

51



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA SOBRE-EXPRESIÓN DEL ONCOGEN *H-ras* EN LA FASE G1 DEL CICLO CELULAR DE CÉLULAS HELA

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :
FEDERICO CENTENO CRUZ

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



TUTOR DE TESIS: DR. JOSE EFRAÍN GARRIDO GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

2002





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Análisis del efecto de la sobre-expresión del oncogen H-ras en la fase G1 del ciclo celular de células HeLa"

realizado por FEDERICO CENTENO CRUZ

con número de cuenta 8819296-7 , quién cubrió los créditos de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

DR. JOSE EFRAIN GARRIDO GUERRERO

Propietario

DR. RENE DE JESUS CARDENAS VAZQUEZ

Propietario

M. EN C. EMILIO JOAQUIN CORDOVA ALARCON

Suplente

M. EN C. RENATO LEON RODRIGUEZ

Suplente

BIOL. RENE CERRITOS FLORES

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

Dra. Patricia Ramos Morales

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

DEDICATORIA

Esta tesis esta dedicada a mi familia:

A mis padres, Cayetano Centeno y Martha Rosa Patricia Cruz, quienes me apoyaron en todo momento y en gran medida gracias a sus esfuerzos logré concluir esta etapa.

A mis hermanos, Elizabeth y Victor, quienes siempre han estado a mi lado.

A mis sobrinos, Ian y Daniela, quienes con su llegada llenaron de nuevas alegrías a la familia.

A mis abuelas, tíos, primos, y demás miembros de la familia.

Para Angeles, por supuesto.

AGRADECIMIENTOS

En el desarrollo de esta tesis tuve la fortuna de trabajar junto a Emilio Córdova, de quien pude constatar su alta calidad académica y humana. A él un agradecimiento especial.

El trabajo de citometría de flujo se realizó con la asesoría de la Q.B.P. Blanca Reyes, del departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN.

Los compañeros del laboratorio 1 del departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN estuvieron siempre dispuestos a brindar su apoyo cuando fue necesario.

No puedo pasar por alto a mis compañeros de la Facultad de Ciencias: Hugo, Noé, Victor Hugo, Daniel, Alejandra, Jairo y demás que hicieron tan agradable mi paso por la facultad.

Por último agradezco al Dr. Efraín Garrido, por el apoyo recibido durante toda la realización de ésta tesis.

RESUMEN

Los genes de la familia *ras* son algunos de los más frecuentemente alterados en cáncer. La función de sus productos proteicos es la de mediar la señalización de estímulos extracelulares desencadenando varias respuestas, entre las que destaca la promoción de la proliferación. El blanco de la señalización por *Ras* en la regulación del ciclo celular es la inactivación de Rb. Sin embargo, en años recientes se ha acumulado evidencias de que *Ras* puede regular el ciclo celular por vías alternas, independientemente de Rb. En el presente trabajo se encontró que la sobre-expresión de *H-ras* puede inducir un incremento en la proliferación en células HeLa, donde se sabe la función de Rb está disminuida por la presencia de proteínas de papilomavirus. El aumento en la proliferación de células HeLa por la sobre-expresión de *H-ras* se debe a un acortamiento en el ciclo celular, específicamente en la fase G1, como se encontró en ensayos con tratamiento con fármacos, que inducen un freno en puntos específicos del ciclo celular, y el análisis con citometría de flujo de las poblaciones celulares. La sobre-expresión de *H-ras*, no produce alteraciones adicionales en las fases tardías del ciclo celular. Los reguladores tardíos del ciclo celular como ciclina B, tienen un patrón de expresión más temprano en células que sobre-expresan *H-ras*, aunque este patrón podría solamente reflejar el desfase ocasionado por el acortamiento de G1, pero no se puede descartar que *ras* pueda participar en la modulación de factores que regulan eventos tardíos del ciclo celular.

Por otra parte en ensayos de salida de arresto en G1, por tratamiento prolongado con timidina, las células que sobre-expresan *H-ras* avanzan primero en la salida de este arresto, lo que implica que quizá se arresten en un momento más tardío de la fase G1 ó que se sinteticen algunos de los factores implicados en la replicación, aún con desequilibrio en las concentraciones de nucleótidos. Aunque se ha señalado que los efectores de *Ras* que participan en la inducción de la proliferación son las vías de Raf y PI3K. En el presente trabajo, la inhibición de la vía de Raf o la inhibición de la vía de PI3K no disminuyen el efecto observado de aceleración de la proliferación, por lo que quizá *Ras* utilice otra vía además de Raf y PI3K (probablemente a través de Rho), que regula la transición a través de G1, independientemente de Rb.

INDICE

Agradecimientos.....	III
Resumen.....	IV
1. Introducción.....	1
2. Cáncer.....	1
Ciclo celular.....	2
Ciclina y cinasas dependientes de ciclina (Cdk)	3
Regulación de ciclina y Cdk.....	8
<i>Ras</i>	11
Regulación de la actividad de <i>Ras</i>	15
Efectores de <i>Ras</i>	19
<i>Ras</i> y ciclo celular.....	22
3. Objetivos.....	26
4. Material y métodos.....	27
Cultivo celular.....	28
Conteo celular.....	28
Tratamiento con fármacos.....	28
Análisis de metafases.....	30

Lisados celulares y Western blot.....	31
Citometría de flujo.....	32
Inmunofluorescencia.....	33
Incorporación de Bromodesoxiluridina.....	34
Tratamiento con inhibidores.....	34
5. Resultados.....	36
Efecto de la sobre-expresión de <i>H-ras</i> en la proliferación de células HeLa.....	36
Efecto de la sobre-expresión de <i>H-ras</i> en la progresión del ciclo celular en células HeLa.....	38
Efecto de <i>H-ras</i> en la duración de la fase G1 del ciclo celular en células HeLa.....	42
Efecto de <i>H-ras</i> en la progresión G1-S del ciclo celular en células HeLa.....	45
Participación de las vías de Raf y PI3K en el efecto de <i>H-ras</i> sobre el ciclo celular de células HeLa.....	49
6. Discusión.....	51
7. Conclusiones.....	55
8. Referencias.....	57

1. INTRODUCCIÓN

Cáncer

En las últimas décadas, el cáncer se ha convertido en una de las enfermedades más importantes en todo el mundo. En la década de los noventa más de 6 millones de personas murieron cada año debido al cáncer, según los registros de la Organización Mundial de la Salud (Weinberg, 1996). En México, el cáncer constituye la segunda causa de mortalidad y tan sólo en 1999, el número de muertes atribuidas a esta enfermedad fue de 53,662 personas (SSA, 2000). La alta incidencia de tumores en la población mexicana, genera un gran gasto en atención y tratamiento médico para las instituciones de salud. Además, los enfermos de cáncer sufren un importante deterioro en su calidad de vida.

Bajo el nombre de cáncer se agrupan una gran cantidad de enfermedades, que solo tienen en común un crecimiento celular descontrolado. Estas células pueden formar cúmulos, denominados tumores, los cuales pueden ser benignos o malignos. Los tumores denominados benignos se encuentran estrictamente localizados y encapsulados dentro de una capa de tejido conectivo y son incapaces de invadir el tejido circundante. Este tipo de tumores muy rara vez constituye una amenaza para la vida. Por otro lado, los tumores malignos son capaces de invadir el tejido circundante y diseminarse a partir de su lugar de origen a través de torrente sanguíneo y el sistema linfático hacia nuevas ubicaciones en el organismo, donde pueden originar tumores secundarios. La capacidad de un tumor para invadir otros tejidos y formar tumores secundarios es conocida como metástasis.

Dentro de cualquier tejido normal, existe un balance finamente regulado entre la promoción y la inhibición del crecimiento celular. De esta manera, en un individuo adulto la proliferación celular ocurre únicamente en eventos estrictamente controlados, como en la restauración de un tejido

dañado o durante el recambio celular normal que se lleva a cabo en un tejido (McDonald y Ford, 1997). Además de la regulación de la proliferación, la apoptosis o muerte celular programada mantiene la homeostasis del desarrollo y tamaño de un tejido. Por consiguiente, el cáncer es ocasionado por una acumulación de alteraciones en los genes que mantienen la regulación de la proliferación celular y la apoptosis (McCormick, 1999).

Ciclo celular

Debido a la importancia de los mecanismos que regulan la multiplicación celular en el desarrollo de un tumor, muchos de los esfuerzos en investigación se han centrado en estudiar la regulación del ciclo de división de la célula. El ciclo celular, comprende la secuencia ordenada de eventos que concluyen con la división de una célula. Tradicionalmente, el ciclo celular se ha dividido en cuatro fases: G1, S, G2 y M (fig. 1). La fase G1 es generalmente la de mayor duración en el ciclo celular y durante ésta fase (dependiendo de las condiciones de su entorno), la célula puede optar por la progresión del ciclo celular, diferenciarse o permanecer en un estado de latencia o quiescencia, que se conoce como G0 (Zetterberg *et al.*, 1995). En la fase G1 también sucede el mayor aumento de tamaño de la célula, que la prepara para la duplicación de su material genético. La fase siguiente a G1 es la de síntesis de DNA o fase S, donde como su nombre lo indica se lleva a cabo la replicación del DNA. Una vez terminada la síntesis de DNA se inicia la fase G2, en la cual la célula se prepara para la fase de división celular o fase de mitosis (M). Finalmente, durante la mitosis se realiza la segregación cromosómica y la división celular, obteniendo dos células hijas idénticas entre sí.

La transición a lo largo del ciclo celular está finamente regulada por una serie de mecanismos, que aseguran la adecuada secuencia e integridad de cada evento. De esta forma, existen puntos de control en diferentes momentos a lo largo del ciclo celular, donde la célula puede llevar a cabo la

revisión de cada proceso. Uno de los principales puntos de control en mamíferos, es conocido como punto de restricción (R), el cual se encuentra situado en la parte final de G1. Durante la primera parte de la fase G1, hasta antes de llegar al punto de restricción se requiere la presencia continua de factores de crecimiento para la progresión a través del ciclo celular. De esta forma, ante la ausencia de nutrientes durante esta etapa, el ciclo celular se detendrá en la fase G1. Sin embargo, una vez que la célula ha atravesado el punto de restricción, la presencia de nutrientes ya no es requerida para la progresión del ciclo celular (Zetterberg, 1995). Por otro lado, también existen puntos de control en la transición de las fases G1 a S y G2 a M; así como durante la fase S y de mitosis, los cuales se encargan de preservar la integridad del material genético. De esta manera, si el DNA es dañado durante las fases de G1 o S, se inhibirá el inicio de la replicación del DNA o su progresión, respectivamente. Mientras la célula permanece arrestada diversos mecanismos celulares se encargan de reparar el daño en el DNA. De manera similar, la célula se arrestará en G2 o mitosis si el daño al DNA ocurre en alguna de éstas fases (Rhind y Russell, 2000).

Ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (Cdk)

Los principales componentes de la maquinaria que regula el ciclo celular son las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclinas (cdk), las cuales se asocian para formar un complejo catalítico ciclina-cdk, donde la cdk posee actividad catalítica y la ciclina es la parte reguladora (Morgan 1997).

Las ciclinas reciben su nombre debido a la expresión y degradación oscilante que presentan estas proteínas a lo largo del ciclo celular en ovocitos de equinodermo, donde originalmente fueron descubiertas. En mamíferos se conocen más de 10 tipos diferentes de ciclinas (tabla 1), las cuales han sido agrupadas según su homología estructural. Sin embargo, algunas de las ciclinas descubiertas hasta ahora, tienen funciones distintas a la regulación del ciclo celular (tabla 1)

(Murray A. Y Marks D., 2001). Las proteínas que conforman a la familia de las ciclinas oscilan entre los 35 y 90 kd, presentando la mayor homología en una región de aproximadamente 100 aminoácidos, conocida como la caja ciclina. Esta región de la proteína es necesaria para la unión y activación de la cdk.

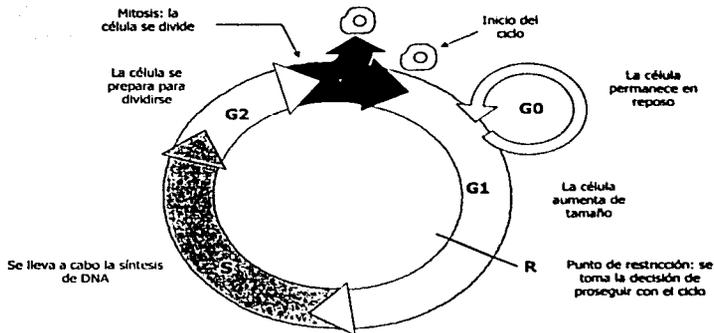


Figura 1. Esquema general del ciclo celular y la duración típica de cada fase. Además se señala el punto principal de control en las células de mamíferos, el punto de restricción.

La familia de las cdk's en mamíferos se encuentra formada por varios miembros, los cuales presentan una homología estructural más conservada que la observada en las ciclinas. Las proteínas que constituyen a la familia de las cdk's generalmente contienen alrededor de 300 residuos de aminoácidos y presentan aproximadamente un 35-65% de identidad al prototipo Ccd2/cdk1. La unión de la cdk con la ciclina provoca un cambio conformacional, que permite al núcleo catalítico de la cdk unirse con una alta especificidad a los dos sustratos, el ATP y la proteína blanco que será fosforilada. La activación secuencial de los distintos miembros de la familia de las cdk's, al unirse con su respectiva ciclina, llevan a cabo la principal regulación de la transición a lo largo del ciclo celular.

Tabla 1. Características principales de la familia de las ciclinas de eucariontes superiores. Las características principales de las ciclinas son compartir una secuencia de aminoácidos conocida como la caja ciclina y tener una actividad oscilante a lo largo del ciclo celular. La clasificación es provisional para aquellas proteínas a las que no se les ha encontrado proteína asociada. Se han nombrado a algunas cinasas de acuerdo a la región de secuencia PSTAIRE que se encuentra muy conservada en las Cdk. Adaptado de Murray y Marks, 2001.

Ciclina	Cdk	Función
		<i>Ciclo Celular</i>
E1,2	Cdk2, Cdk3	Involucrada en la replicación del DNA y la duplicación del centrosoma. El papel y los blancos de la Cdk3 están poco definidos.
A1,2	Cdc2, Cdk2	Papel poco definido en la replicación del DNA y la entrada a mitosis
B1,2	Cdc2	Esencial para mitosis
B3	?	A diferencia de la ciclinas B1 y B2, entra al núcleo durante la interfase
D1,2,3	Cdk4, Cdk6	Requerida para la salida del freno en G1 del ciclo celular
F	?	Se ha reportado su unión a ciclina B. Fluctúa durante el ciclo celular. Restringida a vertebrados?
J	Cdk2	Aparentemente restringida a <i>Drosophila</i> . Regula la entrada a mitosis.
H	Cdk7	Provee la fosforilación activadora para otros complejos Ciclina/Cdk, modifica la maquinaria de transcripción
		<i>Transcripción</i>
C	Cdk8	Fosforila la región C-terminal de la subunidad larga de la RNA polimerasa II
T1,2a,2b	Cdk9	Factor de elongación de la transcripción (Tef-2b). La unión de la ciclina T1 a HIV Tat es requerida para una eficiente unión del elemento Tar del HIV RNA.
K	?	Enriquecida en células germinales. Se asocia con la actividad cinasa a través de la región C-terminal de la subunidad larga de la RNA polimerasa II
		<i>Otras</i>
P35	Cdk5	Encontrada en neuronas postmitóticas. Requerida durante la diferenciación neural. La proteólisis de p35 se asocia de enfermedades neurodegenerativas
?	Cdk10	Desconocida
?	PCTAIRE	Desconocida
?	PFTAIRE	Desconocida
?	PITSLRE	Desconocida, posible papel en inducción de apoptosis.
G1,2	?	Inducida en agresiones que estimulan apoptosis. Se ha reportado asociación con Cdk5. ¿Restringida a vertebrados?
I	?	Desconocida, relacionada a ciclina G
L1,2	?	Desconocida. Homología con ciclinas transcripcionales. Inducida por estimulación dopaminérgica
M	?	Homología con ciclinas transcripcionales.
O	?	Descrita como uracil-DNA glicosilasa. Homología con dclinas.
P	?	Relativa distancia con ciclinas del tipo A y B. Función desconocida. ¿Restringida a vertebrados?

