 reagent*. Focus, 1999. **21**(3):58-60.
  98. Haralson, M.A. and J.R. Hassell, *Extracellular Matrix : A Practical Approach*. 1st ed. The Practical Approach Series, ed. D. Rickwood and B.D. Hames. Vol. 151. 1995, New York: Oxford University Press. 404.
  99. Lochter, A., et al.,  *$\alpha 1$  and  $\alpha 2$  integrins mediate invasive activity of mouse mammary carcinoma cells through regulation of stromelysin-1 expression*. Molecular Biology of the Cell, 1999. **10**:271-282.
  100. Lochter, A., et al., *Misregulation of stromelysin-1 expression in mouse mammary tumor cells accompanies acquisition of stromelysin-1-dependent invasive properties*. The Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(8):5007-5017.
  101. Bergers, G. and L. Coussens, *Extrinsic regulators of epithelial tumor progression: metalloproteinases*. Current Opinion in Genetics and Development, 2000. **10**:120-127.
  102. Zou, J.X., et al., *An Eph receptor regulates integrin activity through R-Ras*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(24):13813-8.
  103. Ramos, J.W., et al., *The Death Effector Domain of PEA-15 Is Involved in Its Regulation of Integrins Activation*. The Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(51):33897-33900.
  104. Shields, J.M., et al., *Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'*. Trends in Cell Biology, 2000. **10**:147-154.
  105. Kolanus, W. and B. Seed, *Integrins and inside-out signal transduction: converging signals from PKC and PIP3*. Current Opinion in Cell Biology, 1997. **9**:725-731.
  106. Krasilnikov, M.A., *Phosphatidylinositol 3-kinase dependent pathways: The role in control of cell growth, survival, and malignant transformation*. Biochemical Journal (Moscow), 1999. **65**(1):59-67.
  107. Leever, S., B. Vanhaesebroeck, and M.D. Waterfiel, *Signalling through phosphatidylinositol 3-Kinase: The lipids take centre stage*. Current Opinion in Cell Biology, 1999. **11**:219-225.
  108. Jeffers, M. D. et al., *E-Cadherin and integrin cell adhesion molecule expression in invasive and in situ carcinoma of the cervix*. Gynecologic Oncology, 1997. **64**:481-486.