Además de la agrupación según su homología estructural, las ciclinas y las cdk's pueden clasificarse según la fase del ciclo celular que regulan (Tabla 1 y Fig. 2). El primer complejo en activarse es el formado por la ciclina D y las cinasas cdk4 ó cdk6, el cual regula la progresión a través de G1 y se inactiva al final de la misma fase. La principal función de éste complejo es fosforilar al producto proteico del gen supresor de tumores Rb (Beijersbergen y Bernards, 1996). La proteína Rb en su estado hipofosforilado se encuentra unida al factor de transcripción E2F y a las proteínas HDAC y SWIF1/2, para formar un complejo represor de la transcripción por el secuestro de E2F y la compactación de la cromatina por parte de HDAC y SWIF (Stiegler *et al.*, 1998; Klochendler *et al.*, 2002). Al formar parte de éste complejo, Rb reprime la transcripción de genes implicados en la progresión de la fase G1 a S del ciclo celular. Entre los genes activados por E2F se encuentran la ciclina E y diversos genes implicados en la síntesis de DNA. La fosforilación de Rb por el complejo ciclina D/Cdk4 ó 6 promueve la liberación de E2F del complejo represor de la transcripción. Una vez libre, E2F es capaz de activar al promotor de la cilina E y promover la acumulación de su proteína en la fase final de G1.

Posteriormente, la ciclina E se asocia con Cdk2, y una vez activo el complejo promueve el paso de la fase G1 a S del ciclo celular. Hasta el momento se han caracterizado tres blancos principales del complejo ciclina E/Cdk2: Rb, NPAT y Cdc6 (Zhao *et al.*, 2000; Furstenthal *et al.*, 2001).

El complejo ciclina E/Cdk2 es capaz de fosforilar a Rb en sitios distintos a los fosforilados por el complejo D/cdk4-6. Aunque la fosforilación de Rb por el complejo ciclina D/cdk4 ó 6 promueve la liberación de E2F, no parece afectar la unión de las proteínas HDAC y SWIF1/2. Este complejo todavía es capaz de inhibir la transcripción del promotor de la ciclina A. Sin embargo, la fosforilación de Rb realizada por el complejo ciclina E/Cdk2 produce la liberación del HDAC, permitiendo la transcripción del gen de la ciclina A y la posterior síntesis de la proteína. Por otro

lado, el complejo ciclina E/Cdk2 también tiene como blancos a NPAT, proteína involucrada en la biosíntesis de histonas (Zhao *et al.*, 2000) y a Cdc6, la cual desempeña un importante papel en el inicio de la síntesis de DNA (Furstenthal *et al.*, 2001).

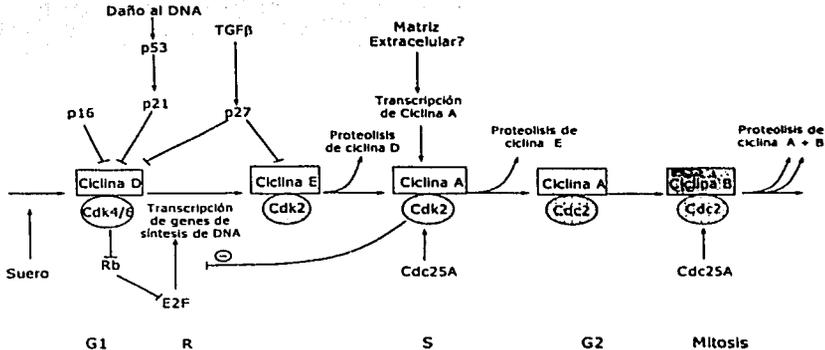


Figura 2. Principales complejos ciclina/Cdk implicados en la regulación del ciclo celular. La actividad de cada complejo esta definida a la respectiva fase del ciclo en la que participa. Además se muestran los principales inhibidores de estos complejos. Adaptado de Pines, 1995.

Una vez iniciada la fase de síntesis del DNA, la ciclina A reemplaza a la ciclina E en la formación del complejo con Cdk2. Este nuevo complejo formado es necesario para la eficiente replicación del DNA y la progresión hacia la fase G2. Aunque se desconocen aún la mayoría de los blancos de este complejo, se sabe que puede fosforilar a Rb y E2F, inhibiendo la actividad de ambas proteínas (Krew *et al.*, 1994). Otra proteína blanco del complejo ciclina A/cdk2 es la helicasa RF-A, la cual forma parte de la maquinaria de replicación (Gibbs et al., 1996). En el inicio de la fase G2, la ciclina A forma otro complejo con Cdc2, promoviendo el paso a través de G2, en un proceso que involucra los efectos de este complejo en el sistema de microtúbulos (Pines, 1995).

La decisión de entrar a mitosis está regulada estrictamente en el punto de control de G2 y en esta transición juega un papel muy importante el estado de activación del complejo ciclina B/cdc2. Al final de G2 e inicio de la mitosis, la ciclina B se transloca del citoplasma al núcleo, donde forma un complejo con Cdc2, que corresponde al primer complejo ciclina/Cdk que fue aislado, denominado inicialmente Factor Promotor de la Maduración (MPF por sus siglas en inglés) (Masui, 1996). Ahora se sabe que el complejo ciclina B/Cdc2 puede unirse a centrosomas y centriolos, controlando de este modo la progresión durante la mitosis (Ookata *et al.*, 1997). Por otra parte, el complejo ciclina B/Cdc2 también participa en la reorganización de microtúbulos y los cambios en el comportamiento y arquitectura celular durante ésta fase. Otro papel importante del complejo ciclina B/Cdc2 es el de fosforilar a la histona H1 y favorecer la compactación de la cromatina y los eventos tempranos de la mitosis (Swank *et al.*, 1997).

Regulación de ciclinas y Cdk

La actividad de los complejos ciclina/Cdk, a lo largo del ciclo celular está regulada principalmente por la disponibilidad de las ciclinas, las cuales son sintetizadas y degradadas en periodos específicos del ciclo celular. De ésta forma, la síntesis proporciona niveles máximos de las ciclinas durante la fase del ciclo celular en la que participa, mientras que su degradación proteolítica asegura el desarrollo secuencial de los eventos desencadenados por los complejos ciclina/Cdk.

Los promotores de las diversas ciclinas se encuentran regulados de manera dependiente del ciclo celular. De esta forma se garantiza que una determinada ciclina sólo se exprese en la fase del ciclo celular donde se requiere su presencia. Por otro lado, las ciclinas son degradadas por el proteosoma a través de una vía dependiente de ubiquitinación (Pines, 1995; Hershko, 1997). La degradación de las ciclinas presenta diferencias en el tipo de ubiquitina-ligasa que emplean. Las

ciclinas de la fase G1 (D y E) tienen una vida media corta (30 minutos), y su degradación se encuentra asociada a las secuencias PEST que se localizan hacia la región carboxilo terminal de la proteína, dentro de la denominada caja F, que es reconocida por el complejo ubiquitina-ligasa Skp1-Cdc53/Cullin-F-Box (SCF), quien lleva a cabo la ubiquitinación de estas ciclinas. Por otro lado, las ciclinas mitóticas (A y B) son degradadas en función de la presencia de un dominio conocido como la caja de destrucción (caja D) y la ubiquitinación la lleva a cabo el complejo promotor de la anafase (APC/C) (Tyers y Jorgensen, 2000).

La actividad de los complejos ciclina/Cdk también puede ser regulada a través de eventos de fosforilación y desfosforilación de la subunidad Cdk. Una vez formado el complejo ciclina/Cdk, se requiere de la fosforilación de un residuo conservado de treonina en la posición 160/161 de la Cdk para su activación. La fosforilación de este residuo conservado, la realiza el complejo formado por ciclina H/Cdk7, conocido como complejo activador de cinasas (CAK) (Morgan 1997). La fosforilación del residuo de treonina 160/161 en la Cdk, induce un cambio conformacional de la proteína, permitiendo la exposición de los residuos de treonina y tirosina localizados en las posiciones 14 y 15 respectivamente, y su posterior fosforilación por una familia de cinasas cuyo prototipo es la proteína Wee1. Estas dos últimas fosforilaciones inhiben la actividad del complejo ciclina/Cdk. Por lo tanto, es necesario la presencia de una fosfatasa para desfosforilar los residuos 14 y 15 de la cinasa y permitir la función del complejo. Diversos reportes han demostrado que la familia de fosfatasas duales Cdc25 son los responsables de desfosforilar los residuos 14 y 15 de la subunidad Cdk. Esta serie de fosforilaciones y desfosforilaciones permiten regular finamente la actividad de los diversos complejos ciclinas/Cdk. En el caso del complejo formado por ciclina B/Cdc2, su actividad regula negativamente a su inhibidor Wee1 y positivamente a su activador Cdc25 (Eklhom y Red, 2000).

Las proteínas inhibidoras de las cdk's (CKI), proporcionan la tercer vía de regulación de los complejos ciclina/Cdk. Hasta el momento se han identificado dos familias de CKI en células de mamíferos: Cip/Kip e INK4. La familia Cip/Kip1 está compuesta por tres miembros: p21^{wafl/cip1}, p27^{kip1} y p57^{kip2}; mientras que la familia INK4 incluye a p16, p18 y p19. Aunque ambas familias proteicas inhiben la actividad de los complejos ciclinas/Cdk, cada una lo hace de manera diferente (Vidal y Koff, 2000). Los miembros de la familia Cip/Kip son capaces de inhibir a todos los complejos ciclina/Cdk, uniéndose directamente al complejo ya formado e impidiendo su función. En el caso de la familia INK4, sus integrantes únicamente inhiben la actividad de cinasa asociada a la ciclina D, al impedir la unión de la ciclina con la Cdk. Recientemente se ha determinado que para la completa activación del complejo ciclina D/Cdk4-6 es necesaria la presencia de p21^{Cip1} a una concentración baja; sin embargo, concentraciones altas de p21^{Cip1} producen la inactivación del complejo, además de que la región que promueve la activación es distinta a la que participa en la inactivación del complejo (Welcker *et al.*, 1998).

La síntesis, degradación y disponibilidad de los CKI, constituyen una vía importante de regulación del ciclo celular. Uno de los casos más concretos es la regulación de la expresión de p21 por p53, que es uno de los principales sensores a daño al DNA y funciona como transactivador. Cuando existe un daño en el DNA, la proteína p53 se acumula en el núcleo y a través de su función como transactivador promueve la expresión de p21 (Macleod *et al.*, 1995). De esta forma, como respuesta al daño en el DNA, se incrementan los niveles de p21^{Cip1} para inhibir la actividad del complejo ciclina/Cdk y provocar un arresto en el ciclo celular. Por otro lado, la degradación de los CKI también se encuentra finamente regulada. En el caso particular de p27^{Kip1}, su degradación se encuentra regulada por el complejo ciclina E/Cdk2. Durante la fase tardía de G1, al incrementarse la actividad del complejo ciclina E/Cdk2, p27^{Kip1} es fosforilado por éste complejo, marcándolo para su degradación a través de la vía de la ubiquitina (Vlach *et al.*, 1997). Por otro lado, se ha reportado

que p27^{Kip1} tiene mayor afinidad por el complejo ciclina D/Cdk4-6 que por el complejo ciclina E/Cdk2. De esta forma, un aumento en los niveles proteicos del complejo ciclina D/Cdk4-6 promueve el secuestro de p27^{Kip1} e impide que ésta se una y reprima al complejo ciclina E/Cdk2 (Takuwa y Takuwa, 1997).

Finalmente, se ha demostrado que la actividad de los complejos ciclina/Cdk también puede ser regulada por su localización intracelular. En el caso particular del complejo ciclina B/Cdc2, tanto la ciclina como la Cdk presentan una localización citosólica durante las primeras fases del ciclo celular donde no se necesita de su actividad. Sin embargo, poco antes de la transición de G2 hacia mitosis, que es la fase del ciclo celular regulado por el complejo ciclina B/Cdc2, la ciclina B y Cdc2 se translocan hacia el núcleo (Kishimoto y Okumura, 1997). Por otro lado, a lo largo del ciclo celular, Wee1 (el regulador negativo del complejo ciclina B/Cdc2) se encuentra en el núcleo mientras que Cdc25c (el regulador positivo del mismo complejo), permanece en el citoplasma durante la interfase, para trasladarse al núcleo hasta el final de G2 junto con el complejo ciclina B/Cdc2, permitiendo de esta manera, la completa activación del complejo (Pines, 1995).

Los complejos ciclinas/Cdk constituyen la maquinaria principal del ciclo celular y de su regulación depende la transición adecuada a lo largo de cada una de las fases. Por tal motivo, en enfermedades como el cáncer, donde ocurre una desregulación de la proliferación, es frecuente encontrar diversas alteraciones en la regulación de los complejos ciclinas/Cdk.

Ras

Una de las primeras familias génicas en ser relacionadas con el cáncer, fue la integrada por los tres genes *ras*: *H-ras*, *K-ras* y *N-ras*. Inicialmente, los genes *H-ras* y *K-ras* fueron descubiertos como la región génica responsable de la actividad transformante de los virus de sarcoma murino de Harvey y Kirsten, respectivamente. Posteriormente, un tercer gen altamente relacionado, *N-ras* se caracterizó en una línea celular de neuroblastoma. Poco tiempo después, se determinó la presencia

de los tres genes *ras* en forma de proto-oncogenes en el genoma de células eucarióticas. Finalmente se determinó que los tres genes *ras* juegan un papel muy importante en la regulación de la proliferación y diferenciación de células normales. Sin embargo, su alteración oncogénica los convierte en uno de los principales elementos en el desarrollo de un tumor. Las versiones oncogénicas de *ras* difieren de las normales únicamente en una mutación puntual, la cual produce sustituciones de alguno de los aminoácidos localizados en las posiciones 12, 13, 59, 61 ó 63 de la proteína (Malumbres y Pellicer, 1998).

Ras es el oncogen más frecuentemente mutado en diversos tumores, presentando una frecuencia de alrededor del 30% en todos los tumores sólidos (Bos, 1989). Sin embargo, en algunos tipos de cáncer su frecuencia es casi del 100%, como en el caso del carcinoma exócrino de páncreas. Las proteínas *Ras* son el prototipo de un grupo de proteínas que unen e hidrolizan nucleótidos de guanina: la familia de las pequeñas GTPasas. Dicha familia se encuentra constituida por proteínas de 20-25 kd con gran homología estructural. La familia de las pequeñas GTPasas está formada por varias subfamilias: *Ras*, *Rho*, *Rab*, *Raf*, *Ran* y *Rad/Gem*. La subfamilia de *Ras* comprende a las proteínas *Ras* (*H-Ras*, *K-Ras* y *N-Ras*), *Rap* (1A,1B,2A y 2B), *R-Ras* (*R-Ras*, *R-Ras2/TC21*, *R-Ras3/M-Ras*), *Ral* (*A* y *B*), *Rheb* y las recientemente descubiertas *Rin* y *Rit* (Reuther y Der, 2000).

Las proteínas *Ras* presentan un amplio grado de conservación en especies muy separadas evolutivamente. De hecho pueden funcionar en sistemas heterólogos, de tal manera que construcciones de *ras* de levadura son capaces de transformar células de ratón NIH3T3, lo que indica un papel clave de éstas proteínas en la actividad celular (Malumbres y Pellicer, 1998). Las células de mamíferos codifican tres genes *ras* funcionales: *H-ras*, *K-ras* y *N-ras*, los cuales se encuentran en distintos cromosomas y muestran una estructura y función muy similar. Se componen de cuatro exones y una región 5' no codificante. Los genes *ras* difieren ampliamente en

el tamaño y secuencia de intrones. Las secuencias genómicas abarcan 3 kb en *H-ras*, 7 kb en *N-ras* y más de 35 kb en el caso de *K-ras*. Estos tres genes tienen promotores característicos de genes constitutivos, con altos contenidos de GC y carecen de caja TATA. La expresión de los tres genes *ras* se mantiene constante en la célula y la regulación de su actividad sucede básicamente por el estado de unión a nucleótidos de guanina (Rebollo y Martínez-A, 1999). Los tres genes *ras* se expresan en todos los órganos y tipo celulares, aunque la expresión de cada gen puede variar en cada tejido, así como su requerimiento durante el desarrollo embrionario. Diversos estudios han demostrado que *H-ras* y *N-ras* no son indispensables en el desarrollo embrionario del ratón; mientras que *K-ras* si parece serlo (Esteban *et al.*, 2001).

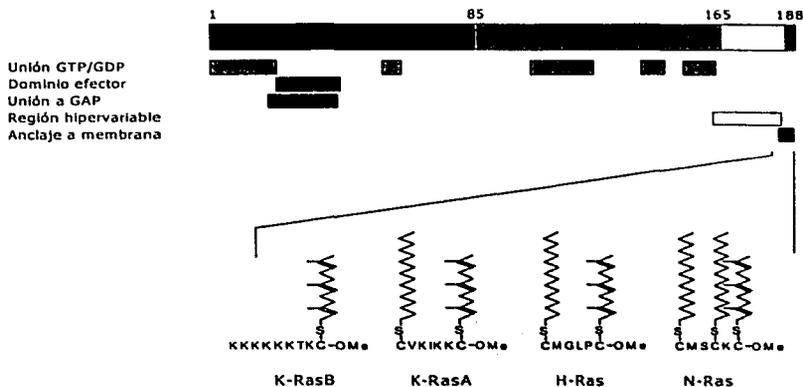


Figura 3. Estructura de las proteínas *Ras*. La región de máxima homología se presenta en los primeros 85 aminoácidos. La región hipervariable corresponde a los últimos 25 aminoácidos de la región carboxilo terminal, al final de la cual se encuentra la secuencia CAAX, donde se presentan modificaciones postraduccionales para el anclaje a la membrana. También se muestra la distribución de los dominios importantes en la actividad de *Ras*.

Los genes *ras* codifican proteínas de aproximadamente 21 kd, que constan de 188 aminoácidos, en el caso de *H-Ras* y *N-Ras*. Por otro lado, *K-Ras* presenta un procesamiento alternativo, dando como resultado dos proteínas isomórficas, *K-RasA* y *K-RasB* de 188 y 189 aminoácidos, respectivamente. Las cuatro proteínas *Ras* presentan un alto grado de identidad en sus secuencias (Fig. 3), la cual es del 100% en los primeros 85 aminoácidos a partir de la región amino terminal. Del aminoácido 86 al 165 estas proteínas presentan una homología del 85%. Sin embargo, a partir del aminoácido 186, las proteínas presentan una gran divergencia excepto en los últimos cuatro aminoácidos, conservando únicamente una homología del 4%. Esta última región comprende el dominio hipervariable y la secuencia CAAX (donde C, cisteína; A, cualquier aminoácido; X, serina o metionina), de gran importancia en la unión de las proteínas *Ras* a la membrana celular (Bar-Sagui, 2000).

La capacidad de unión de *Ras* a nucleótidos de guanina depende de al menos cuatro motivos distribuidos a lo largo de toda la proteína, con excepción de la región hipervariable (Fig. 3). Por otro lado, el dominio a través del cual *Ras* interactúa con sus efectores, corresponde a los aminoácidos 32-40. El dominio efector de *Ras* se sobrelapa con el dominio de unión a las proteínas activadoras de la función GTPasa de *Ras* (GAP).

Las proteínas *Ras* son sintetizadas inicialmente como proteínas citoplásmicas. Sin embargo, para ser funcionales requieren de su localización en la cara interna de la membrana plasmática. El tráfico hacia la membrana y el posterior anclaje a la misma, se debe a modificaciones postraduccionales de la proteína (Fig. 4). La secuencia CAAX determina el reconocimiento de diversas farnesil-transferasas citoplásmicas, que se encargan de catalizar la adición covalente del lípido isoprenoide farnesilo de 15 carbonos en el residuo de cisteína de la secuencia CAAX. A continuación se lleva a cabo la eliminación proteolítica de los residuos AAX y la metilación del recién formado residuo carboxilo terminal de cisteína farnesilado por un grupo de enzimas

asociadas al retículo (Reuther y Der, 2000). Posteriormente, se lleva a cabo la adición de grupo palmítico en los residuos de cisteína de la región hipervariable cercanos al residuo cisteína terminal de H-Ras, N-Ras y K-RasA. En el caso de K-RasB no se lleva a cabo el proceso de palmitonación debido a la ausencia de residuos de cisteína. Sin embargo, K-RasB presenta secuencias ricas en lisina que permiten se complete su localización final en la cara interna de la membrana, donde lleva a cabo su función (Ellis y Crak, 2000).

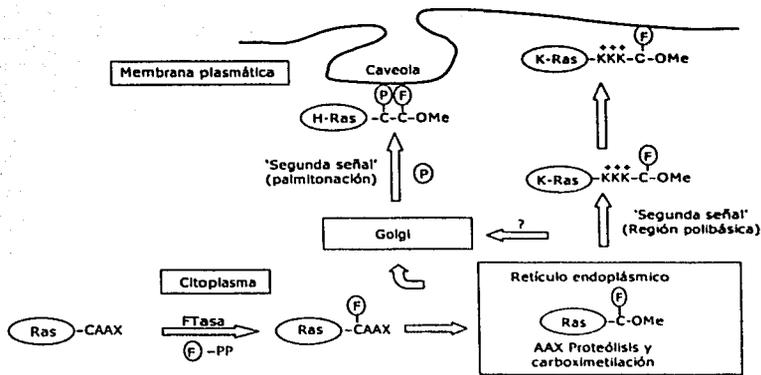


Figura 4. Procesamiento postraduccional y transporte de Ras a la membrana plasmática. Posterior a la síntesis de las proteínas Ras, se lleva a cabo la adición de grupos lipídicos de Farnesilo (F), que proporcionan la primera señal de anclaje a la membrana. Una vez en retículo sucede una degradación proteolítica de los residuos CAAX y una metilación del residuo carboxilo terminal de cisteína. La adición de grupos de palmitilo o la región de polilisinas determina la segunda señal para la completa localización en la cara interna de la membrana. Adaptado de Ruther y Der, 2000.

Regulación de la actividad de Ras

La actividad de Ras está determinada por la unión a nucleótidos de guanina. La forma inactiva de Ras se encuentra unida a GDP, mientras que el estado activo de Ras sucede cuando se encuentra

unido a GTP. Una vez activo *Ras* participa en la transducción de diversas señales de proliferación y diferenciación celular (Rebollo y Martínez-A, 1999) (Fig. 5).

La activación de *Ras* es propiciada por los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF), también conocidos como factores de estimulación de la disociación de GDP (GDS). Estos factores reconocen la forma inactiva de *Ras* unida a GDP y favorecen su disociación al inducir un cambio conformacional en la proteína *Ras*. Una vez libre *Ras* se une a GTP, el cual se encuentra una mayor concentración intracelular que el GDP, quedando de esta manera en su estado activo (Feig, 1994).

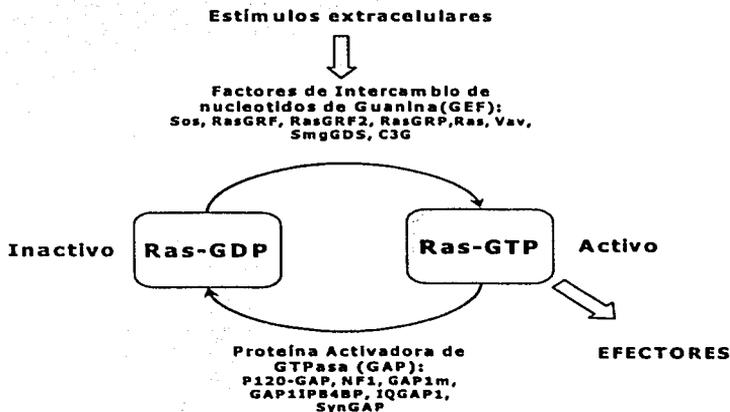


Figura 5. El ciclo de activación de *Ras* fluctúa entre la forma inactiva unida a GDP y la forma activa unida a GTP. La activación es promovida por los Factores de Intercambio de nucleótidos de Guanina (GEF), mientras que la inactivación es facilitada por las Proteínas Activadoras de GTPasa (GAP).

Hasta el momento se han caracterizado diversos factores intercambiadores de nucleótidos de *Ras*: *Sos, RasGRF, RasGRF2, RasGRP, Vav, SmgGDS* y *C3G*. *Sos* es el factor más ampliamente

estudiado, se encuentra relacionado con el producto del gen *Sos* de *Drosophila*, tiene una amplia distribución en todos los tejidos y es del que mejor se conoce su función. Este factor ha permitido la integración de la señalización de factores de crecimiento con la activación de *Ras*. Aunque *Ras* puede ser activado por diversos receptores membranales, el ejemplo más representativo de esta activación es mediante receptores con función de tirosina cinasas. La unión del ligando al Receptor Tirosina Cinasa (TKR) provoca la dimerización del receptor y su autofosforilación en residuos tirosina, localizados en la parte citoplásmica del receptor. Estos sitios fosforilados son reconocidos por la molécula acopladora Grb2, a través del dominio de homología tipo Src2 (SH2). Por otro lado Grb2 se encuentra generalmente acoplado a *Sos*, a través de sus dominios de homología tipo Src3 (SH3), los cuales se pueden unir a la región rica en prolina del dominio carboxilo terminal de *Sos*. En esta forma *Sos* es reclutado a la membrana plasmática a través de Grb2, donde puede llevar a cabo la activación de *Ras* (Fig. 6) (McCormick, 1993; Malumbres y Pellicer, 1998).

Aunque *Sos* es el prototipo de los factores de intercambio de nucleótidos para *Ras*, se han identificado otros factores de intercambio. *RasGRF* se identificó como un homólogo del GEF de *Ras* CDC25 de *Sacharomyces* y se expresa principalmente en cerebro. Recientemente se identificó *RasGRF2*, que también tiene una función de GEF de *Ras* y su regulación está influenciada por calcio. Otro factor de intercambio que recientemente se aisló es *RasGRP*, que se expresa en sistema nervioso y la actividad de este factor parece estar mediada por cambios en diacilglicerol (DAC) y concentraciones de calcio, ligando estas vías con las cascadas moduladas por *Ras* (Ebinu *et al.*, 1998). Por otro lado *SmgGDS* es capaz de catalizar el intercambio de nucleótidos de *K-RasB*, pero no de las otras proteínas *Ras*. En tanto que *Vav*, sólo se expresa en tejido hematopoyético y existe controversia sobre el papel de esta proteína como GEF de *Ras*, pues mientras existen reportes que señalan a *Vav* como un factor de intercambio de nucleótidos de *Ras*, que se activa por receptores de células T, otros trabajos señalan que este factor de intercambio actúa preferentemente sobre *Rac*.

Por otra parte, aunque C3G posee los dominios de homología a CDC25 que poseen los demás GEF de *Ras*, su función es específica para Rap1 y no para *Ras* (Quilliam *et al* 1995).

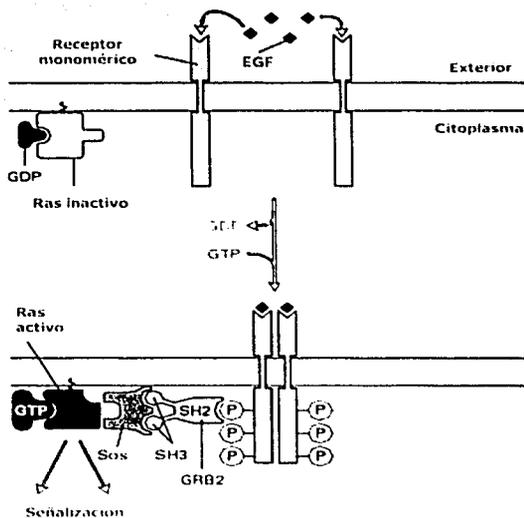


Figura 6. Activación de *Ras* por el factor de crecimiento epidérmico (EGF). La unión del ligando al receptor provoca la dimerización y autofosforilación del receptor. Una vez activo el receptor puede reclutar proteínas acopladoras con dominios SH2, como Grb2, que a su vez pueden unir factores de intercambio de nucleótidos, como Sos, que activan a *Ras*.

Por otra parte la regulación negativa de *Ras* está dada por las proteínas activadoras de GTPasa (GAP). La actividad de GTPasa intrínseca de *Ras* es muy reducida, con lo que la hidrólisis de GTP a GDP se lleva a cabo a una tasa muy baja. Las proteínas GAP sólo reconocen la forma activa de *Ras*, unida a GTP, aumentando en un factor de 10,000 veces la velocidad de hidrólisis del GTP,

promoviendo la formación del estado inactivo de *Ras* unido a GDP (Boguski M y McCormick, 1993).

Se conocen al menos seis proteínas activadoras de GTPasa para *Ras*: p120-GAP, la proteína de neurofibromatosis tipo 1 (NF1), GAP1m, GAP11P4BP, IQGAP1 y SynGAP. Estas proteínas se unen a *Ras* a través del dominio efector de *Ras* (Malumbres y Pellicer, 1998).

Existe un tercer grupo de proteínas que participan en la regulación de proteínas con función de pequeñas GTPasas, los Factores Inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDI), que han mostrado inhibir a los GEF de Rab y Rho. Hasta el momento no se han reportado algún GDI para proteínas *Ras*.

Efectores de *Ras*

El ciclo de activación de *Ras*, le permite actuar como un interruptor molecular, fluctuando entre la forma inactiva unida a GDP y la forma activa unida a GTP, regulando varias rutas de señalización a través de sus efectores. Las vías activadas por *Ras* tienen influencia en varios procesos celulares como la proliferación, la diferenciación e incluso la apoptosis (Downward, 1998). La respuesta de la célula depende de varios factores como son el tipo celular, la duración de la activación de las distintas vías, la influencia de otras vías cooperativas o antagónicas (Frame y Balmain, 2000)

Se han identificado varios efectores de *Ras* y la lista de candidatos continúa creciendo (Fig. 7) (Vojtek y Der, 1998). Estos efectores tienen la característica común de ser capaces de unirse a la forma activada de *Ras*, a través del dominio efector (Fig.3). De los efectores de *Ras* se han identificado a Raf, PI3K, RalGDS, MEKK1, Nore1, Rin1, AF6, GAP, PKC- ξ (Marshall, 1996). La unión de *Ras* con su efector provoca la activación de una cascada de señalización regulada por éste efector.

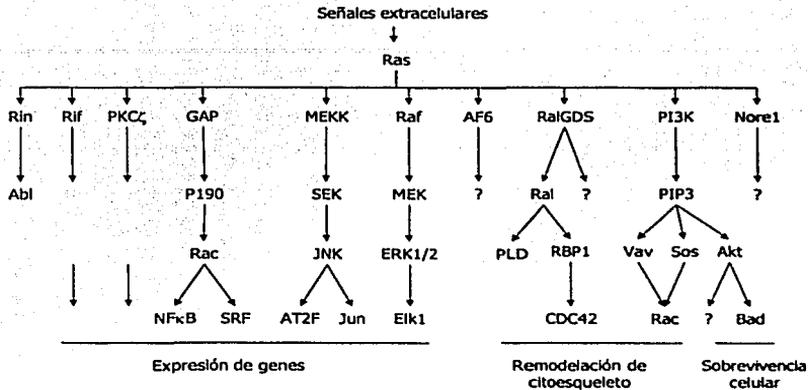


Figura 7. Efectores de *Ras*. La activación de *Ras* influye en varias respuestas celulares, empleando una diversidad creciente de efectores, más allá de las vías clásicas que involucran a Raf y a la PI3K.

Los miembros de la familia de Raf, que son (una vez activos) cinasas específicas serina/treonina, destacan entre los efectores de *Ras* por ser de los mejor caracterizados. *Ras* tiene la capacidad de unirse a Raf y translocarlo a la membrana, donde se lleva a cabo su activación, en la que participan otros factores además de *Ras*. Por otro lado se ha observado que existen diferencias en los mecanismos de activación de los distintos miembros de la familia Raf (Feig y Schaffhausen, 1994; Marais y Marshall, 1996; Campbell *et al.*, 1998). La translocación de B-Raf a la membrana parece ser suficiente para su activación, además de favorecer la activación de Raf-1 (Mizutani *et al.*, 2001). Además se ha señalado que *Ras* puede formar dímeros en la membrana y favorecer la activación de Raf (Inouye *et al.*, 2000). Por otra parte, se ha señalado la participación de otros factores citoplásmicos y a las proteínas 14-3-3 como facilitadoras de la activación de Raf por *Ras* (Rommel y Hafen, 1998). Otra proteína que podría estar involucrada en esta vía es la Cinasa

Supresora de *Ras* (KSR), aunque no se sabe si puede participar como otro efector de *Ras* o como un intermediario de *Ras* y Raf (Katz y McCormick, 1997).

La activación de Raf desencadena una serie de fosforilaciones de los miembros de la vía de las cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK). Raf activado fosforila a la cinasa de MAPK/ERK (MEK), quien a su vez activa a MAPK/ERK. Esta activación provoca su homodimerización y translocación al núcleo, donde puede interactuar, fosforilar y activar varios factores de transcripción como Elk1 y Ets, que regulan la expresión de diversos genes involucrados en la proliferación (Wasyslyk, *et al.*, 1998; Shaeffer y Weber, 1999).

Además de los factores de transcripción, ERK tiene otros sustratos citoplásmicos como RSK2, cPLA2, PHAS-1, con lo que esta vía puede entrelazarse con otras rutas de señalización (Vojtek y Der, 1998), además de que varias otras proteínas, con diferentes funciones celulares han sido involucrados con la vía Raf-MEK-ERK.

Otra vía que ha recibido mucha atención, por la gran cantidad de evidencias que se han generado, es la vía de la cinasa de fosfatidil inositol (PI3K). Esta cinasa es activada por la interacción directa de su subunidad catalítica p110 con la forma activa de *Ras* unida a GTP y, al parecer, sólo se necesita de esta unión para que se lleve a cabo la activación de la PI3K. Esta cinasa provoca la fosforilación del 4,5 bifosfato de Inositol 4,5 (PtdIns[4,5]P2), quedando como 3,4,5 trifosfato de inositol (PtdIns[4,5]P3). Los productos de la PI3K directamente se unen a la cinasa PKB/AKT provocando su translocación a la membrana, posibilitando entonces su activación por otras cinasas y desencadenando varias cascadas de señalización que pueden regular distintas respuestas celulares que incluyen a la síntesis de proteínas, la apoptosis y la diferenciación a través de la fosforilación de varias proteínas como GSK3, p70^{S6K} y Bad (Fig. 6) (Rebollo y Martínez-A, 1999).

Además de las vías de señalización a través de Raf y PI3K, las respuestas celulares que involucran la participación de otros efectores de *Ras* aún no se comprenden del todo, además de que la lista de efectores continúa creciendo. Se ha señalado que las rutas de RalGDS y el entrecruzamiento con la señalización por Rho pueden funcionar como reguladores positivos en la transformación por *Ras*. Otro efector que ha causado controversia son las proteínas activadoras de GTPasa (GAP), que han mostrado una dualidad en cuanto a su función, pues mientras se ha señalado que participa en la regulación negativa de *Ras* (Fig.5), también se ha señalado como efector de *Ras*. El dominio de interacción con GAP se sobrepone al dominio efector (Fig.3) y aún no se conocen los detalles de la interregulación de ambas proteínas (Tocque *et al.*, 1997).

La contribución de otros efectores a la función de *Ras* es menos clara y aún falta por definir la precisa contribución de las vías de señalización de cada efector en la función de *Ras* y cómo es regulada la utilización de los múltiples efectores (Shields *et al.*, 2000).

Ras y ciclo celular

La importancia de *Ras* en la transducción de señales extracelulares le confiere un papel crucial en la regulación de varias respuestas celulares, entre ellas el control de la proliferación, al integrar señales mitogénicas con la progresión a través del ciclo celular.

Desde hace varios años se sabe que *ras* puede inducir la síntesis de DNA en distintos tipos celulares en reposo. Esta evidencia de la participación de *ras* en la transición G1/S del ciclo celular se refuerza por el hecho de que se ha demostrado que *ras* es indispensable para la entrada a la fase S (Takuwa y Takuwa, 1997) y la contribución de sus efectores en la progresión a través de la fase G1 (Gille y Downward, 1999). Otros estudios han señalado que la sobre-expresión de *ras* puede inducir un acortamiento en la fase G1 del ciclo celular (Aktas *et al.*, 1997). Este

acortamiento de G1 y la aceleración de la progresión a la fase S, está asociada a la sobre-expresión de ciclina D, la cual ha mostrado ser inducida por *Ras* (Liu, *et al.*, 1995).

La activación de ciclina D por *ras* parece ser dependiente de la ruta Raf/MEK, a través de las secuencias similares a AP-1 que se encuentran en la región del promotor de ciclina D (Lavoie *et al.*, 1996). En la activación de promotores con secuencias AP-1 se ha demostrado también la participación de la vía de PI3K (Treinies, *et al.*, 1999). La activación de ciclina D, permite una mayor formación del complejo ciclina D/Cdk4-6 que al fosforilar al producto del gen supresor de tumor Rb puede inducir la expresión de genes regulados por E2F (pag. 6-7) y permitir la progresión en el ciclo celular (Fig. 8).

Aunque la aceleración de la progresión de G1 por la activación de ciclina D es uno de los principales efectos de *ras* en el ciclo celular, esta alteración no explica todas las propiedades transformantes de *ras* y de hecho no es suficiente para llevar a cabo la transformación en cultivos primarios, a diferencia de líneas establecidas, lo que puede deberse a la cooperación con otros oncogenes, como lo han demostrado ensayos en los que se muestra un efecto sinérgico entre *ras* y *c-myc* (Lloy *et al.*, 1997).

Diversos reportes han señalado la participación de *ras* en la regulación del ciclo celular en fases distintas al inicio de la fase S, mediante la inducción de ciclina D. Se ha señalado que *Ras* puede inducir, de una manera dependiente de suero, la expresión de ciclina A y E (Fan y Bertino, 1997; Blanchard, 2000). Además diversos trabajos han mostrado la capacidad de Raf para inducir la expresión de estas ciclinas, aunque a un nivel muy bajo. Por otra parte, se ha señalado que la inducción de actividad de los complejos ciclina E-Cdk2 mediada por *ras*, se deben principalmente a la disminución de los niveles de la proteína p27^{Kip1}, pues se ha demostrado que *ras* puede reducir la síntesis y la vida media de p27^{Kip1}. Por otro lado, p27^{Kip1} puede ser fosforilado por MAPK y esta fosforilación disminuye la capacidad de inhibir a Cdk2. También se ha propuesto que los niveles

clevados del complejo ciclina D/Cdk4-6 pueden secuestrar a p27^{Kip1} e impedir su efecto inhibitorio sobre ciclina E-Cdk2 (Cheng *et al.*, 1998). Además el aumento en la actividad de los complejos ciclina/Cdk y la inhibición de p27^{Kip1} son los responsables del crecimiento celular independiente del anclaje, que se sabe puede ser inducido por *ras* (Carstens *et al.*, 1996).

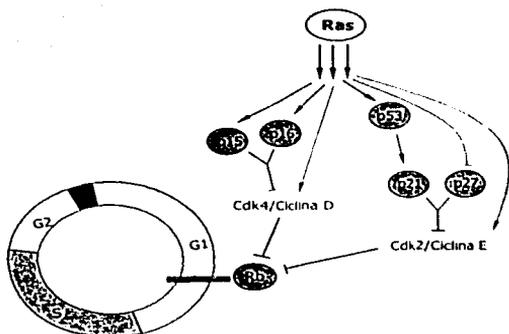


Figura 8. Influencia de *Ras* en el ciclo celular. La señalización por *Ras* influye positivamente en la regulación del ciclo celular promoviendo la actividad de los complejos de cinasas asociadas a ciclinas D y E, que directamente actúan sobre Rb, promoviendo la expresión de genes necesarios para la fase de síntesis. Por otra parte, la señalización de *Ras* puede regular negativamente el ciclo celular a través de p53, p16 y p15.

Un aspecto que podría parecer contradictorio a la función de *ras* en la promoción de la proliferación, es que *ras* puede conducir a un arresto en la fase G2/M del ciclo celular y alteraciones en cultivos primarios similares a la senescencia, a través de la inducción de proteínas inhibitorias como p53, p16^{INK4} y p19^{ARF} (Woods *et al.*, 1997; Serrano *et al.*, 1997). Por otra parte, la sobre-expresión de *ras* puede inducir un arresto en G1 y un aumento en apoptosis, asociados con disminución de los niveles de ciclina D en fibroblastos de rata (Shao *et al.*, 2000).

Al parecer la forma en que *ras* afecta el ciclo celular depende de la integridad de las vías de Rb y p53. *Ras* regula puede regular la expresión de p21^{Cip1}, el cual inhibe a los complejos ciclina

D/Cdk4-6 y ciclina E/Cdk2, impidiendo de esta manera la fosforilación de Rb y la consecuente inhibición en la progresión en el ciclo celular (Fig. 8). La inducción de la expresión de p21^{Cip1} por *Ras* puede ser a través de p53 o de manera dependiente de la vía de Raf. La intensidad y la duración de la señalización por Raf esta relacionada con el tipo de respuesta celular, ya sea la inducción de la proliferación o un arresto en el ciclo celular, pues se ha reportado que niveles elevados de la actividad de Raf inducen la expresión de p21^{Cip1}, lo que lleva a un arresto en ciclo celular, mientras que una actividad baja en la actividad de Raf induce la expresión de ciclina D, con la consiguiente progresión en el ciclo celular (Woods *et al.*, 1997; Sewing *et al.*, 1997).

A pesar de que *Ras* afecta un gran número de proteínas reguladoras, el efecto principal de *Ras* en el ciclo celular parece ser la fosforilación e inactivación de Rb (Frame y Balmain, 2000). Sin embargo, algunos reportes sugieren que *ras* puede emplear una vía alterna para modular la progresión en el ciclo celular (Leone *et al.*, 1997). De hecho, anticuerpos neutralizantes contra *Ras*, no inhiben completamente la replicación del DNA en células de ratones a los cuales se les ha eliminado (knockout) el gen *rb* (Peeper *et al.*, 1997). Por otra parte, el arresto en el ciclo celular inducido por un *rb* mutante constitutivamente activo, puede ser liberado por una coexpresión de *myc* y *ras* (Leone *et al.*, 1997). Estas evidencias sugieren que la ruta de Rb no es la única vía a través de la cual *ras* regula el ciclo celular. Por este motivo, en el presente trabajo se analizó el efecto de la sobre-expresión de *H-ras* en el ciclo celular de células HeLa, donde las funciones de Rb y p53 se encuentran disminuidas por la expresión de proteínas de papilomavirus.

2. OBJETIVOS

General

Analizar la influencia del oncogen *H-ras* en la fase G1 del ciclo celular de células HeLa.

Particulares

- **Determinar si la sobre-expresión del oncogen *H-ras* produce alteraciones en la proliferación en células HeLa.**
- **Evaluar la influencia del oncogen *H-ras* en la duración del ciclo celular de células HeLa.**
- **Analizar la participación de la sobre-expresión del oncogen *H-ras* en la transición G1-S del ciclo celular, en células HeLa.**
- **Determinar la participación de las vías dependientes de *Ras*, PI3K y Raf-MAPK, en la progresión G1-S del ciclo celular de células HeLa**

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Para alcanzar los objetivos establecidos, se diseñó una estrategia experimental que involucró el análisis de las alteraciones en la proliferación celular, mediadas por *H-ras*, así como la progresión a lo largo del ciclo celular, mediante tratamientos con fármacos que producen arrestos transitorios en distintas fases del ciclo celular (Fig. 9).

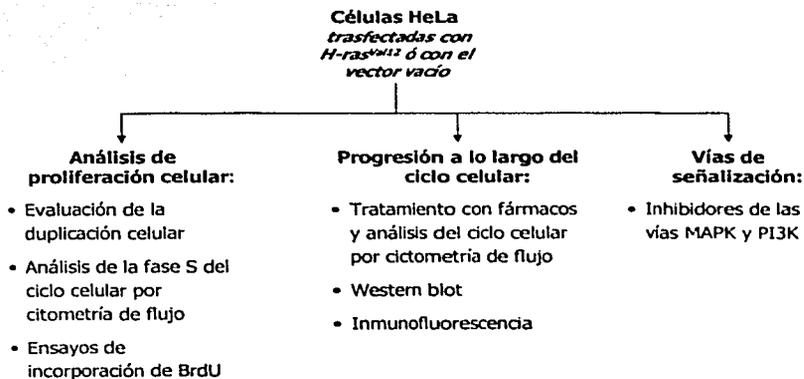


Fig. 9. Esquema general de la estrategia experimental empleada en esta trabajo

Cultivo celular

Se emplearon células HeLa transfectadas establemente con el plásmido SV2neo *H-ras* Val¹², que contiene una versión oncogénica de *ras* (HeLa *ej*), o con el vector vacío SV2neo (HeLa *neo*) (Miranda, *et al.*, 1996). Ambas líneas celulares fueron mantenidas en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal, L-glutaminosa (2mM), penicilina (100 U/ml) y estreptomycinina 100µg/ml, a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO₂. Como factor de selección se utilizó el fármaco G418. Las células fueron sembradas a una concentración de 0.5 y 0.3 X 10⁶ células en cajas petri de 60mm de diámetro para el caso del conteo celular y extracción de proteínas para Western blot y a una concentración de 0.25 x 10⁶ células, en cajas de 35mm de diámetro, para el caso de los ensayos de citometría de flujo.

Conteo celular

Para determinar la tasa de proliferación celular de células HeLa *neo*, así como HeLa *ej*, se sembraron 0.3 x 10⁶ células en cajas petri de 60mm de diámetro y se adicionaron 3ml de DMEM suplementado. Las células se cosecharon a intervalos de 24 horas, utilizando tripsina para desprender las células de la superficie de la caja de petri. El número de células se determinó empleando una cámara de Neubauer y azul de tripano para discriminar entre células vivas y muertas. Cada conteo se realizó por triplicado y se realizaron tres experimentos independientes.

Tratamientos con fármacos.

Los fármacos empleados tienen influencia en el ciclo celular en distintas fases (Fig. 11). Estas propiedades se emplearon para analizar la influencia de *ras* sobre: 1) la llegada a un arresto en mitosis, en el caso de un tratamiento continuo con nocodazole; 2) la salida de un arresto transitorio de la fase S, en el caso del tratamiento con etopósido; 3) la salida de un arresto en la fase G1, producido por un tratamiento continuo con timidina y; 4) la duración de la fase G1 desde la salida de un arresto en mitosis con nocodazole.

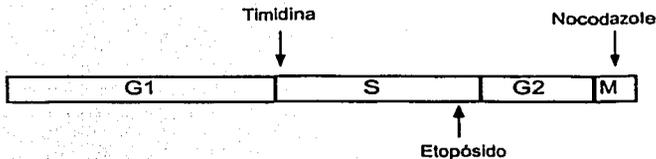


Figura 11. Influencia de los fármacos empleados en las distintas fases del ciclo celular.

Timidina.

La timidina es el fármaco más utilizado en la sincronización de cultivos celulares y se emplea desde mediados del siglo pasado. Un exceso en la concentración de este nucleótido inhibe alostéricamente a la enzima dihidro-orotasa, que participa directamente en la síntesis de nucleótidos de purina, con lo que lleva a un desbalance de citidina que impide que se lleve a cabo la síntesis de DNA, provocando un arresto al final de la fase G1, justo antes de iniciar la fase de síntesis (Fig. 11).

Para arrestar a los cultivos en la fase G1/S del ciclo celular, células en proliferación logarítmica, Hela neo y HeLa ej, recibieron un tratamiento con timidina 2mM (concentración final) durante 24 horas. Posteriormente se retiró la timidina, los cultivos fueron lavados exhaustivamente con PBS y se agregó medio de cultivo DMEM suplementado fresco, para permitir su recuperación y análisis a distintos tiempos.

Nocodazole.

El nocodazole es un fármaco antineoplásico de gran utilidad en el estudio del ciclo celular. Inhibe la polimerización de la tubulina, lo que impide que se forme el huso mitótico provocando un arresto del ciclo celular en metafase.

En el presente trabajo se emplearon tratamientos con nocodazole en dos tipos de ensayo distintos. En el primer tipo de ensayos, los cultivos celulares se incubaron con nocodazole a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, durante los distintos tiempo de duración del ensayo. Al término del periodo de incubación con nocodazole, se determinó el porcentaje de metafases por muestra. En el segundo tipo de ensayos, los cultivos celulares fueron incubados por 24 horas con timidina 2 mM. Posteriormente se lavaron los cultivos celulares con PBS, para eliminar el exceso de timidina y se adicionó medio de cultivo con nocodazole a una concentración de 0.1 $\mu\text{g/ml}$ por 15 horas. Una vez transcurrido este tratamiento, se recuperaron las células desprendidas de la superficie de la caja de petri, las cuales corresponden a las células en mitosis. Estas células fueron lavadas con PBS 5 veces y se sembraron en cajas de petri de 35 mm de diámetro. Se agregó medio suplementado fresco y se cosecharon las células a distintos intervalos de tiempo.

Etopósido.

El fármaco antineoplásico VP16, conocido comúnmente como etopósido, inhibe a la enzima topoisomerasa II, lo que provoca que la síntesis de DNA se vea interrumpida y produzcan daños en el DNA, que provocan un arresto en la fase S y G2 del ciclo celular. Tratamientos prolongados con este fármaco, inducen apoptosis en cultivos celulares.

Para arrestar a las células en la fase G2 del ciclo celular se empleó el fármaco VP16 (etopósido), a una concentración de 10 mM, durante 1 hora. Terminado el tiempo del tratamiento, las células fueron lavadas, para eliminar el etopósido y se agregó medio de cultivo fresco para permitir su recuperación y la consiguiente salida del arresto en G2, el cual fue analizado por citometría de flujo.

Análisis de metafases

Para el análisis de metafase las células fueron cosechadas con tripsina, después de un tratamiento continuo con nocodazole. Las células fueron lavadas con PBS y posteriormente fueron incubadas con

solución hipotónica de KCl 0.075M durante 15 minutos a 37 °C, con la finalidad de romper la membrana plasmática y obtener sólo núcleos. A continuación se centrifugaron a 3000 r.p.m. y el botón celular se resuspendió en el fijador metanol:ácido acético (3:1 v/v) y se almacenaron a -20°C, hasta el momento de llevar a cabo el análisis. Para determinar el índice de metafases, las muestras almacenadas fueron colocadas en portaobjetos mediante goteo a 50 cm de distancia, teñidas con colorante de giemsa durante 2 minutos y analizadas en microscopio óptico. El índice de mitosis se definió como el número de metafases observadas entre el total de núcleos observados. Por cada muestra se analizó un total de 1000 núcleos.

Lisados celulares y Western blot

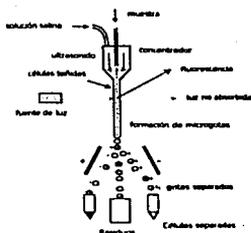
Para la obtención de extractos proteicos, los cultivos celulares fueron lisados con buffer RIPA (1% Nodidet p-40, 0.5% desoxicolato de sodio, 0.1% SDS en PBS pH 7.4) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (1mM PMSF, 1mM ortovanadato de sodio y 2mM fluoruro de sodio). Con la finalidad de aumentar la eficiencia en la ruptura celular, se realizó un lisado mecánico con jeringa de 1 ml. Los lisados celulares así obtenidos fueron incubados durante 30 minutos a 4°C y posteriormente los fueron centrifugados a 14000rpm por 10 minutos a 4°C. Las proteínas totales fueron recuperadas del sobrenadante y se cuantificaron utilizando el Kit *BioRad DC protein assay* (BioRad, Hercules, CA) y se mezclaron con buffer de carga para el posterior corrimiento electroforético. Cantidades similares de proteína se calentaron a ebullición por 5 minutos y se resolvieron en gel de poliacrilamida-SDS, utilizando un amperaje constante de 23 mA por gel. A continuación, las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham, MA), en una cámara de transferencia húmeda. Posteriormente la membrana se bloqueó con una solución de leche libre de grasa al 5% en PBS, por 90 minutos y, una vez bloqueada, se lavó la membrana con PBS-Tween 0.5%, dos veces y se incubó con el anticuerpo policlonal de conejo anti-ciclina B (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) durante toda la noche. Al día siguiente se lavó la membrana con PBS-tween dos veces

y se incubó con un anticuerpo de chivo anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (Zymed, South San Francisco), por 90 minutos, se lavó con PBS-tween 2 veces y dos veces con PBS. Posteriormente se llevó a cabo la visualización de las proteínas empleando el sistema de detección por quimioluminiscencia ECL (Amersham, MA) y exposición a placas XO-Mat (Kodak).

Citometría de flujo

Para determinar las alteraciones producidas por el oncogen *H-ras* en ciclo celular, se empleó la medición individual del contenido de DNA por citometría de flujo. Las células son teñidas con un fluorocromo que se intercala en el DNA, la cantidad de fluorescencia que emite cada célula, cuando es excitada con el láser del citómetro de flujo, es directamente proporcional a la cantidad de DNA que contiene dicha célula (Fig. 11). En una población celular hay células que no han replicado su DNA y la intensidad de emisión de fluorescencia se designa como una unidad arbitraria; estas células corresponden a las células que se encuentran en G1. Por otro lado existen células, en la población celular, que ya han replicado su DNA y cuya intensidad de emisión de fluorescencia corresponde a dos unidades arbitrarias; estas células se encuentran en las fases G2 y M. Finalmente encontramos células cuya intensidad de emisión de fluorescencia se encuentra entre una y dos unidades arbitrarias; estas células corresponden a células en fase S, que han empezado (y no han concluido) la replicación del DNA. El histograma resultante de la población celular con respecto a la cantidad de DNA, se analiza por computadora para determinar la proporción de células que se encuentran en las distintas fases del ciclo celular. El citómetro además nos proporciona otras características, como el tamaño y la granularidad de las células.

A)



B)

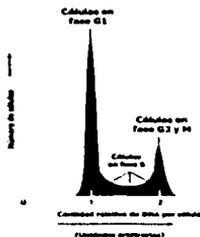


Figura 11. Citometría de flujo. a) Esquema general un citómetro de flujo. Las células teñidas con un fluorocromo son excitadas con un haz láser, produciendo la emisión de fluorescencia, que es captada por detectores para su cuantificación. b) En el presente trabajo se cuantificó el DNA individual de cada célula mediante la fluorescencia emitida después de teñirse con yoduro de propidio b) Análisis del ciclo celular por citometría de flujo. Los fluorocromos empleados en este caso se intercalan en el DNA, la emisión por tanto corresponde a la cantidad de DNA que posee cada célula.

Para el análisis del ciclo celular por citometría de flujo, las células fueron cosechadas con tripsina, lavadas con PBS y fijadas inmediatamente con etanol frío al 80%. Las células fueron almacenadas a -20°C por 24 horas. Posteriormente las células fueron centrifugadas, para eliminar el etanol y el botón celular se resuspendió en 200 μl de solución de tinción (PBS, RNasa 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y yoduro de propidio 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se incubaron durante 60 minutos en oscuridad, a 4°C . Los datos de las poblaciones celulares se adquirieron utilizando un citómetro de flujo FACSsort (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) y el análisis de las fases del ciclo celular se realizó empleando el software CellQuest (BDIS) y ModFit (Verity Software House Topsham, ME).

Inmunofluorescencia

Células HeLa neo y HeLa ej fueron cultivadas sobre cubreobjetos, en cajas de petri de 35 mm de diámetro, en las condiciones correspondientes a cada ensayo. Una vez transcurrido el periodo del

ensayo, las células fueron lavadas dos veces con PBS (después del tratamiento respectivo) y fijadas con metanol:acetona (1:1) a -20°C por 1 minuto. Las células fueron permeabilizadas con tritón X-100 0.25% en PBS y bloqueadas con albumina 1%, durante 1 hora. Posteriormente, las células fueron incubadas por 18 horas con un anticuerpo policlonal de conejo anti-ciclina B (Santa Cruz, CA), seguida de 3 lavados con PBS-Twen 0.5% e incubación con un anticuerpo secundario biotinilado anti-IgG de conejo (Zymed, South San Francisco, CA). Por último, el complejo estreptavidina-fluoresceína fue adicionado y las células fueron visualizadas con un microscopio de epifluorescencia (Leica Diastar).

Incorporación de Bromodesoxiuridina

Los cultivos celulares se incubaron con Bromodesoxiuridina (BrdU) $10\ \mu\text{M}$ a los tiempos indicados y las células fueron cosechadas y fijadas toda la noche con etanol al 80 %, a -20°C . Posteriormente las células fueron incubadas con RNAsa 0.5 mg/ml por 10 minutos a 37°C , seguidas de 30 minutos con paraformaldehído, a temperatura ambiente. Después las células fueron tratadas con HCl 0.1M y tritón X-100 por 10 minutos a 4°C y bloqueadas 1 hora con albúmina al 1%. Posteriormente las células fueron incubadas con un anticuerpo acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) anti-BrdU (Beckton-Dickinson), toda la noche, para posteriormente contrateñirse con yoduro de propidio $10\ \mu\text{g/ml}$ por 1 hora. Las células así teñidas fueron analizadas por citometría de flujo con el citómetro FACSort (Beckton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA).

Tratamiento con inhibidores

Para analizar la participación de las vías de Raf y PI3K, las células fueron sincronizadas en mitosis mediante un doble bloqueo con timidina 2mM por 15 horas, seguido de un tratamiento con nocodazole $0.1\ \mu\text{g/ml}$ por 15 horas. Dos horas después se llevó a cabo el tratamiento con inhibidores, en el caso de la inhibición de la vía de Raf se agregó a los cultivos celulares PD098059 (Sigma, St. Louis, MO), un inhibidor específico de MEK, a una concentración final de $50\ \mu\text{M}$ de. Para la inhibición de la

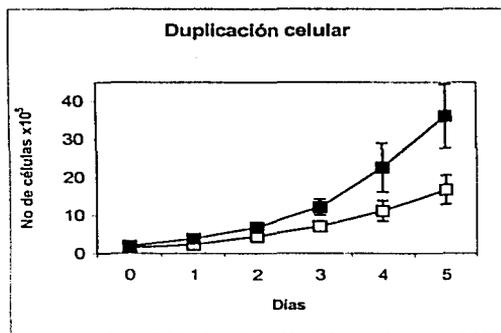
PI3K se adicionó un inhibidor específico de esta enzima, la wortmanina, a una concentración final de 50 nM (Sigma, St. Louis, MO), cada 3 horas. Posteriormente las células fueron cosechadas y fijadas con etanol al 80%, a los tiempos indicados. Las muestras fueron tratadas con 100µg/ml RNAsa A y teñidas con 50 µg/ml yoduro de propidio y analizadas por citometría de flujo.

4.RESULTADOS

Efecto de la sobre-expresión de *H-ras* en la proliferación de células *HeLa*

Duplicación celular

En los ensayos de proliferación celular, se cultivaron células transfectadas con el oncogen *H-ras* (HeLa ej), así como con el vector vacío (HeLa neo), bajo las mismas condiciones. En la figura 12 se muestra la gráfica y la tabla de los resultados de estos ensayos. En ambos casos se observó un crecimiento de tipo exponencial; sin embargo las células establemente HeLa ej presentan una proliferación más acelerada, con diferencias significativas en el tamaño de las poblaciones celulares, a partir de las 72 horas. Estos resultados fueron consistentes en tres ensayos independientes. Estos datos sugieren que aún en ausencia de Rb, el oncogen *H-ras* es capaz de producir un aumento en la proliferación celular.



Tiempo (hrs)	Células × 10 ⁵	
	HeLa neo	HeLa ej (<i>H-ras</i>)
0	1.5	1.5
12	1.52	1.98
24	4.48	3.86
48	7.13	6.85
72	11.2	12.18
94	11.2	22.56
120	16.7	36.36

Figura 12. Efecto de *Ras* en la proliferación celular en células HeLa. Las células HeLa ej presentan una mayor proliferación (■) que las células HeLa neo (□). La gráfica y la tabla muestran los promedios de los resultados de tres ensayos independientes.

Citometría de flujo

Para verificar que el aumento en la tasa de proliferación producido por *H-ras* se debe un aumento en la proporción de células en fase de síntesis, se analizaron, por citometría de flujo, las poblaciones en las distintas fases del ciclo celular. Células HeLa neo y HeLa ej, de cultivos asincrónicos en proliferación, fueron cosechadas, fijadas y teñidas para el análisis del contenido individual de DNA, por citometría de flujo. En estos ensayos se encontró que las células HeLa ej, presentan un porcentaje mayor de células en fase S (28.2%), en comparación con las células que no sobre-expresan este oncogen, HeLa neo (21.5%) como puede verse en los histogramas de la figura 13.

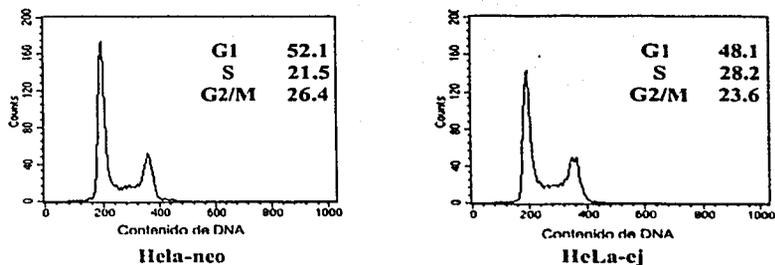


Figura 13. Histograma de la citometría de flujo de cultivos asincrónicos de células HeLa neo y HeLa ej. Las células HeLa ej, presentan un mayor número de células en fase S, que las células HeLa neo. Las gráficas muestran un experimento representativo para cada línea celular, de tres ensayos realizados independientemente.

Incorporación de Bromodesoxiuridina

Con la finalidad de evaluar el efecto de *H-ras* en la tasa de síntesis de DNA en células HeLa, se realizaron ensayos de incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU). La BrdU es un análogo de timidina que se incorpora al DNA durante la replicación. Esto nos permite analizar la tasa de síntesis de DNA al determinar la cantidad de BrdU incorporada en un cultivo celular, mediante inmunodetección de la BrdU por citometría de flujo. En la figura 14 se muestran los

resultados de estos ensayos, en los que se puede observar que las células HeLa ej incorporan más BrdU que las células control, lo que implica que *H-ras* induce una mayor síntesis de DNA en células HeLa, aún en ausencia de Rb. De esta manera *H-ras* es capaz de aumentar la tasa de proliferación de células HeLa por un aumento en la velocidad de síntesis de DNA.

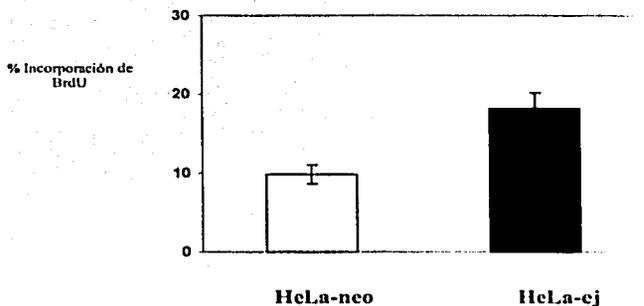


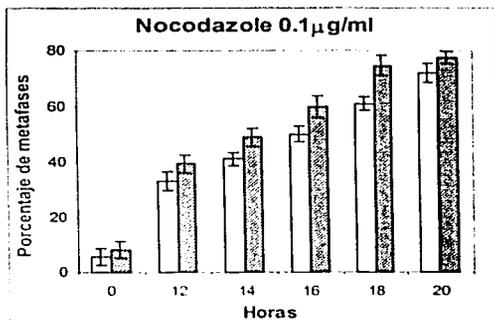
Figura 14. Influencia de *H-ras* en la síntesis de DNA de células HeLa. Las células HeLa ej (■), incorporan mayor BrdU que las células transfectadas HeLa neo (□). Las gráficas muestran los promedios de tres experimentos independientes \pm la desviación estándar.

Efecto de la sobre-expresión de H-ras en la progresión del ciclo celular en células HeLa

Para determinar la influencia de *H-ras*, en la duración del ciclo celular, se analizó la respuesta de células HeLa neo y HeLa ej a tratamientos con fármacos que causan un arresto en distintas fases del ciclo celular.

Efecto de la sobre-expresión *H-ras* en la llegada a un arresto en la fase G2/M del ciclo celular, inducido con nocodazole

Para analizar el efecto de *Ras* sobre la llegada a un arresto celular en la fase de mitosis inducido por un tratamiento continuo con nocodazole, se analizaron los porcentajes de metafases de metafase de células HeLa neo y HeLa *ej* a lo largo de un tratamiento de 0.1 μ g/ml de nocodazole a distintos tiempos, como se describió en material y métodos. A lo largo del experimento las células con *H-ras* siempre presentaron un mayor porcentaje de metafase, siendo ésta más evidente a partir de las 14 horas. La mayor cantidad de metafases de las células HeLa *ej* implica una mayor rapidez para la llegada a esta fase del ciclo celular, que involucra un acortamiento en el ciclo. A las 20 horas, la diferencia disminuye y prácticamente un 80% de ambos cultivos celulares se encuentran en metafase, al tratarse de un arresto continuo mediante este tratamiento.



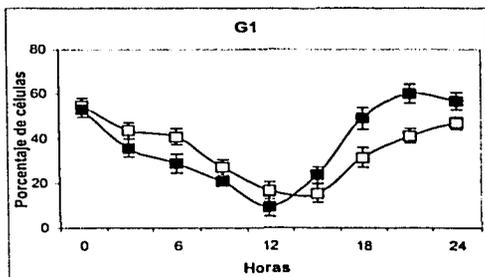
Tiempo (hrs)	Células $\times 10^5$	
	HeLa neo	HeLa <i>ej</i> (<i>H-ras</i>)
0	5.6	8.3
12	33.2	39.4
14	41.1	48.9
16	50.1	59.9
18	60.7	74.6
20	71.7	77.4

Figura 15. Efecto de *Ras* sobre el arresto en mitosis por tratamiento con nocodazole. Las células HeLa *ej* (▨), llegan primero al arresto en metafase, en comparación con las HeLa neo (□). Las gráficas y la tabla muestran los promedios \pm la desviación estándar, de los resultados de tres experimentos independientes.

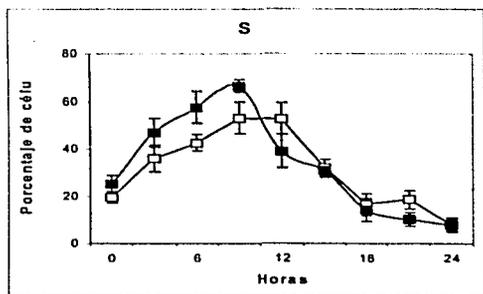
Efecto de la sobre-expresión de H-ras sobre un arresto transitorio inducido por tratamiento con etopósido 10 μ M durante una hora

Para corroborar que *H-ras*, produce un acortamiento en el ciclo celular de células HeLa, se analizó el efecto de *H-ras* sobre el arresto transitorio, inducido por etopósido. Las células recibieron un tratamiento con etopósido 10 μ M por una hora y se analizaron por citometría de flujo, a distintos tiempos después de haberse retirado el etopósido. En la figura 16 puede observarse que las células HeLa neo y HeLa ej comienzan con valores similares. Al lo largo del experimento las células transfectadas con *H-ras* avanzan primero en el ciclo celular, como puede verse por una disminución de la fase G1 y un enriquecimiento de la fase S. Las células control siguen un patrón retrasado en el avance en ciclo celular, siendo estas diferencias más evidentes en el punto de entrada y duración de la fase S. Las células con *ras* inician la fase de síntesis de DNA alrededor de las 3 horas posteriores al tratamiento, con punto de máxima cantidad de células en esta fase a las 9 horas. En contraste las células control tardan más en salir de la fase G1, así la fase S inicia más tarde, teniendo una mayor cantidad de células en esta fase entre las 9 y 12 horas posteriores al tratamiento. En la salida de la fase S las diferencias parecen menos evidentes, sin embargo en la gráfica de G2/M se observa claramente que el enriquecimiento de esta fase se encuentra adelantado en las células con *ras* en comparación con las células control, como puede verse en los puntos de máximo enriquecimiento de esta fase. A estos tiempos, las células comienzan a perder la sincronización y la salida de esta fase ya no sigue el patrón observado previamente.

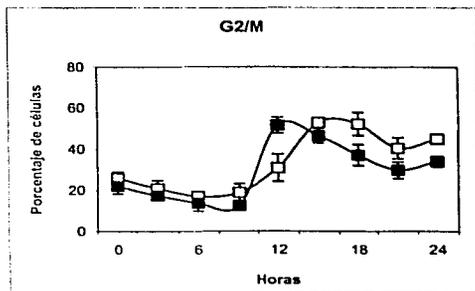
Los resultados mostrados en las figuras 15 y 16 señalan la existencia de un acortamiento en el ciclo celular. El arresto inducido por nocodazole y etopósido ocurre en fases tardías del ciclo celular (G2 y M) y la llegada a estos arrestos ocurre más temprano en células HeLa ej, esto sugiere el acortamiento en el ciclo celular ocurre en fases iniciales del ciclo celular (G1 ó S).



G1 Tiempo (hrs)	% de células \pm sd	
	HeLa neo	HeLa ej (<i>H-ras</i>)
0	54.6 \pm 3.2	52.9 \pm 3.4
3	43.4 \pm 3.5	35.7 \pm 4
6	40.7 \pm 3.6	28.7 \pm 4.2
9	27.1 \pm 3.5	20.7 \pm 1.6
12	16.5 \pm 4	9.4 \pm 4.4
15	15.4 \pm 3.9	23.5 \pm 3.7
18	31.4 \pm 4.5	48.9 \pm 4.8
21	41.2 \pm 3.2	60 \pm 4.3
24	46.8 \pm 2.8	56.79 \pm 3.8



S Tiempo (hrs)	% de células \pm sd	
	HeLa neo	HeLa ej (<i>H-ras</i>)
0	19.5 \pm 2.4	25.2 \pm 3.6
3	35.9 \pm 5.6	46.9 \pm 6.2
6	42.6 \pm 3.3	57.5 \pm 6.7
9	53.1 \pm 6.5	66.4 \pm 2.6
12	52.6 \pm 6.7	38.9 \pm 7.04
15	31.8 \pm 3.7	30.7 \pm 2.8
18	16.4 \pm 4.6	14.1 \pm 4.7
21	18.4 \pm 3.8	10 \pm 2.8
24	8.1 \pm 2.9	7.8 \pm 2.9



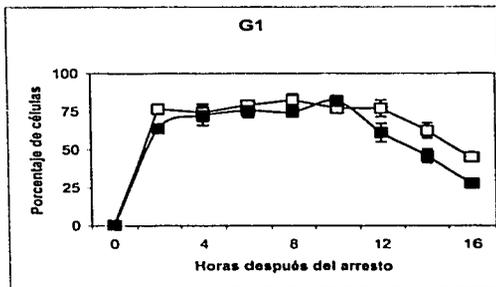
G2 Tiempo (hr)	% células en G2/M	
	HeLa neo	HeLa ej (<i>H-ras</i>)
0	25.9 \pm 3.04	21.9 \pm 3.6
3	20.8 \pm 3.9	17.34 \pm 2.4
6	17.1 \pm 2.4	13.8 \pm 3.8
9	19.1 \pm 4.2	12.8 \pm 2.1
12	30.8 \pm 6.6	51.5 \pm 3.8
15	52.9 \pm 2.3	46.4 \pm 3.5
18	52.2 \pm 5.6	37.1 \pm 5.1
21	40.4 \pm 5.1	29.7 \pm 4
24	44.86 \pm 2.4	33.9 \pm 2.5

Figura 16. Efecto de *H-ras* en la salida de un arresto transitorio en G2. Células HeLa neo y HeLa ej fueron tratadas con etopósido 10 μ M por una hora. El arresto inducido por este tratamiento fue analizado por citometría de flujo. Las células HeLa ej llegan primero al arresto transitorio en G2, comparadas con las células HeLa neo. Las gráficas y las tablas muestran los promedios \pm la desviación estándar de los resultados de tres experimentos independientes.

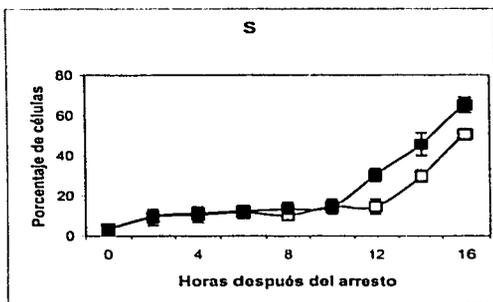
Efecto de H-ras en la duración de la fase G1 del ciclo celular

Para analizar la influencia de *H-ras* específicamente en la fase G1 del ciclo celular de células HeLa, los cultivos de células HeLa neo y HeLa ej fueron arrestados en fase de mitosis con tratamiento con timidina y nocodazole, se liberaron del arresto y se analizaron por citometría de flujo, a distintos tiempos posteriores al tratamiento. Como puede observarse en la figura 17, al término del tratamiento, tanto las células HeLa neo como HeLa ej se encuentran arrestadas en metafase por la inhibición de microtúbulos por el nocodazole. En la gráfica se observa la duración de la fase G1 del ciclo celular de las células HeLa y la alteración por la sobre-expresión de *H-ras*. Puede observarse que ambas líneas celulares salen del arresto en mitosis en cuanto es retirado el nocodazole y en ambos casos inician la fase G1 2 horas después de la salida del arresto. Sin embargo en las células que HeLa ej, la fase G1 concluye 2 horas antes (a las 12 horas), en comparación con las células HeLa neo, cuya salida de esta fase inicia dos horas después. Este desfasamiento continúa durante la fase S y a las 16 horas las células HeLa ej se encuentran en el punto máximo de esta fase, mientras que las células control siguen retrasadas. La consistencia de los resultados en tres experimentos separados demuestra que el oncogen *ras* provoca un acortamiento de fase G1 en el ciclo celular de células HeLa.

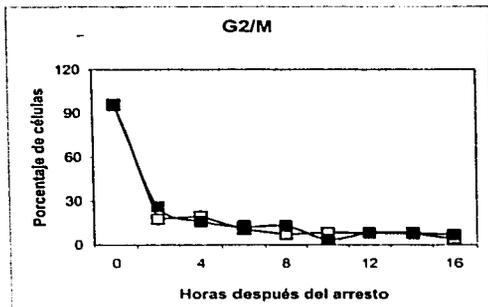
Para corroborar que el efecto de *H-ras* sólo se encuentra en la fase G1, se determinaron los niveles de ciclina B (un regulador del ciclo celular en la fase de mitosis), en células HeLa liberadas de un arresto en mitosis por un tratamiento con timidina y nocodazole. Las células se cosecharon 15, 18 y 21 horas después del tratamiento, en los cuales las células se encuentran en fase S y G2/M (Fig. 17). Las células se lisaron y se realizó un ensayo de Western blot con los extractos celulares obtenidos. En la figura 18a se observa que el patrón de expresión



Tiempo (hrs)	% células ± sd	
	Neo	Ej
0	0.45 ± 0.04	0.4 ± 0.04
2	76.6 ± 3.3	63.9 ± 2.8
4	74.27 ± 5.85	72.4 ± 6.4
6	79.1 ± 2.92	75.5 ± 4.5
8	82.6 ± 3.95	74.7 ± 3.2
10	77.1 ± 3.3	81.8 ± 3.6
12	77.1 ± 5.41	61.2 ± 6
14	62.5 ± 4.9	45.9 ± 4.5
16	45.1 ± 2.3	27.9 ± 2.3



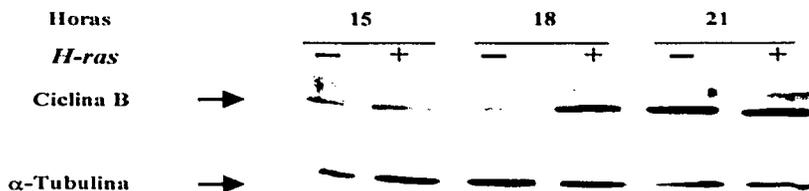
Tiempo (hrs)	% células ± sd	
	Neo	Ej
0	3.45 ± 2.6	3.8 ± 1.86
2	9.2 ± 4	9.8 ± 3.4
4	10.5 ± 3.6	11.4 ± 3.1
6	11.7 ± 2.9	12.4 ± 2.8
8	10.3 ± 2.4	13.4 ± 3.4
10	14.6 ± 3.6	14.5 ± 2.9
12	14.7 ± 3.7	30.4 ± 3.2
14	29.8 ± 3	45.7 ± 5.6
16	50.6 ± 2.7	65.2 ± 3.7



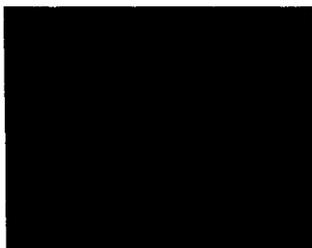
Tiempo (hrs)	% células ± sd	
	HeLa neo	HeLa ej
0	96.1 ± 2.2	95.8 ± 3.9
2	17.6 ± 3.6	26.3 ± 2.6
4	19.6 ± 3.8	16.2 ± 3.8
6	10.4 ± 2.9	12.1 ± 4.4
8	7.3 ± 2.7	12.9 ± 3.5
10	8.3 ± 3.5	3.7 ± 2.7
12	8.2 ± 2.6	8.4 ± 2.9
14	7.7 ± 3.1	8.4 ± 2.6
16	4.3 ± 1.4	6.9 ± 2.1

Figura 17. Efecto de *H-Ras* en la duración de la fase G1 del ciclo celular de células HeLa. Las células HeLa neo y HeLa ej recibieron un tratamiento timidina-nocodazole, que produce un arresto en la fase de mitosis. Después de la liberación del arresto puede verse, en el análisis por citometría de flujo, que las HeLa ej (■), presentan una fase G1 más corta, comparadas con las células HeLa neo (□).

de la ciclina B, en ambos tipos celulares es normal, sin embargo las células HeLa ej muestran un aumento en la expresión de ciclina B a tiempos menores que las células HeLa neo, debido al desfase ocasionado por la reducción de G1 de las células HeLa ej. Por otra parte, el desfaseamiento en el ciclo celular por la sobre-expresión de *H-ras* no sólo implica una expresión más temprana de ciclina B, sino que además la ciclina B se encuentra activa. En la inmunofluorescencia mostrada en figura 18b puede observarse una mayor translocación al núcleo de la ciclina B en las células HeLa ej, comparadas con las células HeLa neo, 18 horas después de un tratamiento con timidina y nocodazole.



B)



HeLa-neo

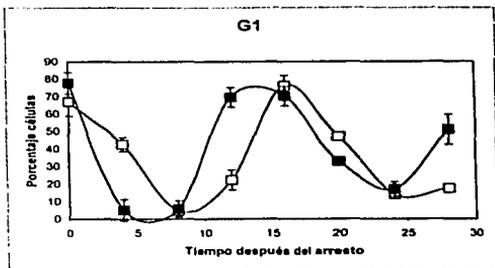


HeLa-ej

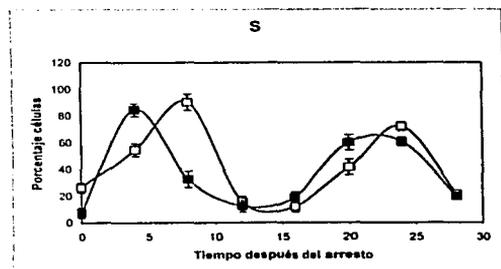
Figura 18. Efecto de *H-ras* sobre la actividad de reguladores tardíos del ciclo celular en células HeLa. a) Western blot contra ciclina B de cultivos celulares a distintos tiempos después de la liberación de un arresto en mitosis por tratamiento con timidina y nocodazole. Puede observarse una expresión más temprana de ciclina B en las células HeLa ej, comparadas con la línea parental, HeLa neo. b) Detección por inmunofluorescencia de la ciclina B 18 horas después de la liberación de un arresto por el mismo tratamiento que en a).

Efecto de H-ras en la progresión G1-S del ciclo celular en células HeLa

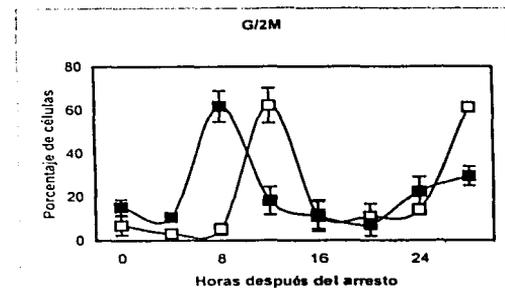
Un exceso en la concentración de timidina puede provocar un arresto en la fase G1 del ciclo celular. Por tal motivo las células HeLa neo y HeLa ej fueron tratadas con un exceso de timidina durante 24 horas, se lavaron para eliminar el exceso del fármaco y fueron evaluadas por citometría de flujo para analizar la salida del arresto en G1. Los porcentajes de las poblaciones celulares en las distintas fases del ciclo celular, en las horas posteriores a la liberación del arresto con timidina, se muestran en la figura 19. En ambos tipos celulares se observa que después del tratamiento con timidina se encuentran arrestados en fase G1. Sin embargo las células HeLa Ej salen primero del arresto y ésta diferencia es muy evidente en el punto de máximo enriquecimiento de la fase S, continuando el desfaseamiento en la fase G2/M. El desfaseamiento, de aproximadamente 3 horas en la salida del arresto, se mantiene constante en las fases tardías del ciclo celular, lo que podría indicar que las alteraciones al ciclo celular por la sobre-expresión de *ras* en células HeLa se encuentran únicamente en la transición G1/S y no en otras fases del ciclo celular. Por otro lado, en la figura 20 se muestra la salida del arresto (gráficas de densidad de puntos) de un experimento representativo. El enriquecimiento de la población celular hacia la fase de síntesis se observa primero en las células HeLa ej, comparado con las células HeLa neo. Este desfaseamiento es sobre todo notable a las 2 horas de la liberación del arresto y hacia las 8 horas puede observarse que la población celular de HeLa ej se encuentran claramente en G2 mientras que las células HeLa neo continúan en S.



G1 Tiempo (hrs)	% células \pm sd	
	HeLa neo	HeLa ej
0	66.9 \pm 8.2	77.6 \pm 4.5
4	42.45 \pm 4	5.1 \pm 6.1
8	4.62 \pm 2.48	5.79 \pm 4.56
12	22.27 \pm 5.67	69.54 \pm 5.6
16	76.14 \pm 5.83	70.12 \pm 5.55
20	47 \pm 2.17	32.7 \pm 1.68
24	13.88 \pm 1.34	16.96 \pm 4.05
28	17.41 \pm 2.1	50.97 \pm 8.58



S Tiempo (hrs)	% células \pm sd	
	HeLa neo	HeLa ej
0	26.2 \pm 3.8	7.3 \pm 6.1
4	54.45 \pm 4.7	84.47 \pm 6.61
8	90.14 \pm 6.1	32.45 \pm 4.11
12	15.62 \pm 4.25	12.4 \pm 2.56
16	12.05 \pm 4.1	19.04 \pm 5.49
20	41.46 \pm 5.7	59.9 \pm 5.29
24	72.15 \pm 3.27	60.77 \pm 3.77
28	21.34 \pm 2.1	19.6 \pm 7.16



G2M Tiempo (hrs)	% células \pm sd	
	HeLa neo	HeLa ej
0	6.8 \pm 4.4	15.1 \pm 3.5
4	3.09 \pm 0.87	10.51 \pm 0.56
8	5.24 \pm 2.63	61.76 \pm 7.13
12	62.11 \pm 8.01	18.06 \pm 6.40
16	11.78 \pm 6.51	10.90 \pm 6.77
20	10.74 \pm 5.79	7.30 \pm 5.39
24	13.97 \pm 2.45	22.25 \pm 6.82
28	61.25 \pm 2.18	29.42 \pm 4.42

Figura 19. Influencia de *H-ras* en la salida de un arresto en fase G1. Las células fueron tratadas con timidina 2mM por 24 horas, para inducir el arresto G1 y posteriormente fueron lavadas para liberarlas de tal arresto. Las células HeLa ej (■), salen más rápido del arresto y comienzan a sintetizar DNA arroximadamente 4 horas antes que las células control, HeLa neo (□).

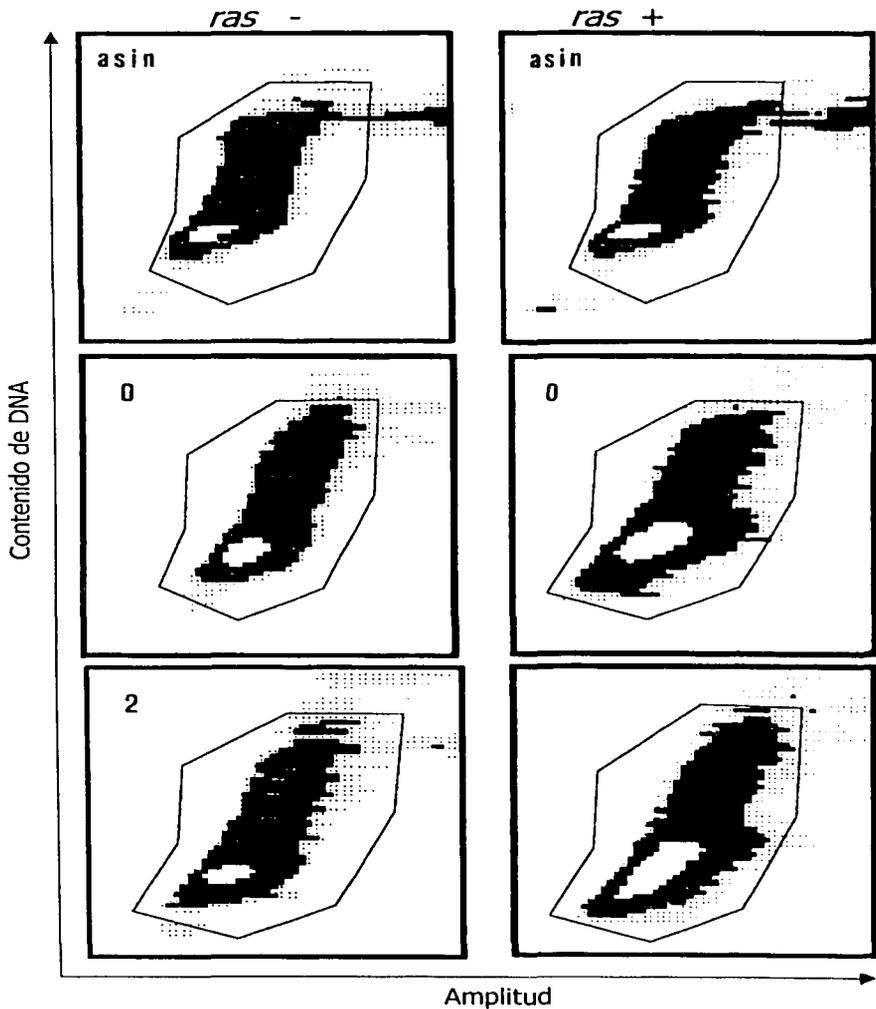


Figura 20. Gráfica de densidad de puntos de la liberación de un arresto en G1 por tratamiento prolongado con un exceso de timidina. Se observa claramente que las células HeLa ej avanzan primero en la progresión hacia la fase S.

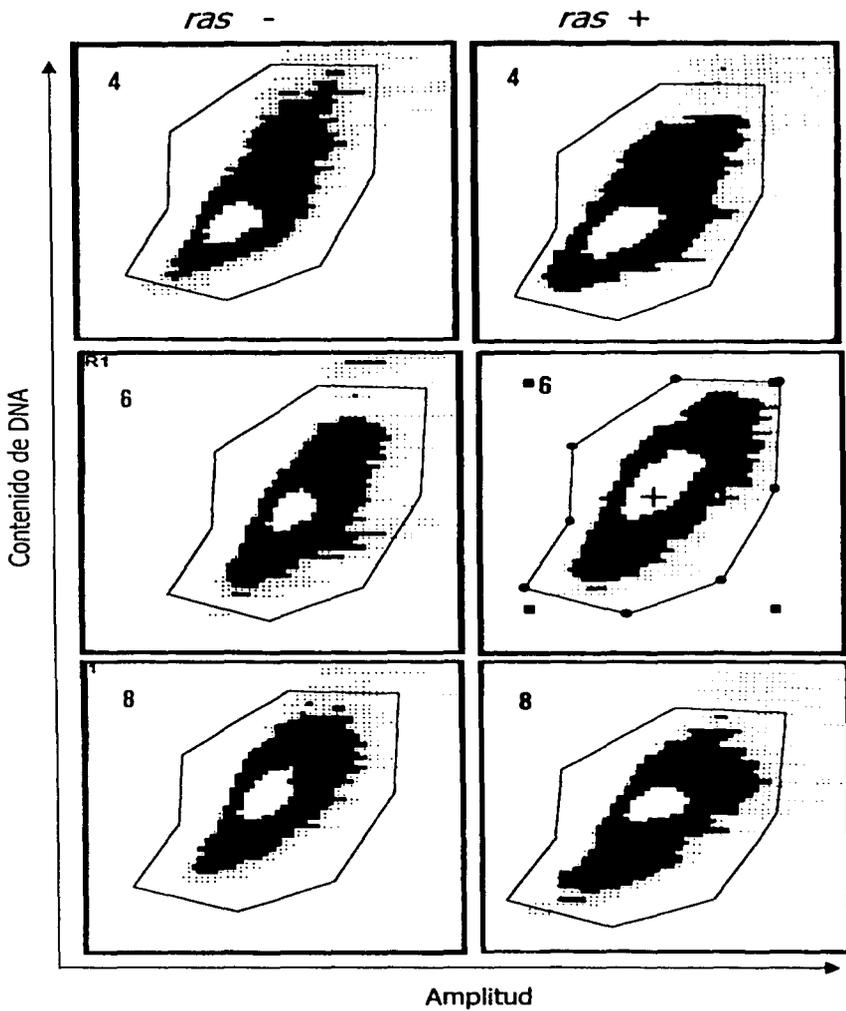


Figura 20. *Continuación*

Participación de las vías de Raf y PI3K en el efecto de H-ras sobre el ciclo celular de células HeLa

La influencia de *ras* sobre el ciclo celular se ha asociado con la señalización con los efectores Raf y PI3K, que son activadas por *Ras*. Para analizar la participación de éstas vías en el acortamiento de la fase G1 observado en células HeLa, se emplearon inhibidores específicos de estas vías. Los cultivos celulares fueron arrestados en mitosis mediante doble tratamiento con timidina y nocodazole para posteriormente ser liberadas del arresto y se analizaron por citometría de flujo. Como se observó previamente, después de aproximadamente 10 horas de la liberación del arresto por este tipo de tratamiento, las células que se encuentran en G1 comienzan a progresar hacia la fase S, avanzando primero las células HeLa ej (Fig. 17). Por lo tanto se analizó el efecto de los inhibidores en el periodo que ocurre este desfasamiento, entre 12 y 18 horas para el caso de la inhibición de la vía de Raf y a 16 horas para la vía de PI3K. En la figura 21 puede observarse que la inhibición de la cascada de Raf, por PD098059 (un inhibidor de la actividad de MEK), no abate la disminución de la duración de la fase G1 en células HeLa ej (reducción más rápida de esta fase a estos tiempos). De la misma manera la inhibición de la actividad de la PI3K, con wortmanina, no altera el efecto de *H-ras* en la reducción de la duración de la fase G1. Estos dos resultados muestran que las cascadas de Raf y PI3K, no participan en el efecto observado por la sobre-expresión de *H-ras*, en el ciclo celular de células HeLa.

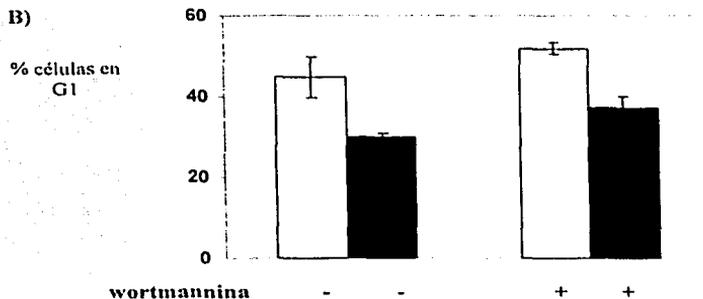
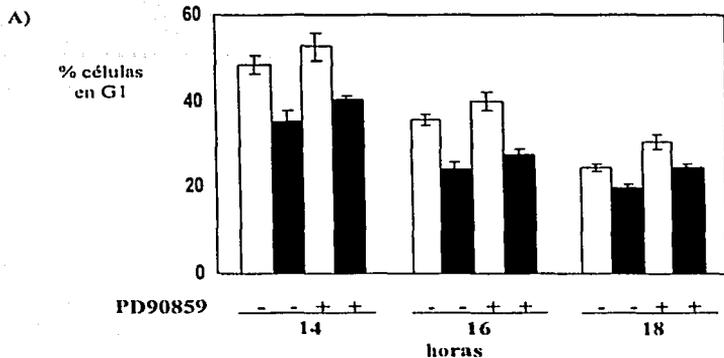


Figura 21. Participación de las vías de Raf y PI3K en la reducción de la duración de la fase G1 por *H-ras*. La inhibición de MEK (un efector de Raf) con PD90859 o la inhibición de PI3K con wortmannina no alteran la disminución de la fase G1 en células HeLa ej (■), comparada con los cultivos control, sin tratamiento (□). Las cascadas de señalización de PI3K y Raf no participan en la reducción de la fase G1, por la sobre-expresión de *H-ras*

5. DISCUSIÓN

Ras es una de las moléculas más importantes en la transducción de señales. Su participación es crucial en la integración de señales extracelulares y la promoción de la proliferación es una de las respuestas en las que más destaca, pues mutaciones en el gen *ras* son muy frecuentes en tumores malignos.

Desde hace algunos años se ha relacionado la capacidad de *Ras* para promover la proliferación, con el estado funcional de p53 y Rb. La activación de *Ras* puede promover la actividad de p53 e inducir fenotipos similares al de senescencia en cultivos primarios (Serrano *et al.*, 1997). Por otra parte, se ha propuesto como principal vía de participación de *Ras*, en la modulación de la maquinaria que regula el ciclo celular, aquella que involucra la inactivación de Rb, mediante la estimulación de la actividad de la ciclina D. Sin embargo existen múltiples evidencias que señalan que la participación de *Ras* en la regulación del ciclo celular podría ser mucho más compleja y que la vía de Rb parecería no explicar todos los aspectos de la regulación del ciclo celular por *Ras* (Downward 1997). Se ha demostrado que en fibroblastos de ratón, la actividad de *Ras* es necesaria para la progresión en el ciclo celular únicamente en presencia de Rb; aunque la salida de G0 por *Ras* se efectúa por una vía independiente de Rb (Pepper *et al.*, 1997).

En el presente trabajo se demostró que la sobre-expresión de *H-ras* induce una mayor proliferación en células HeLa, ya que los resultados señalan que la sobre-expresión de *H-ras* induce una duplicación celular más rápida, una proporción mayor de células en fase S, así como una mayor tasa de síntesis de DNA, en células HeLa (Fig. 12, 13 y 14). Este aumento en la proliferación se debe a un acortamiento en la duración del ciclo celular, ya que al emplear

tratamientos con fármaco para inducir arresto en fase de mitosis, el enriquecimiento en la población celular esta fase del arresto se lleva a cabo primero en las células que sobre-expresan *H-ras*, comparado con las células control (Fig. 15). De igual manera, en tratamientos para inducir arrestos transitorios, las células que sobre-expresan *H-ras* avanzan primero en la salida de tales arrestos (Fig. 16). Varios autores han señalado la existencia de diversas alteraciones en la duración del ciclo celular debido a la activación de *H-ras*, principalmente en la transición G1-S (Durkit y Whitfield, 1986; Filmus *et al*, 1994; Liu *et al* 1995). Sin embargo esta reducción en la duración del ciclo celular se debe principalmente a la activación de ciclina D, que se sabe es inducida por *Ras*, por lo que el blanco principal en la reducción del ciclo celular en este caso, es la inactivación de Rb (Liu *et al*, 1995; Hitomy y Stacey 1999; Villalonga *et al*, 2000). En el presente trabajo se determinó que que la sobre-expresión de *H-ras* es capaz de inducir, en células HeLa, una reducción en el ciclo celular por un acortamiento en la duración de la fase G1 (Fig. 17). Debido a que en células HeLa la actividad de Rb se encuentra disminuida por la presencia de la proteína E7 de papilomavirus, estos resultados sugieren que *Ras* puede emplear rutas independientes de Rb, para la transición a través de G1, y no sólo para la salida de G0, como se había señalado previamente (Pepper *et al*, 1997). Existen reportes que señalan que pueden existir vías alternas para la regulación de la entrada a la fase S, en la que participa *Ras*, independientemente de Rb (Leone *et al*, 1997). La sobre-expresión de *myc* y *ras* puede inducir la entrada a la fase S, en células con mutantes de Rb que no pueden ser fosforiladas, por lo que permanecen constitutivamente activas, reprimiendo la expresión de genes regulados por E2F y por lo tanto la entrada a la fase S. El mecanismo que ocurre con la sobre-expresión de *myc* y *ras* para inducir la promoción de la fase S, es a través de la disminución de p27, que específicamente inhibe al complejo ciclina E/Cdk2, con lo que la actividad de ésta última se ve aumentada, y entonces este incremento en la actividad de la ciclina E/Cdk2 es suficiente para inducir la entrada

a la fase S, a pesar de que Rb se encuentre activo. Sin embargo, en nuestro trabajo la aceleración de la fase G1 por la sobre-expresión de *ras*, ocurre cuando la actividad de Rb se encuentra mermada por la proteína E7 de papilomavirus. Por tal motivo, la alteración al ciclo celular producida por *H-ras* ocurre probablemente por otra vía.

Aunque algunos autores han señalado que la actividad de *Ras* puede producir alteraciones en la duración de fases tardías del ciclo celular (Oreccia *et al*, 2000; Hitomy y Stacey 2001), en el presente trabajo el desfase en el ciclo celular ocasionado por una reducción en la duración de la fase G1, no sufre modificaciones adicionales en las fases tardías del ciclo celular (Fig. 17) y las diferencias observadas en la expresión y localización de ciclina B, quizá solamente reflejen estas diferencias (Fig. 18). No obstante, los ensayos realizados no se permiten descartar una posible regulación de proteínas de fases tardías del ciclo celular por *Ras*. Lo anterior parece indicar que la alteración al ciclo celular por la sobre-expresión de *ras* se encuentra únicamente en la transición G1-S.

Por otra parte en la salida de un arresto en G1-S por tratamiento continuo con exceso de timidina, las células que sobre-expresan *H-ras* avanzan primero en la salida tal arresto (Fig. 19 y 20), lo que podría implicar que quizá se arresten en un momento más avanzado de la fase G1 o que algunas de las proteínas requeridas para llevar a cabo la replicación del DNA, sean sintetizadas a pesar del desequilibrio en la concentración de nucleótidos y una vez retirado el exceso de timidina no se requiera sintetizar todos los elementos para iniciar la replicación.

Los efectos proliferativos de *Ras* se han asociado a la activación de la vía de Raf/MAPK, pues esta vía está asociada a la promoción de la expresión de ciclina D y acortamiento en la fase G1 (Lavoie *et al*, 1996; Liu *et al*, 1995; Weber *et al*, 1997a). Por otro lado, la activación de la vía de PI3K, por *Ras*, puede promover la entrada a la fase S (Treiniec *et al*, 1999). En el presente trabajo analizamos la posible participación de estas vías en la inducción de proliferación por la

sobre-expresión de *ras* en células HeLa, observando que la inhibición de cualquiera de estas vías no altera el efecto en la reducción de la fase G1 de células HeLa ocasionado por la sobre-expresión de *H-ras* (Fig. 21). Esto refuerza la idea de que *Ras* puede emplear vías alternas para promover la progresión en el ciclo celular, que no tienen como blanco final a Rb y que no están reguladas por las vías de Raf ni PI3K. La vía de Rho podría ser una de las involucradas en el acortamiento observado en la fase G1 en células HeLa, por la sobre-expresión de *H-ras*. Se ha señalado que *Ras* puede inducir la actividad de Rho, quizá a través de Rac, aunque la vía aún no está muy clara (Zohn et al, 1998). La actividad de Rho, inducida por *Ras*, induce la degradación de p27 (Weber et al, 1997b) y esta reducción está asociada a un incremento en la actividad de ciclina E por Rho, de una manera inducible por *Ras* (Hu et al, 1999). Esta vía puede jugar un papel importante en la transformación por *Ras* y quizá está participando en el acortamiento de la fase G1 en células HeLa, pues la actividad de los complejos ciclina E/Cdk2 se ha señalado como determinante en la transición G1-S (Ohtsubo et al, 1995), aunque los procesos de regulación fina que dan inicio a la fase S aún no están muy claros. Sin embargo la señalización por *Ras* puede modificar éstos mecanismos no sólo a través de la vía clásica que tiene como blanco principal la inactivación de Rb, sino a través de otros mecanismos que tienen blanco en los reguladores de la transición G1-S, empleando otros efectores además de los clásicos Raf y PI3K. Esta observación es congruente con la idea actual de que la señalización por *Ras* es mucho más amplia y compleja, y que la participación de los diversos efectores (así como su interconexión) puede promover la proliferación en más de una forma, dependiendo del contexto celular, con lo que incrementa su importancia en la comprensión de los mecanismos de transformación celular.

6. CONCLUSIONES

- La sobre-expresión de *H-ras* induce una mayor proliferación en células HeLa, aún cuando el blanco principal de la señalización por *H-ras*, Rb, está disminuido en esta línea celular por la presencia de la proteína E7 de papilomavirus
- El aumento en la proliferación observada en células HeLa por la sobre-expresión de *H-ras* es causado por un acortamiento en el ciclo celular, específicamente por una reducción en la duración de la fase G1.
- La sobre-expresión de *H-ras* no produce alteraciones en la duración de las fases S y G2/M del ciclo celular de células HeLa.
- La sobre-expresión de *H-ras* no produce alteraciones en los patrones de expresión de reguladores de las fases tardías del ciclo celular.
- *H-ras* permite una recuperación más rápida de un arresto en G1/S por un tratamiento largo con timidina, implicando un arresto en un periodo más tardío de la fase G1 o desregulación de la transición G1/S.

- **La inhibición de las vías de Raf y PI3K, no altera la reducción de la fase G1 provocado por la sobre-expresión de *H-ras*, en células HeLa y probablemente involucre la participación de una vía de señalización alterna.**

7. REFERENCIAS

- Aktas H, Cai H, Cooper GM. 1997. Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27^{KIP1}. *Molecular and Cellular Biology* 17(7): 3850-3857
- Bar-Sagi D. 2001. A ras by any other name. *Molecular and Cellular Biology* 21: 1441-1443
- Beijersbergen R, Bernards R. 1996. Cell cycle regulation by the retinoblastoma family of growth inhibitory proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1287: 103-120
- Blanchard J. 2000. Cyclin A2 transcriptional regulation: modulation of cell cycle control at the G1/S transition by peripheral cues. *Biochemical Pharmacology* 60: 1179-1184
- Boguski, McCormick F. 1993. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366: 643-653
- Campbell S., Khosraui-Far R., Rossman K., Clark G., Der C. 1998. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 17: 1395-1413
- Carstens P., Krämer A., Fahl W. 1996. Adhesion-dependent control of cyclin E/cdk 2 activity and cell cycle progression in normal cell but not in *Ha-ras* transformed NRK cells. *Experimental Cell Research* 229: 86-92
- Cheng M., Sexl V., Sherr C., Roussel M. 1998. Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27^{KIP1} regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95(3): 1091-1096
- Downward J. 1997. Cell cycle: routine role for Ras. *Current Biology* 7: R258-R260
- Downward J. 1998. Ras signaling and apoptosis. *Current Opinion in Genes & Development* 8: 49-54
- Durkin J., Whitfield J. 1986. Characterization of G1 transit induced by the mitogenic-oncogenic viral *Ki-ras* gene product. *Molecular and Cellular Biology* 6(5): 1386-1392
- Dyson D., Walter C. 1998. The regulation of E2F by pRb-family proteins. *Genes & Development* 12: 2245-2262
- Ebinu J., Bottorff D., Chan E., Stang S., Dunn R., Stone JC. 1998. RasGRP, a Ras guanyl nucleotide-releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science* 280: 1082-1086
- Ekholm S., Reed S. 2000. Regulation of G1 cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Current Opinion in Cell Biology* 12: 676-684
- Ellis C., Clark G. 2000. The importance of being K-Ras. *Cellular Signaling* 12: 425-434
- Esteban L., Vicario-Abejon C., Fernández-Salguero P., Fernandez-Menerde A., Swaminathan N., Yienger K., López E., Malumbres M., McKay R., Ward J., Pellicer A., Santos E. 2001. Targeted genomic disruption of *H-ras* and *N-ras*, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development. *Molecular and Cellular Biology* 21(5): 144-1452
- Fan J., Bertino J. 1997. *K-ras* modulates the cell cycle via both positive and negative regulatory pathways. *Oncogene* 14: 2595-2607
- Feig L. 1994. Guanine-nucleotide exchange factors: a family of positive regulators of Ras and related GTPases. *Current Opinion in Cell Biology* 6: 204-211
- Feig L., Schaffhausen B. 1994. The hunt for Ras targets. *Nature* 370: 508-509
- Filmus J., Robles A., Shi W., Wong M., Colombo L., Conti C. 1994. Induction of cyclin D1 overexpression by activated *ras*. *Oncogene* 9(12): 3627-3633
- Frame S., Balmain A. 2000. Integration of positive and negative growth signals during *ras* pathway activation in vivo. *Current Opinion in Genetics & Development* 10: 106-113

- Furstenenthal L., Kaiser B., Swanson C., Jackson P. 2001. Cyclin E uses Cdc6 as a chromatin-associated receptor required for DNA replication. *Journal of Cell Biology* 152(6): 1267-78
- Gibbs E., Pan Z., Niu H., Hurwitz J. 1996. Studies on the in vitro phosphorylation of HSSB-p34 and -p107 by cyclin-dependent kinases. Cyclin substrate interactions dictate the efficiency of phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 271(37): 22847-22854
- Gille H., Downward J. 1999. Multiple Ras effectors pathways contribute to G1 cell cycle progression. *Journal of Biological Chemistry* 274(31): 22033-22040
- Gupta S., Plattner R., Der C., Stanbridge E. 2000. Dissection of Ras-dependent signaling pathways controlling aggressive tumor growth of human fibrosarcoma cells: evidence for a potential novel pathway. *Molecular and Cellular Biology* 20(24): 9294-9306
- Hershko A. 1997. Roles of ubiquitin-mediated proteolysis in cell cycle control. *Current Opinion in Cell Biology* 9: 788-799
- Hitomi M., Stacey D. 1999. Cyclin D1 production in cycling cells depends on Ras in a cell cycle manner. *Current Biology* 9: 1075-1084
- Hitomi M., Stacey D. 2001. Ras-dependent cell cycle commitment during G2 phase. *FEBS Letters* 490: 123-131
- Hu W., Bellones C., Baldassare J. 1999. RhoA stimulates p27(Kip) degradation through its regulation of cyclin E/Cdk2 activity. *Journal of Biological Chemistry* 274 (6): 3396-3401
- Inouye K., Mizutani S., Koide H., Kaziro Y. 2000. Formation of Ras dimer is essential for Raf-1 activation. *Journal of Biological Chemistry* 275(6): 3737-3740
- Katz M., McCormick F. 1997. Signal transduction from multiple Ras effectors. *Current Opinion in Genetics & Development* 7: 75-79
- Kishimoto T., Okumura E. 1997. In vivo regulation of the entry into M-phase: initial activation and nuclear translocation of cyclin B/Cdc2. *Progress in Cell Cycle Research* 3: 241-249
- Klochendler-Yeivin A., Muchardt C., Yaniv M. 2002. SWI/SNF chromatin remodeling and cancer. *Current Opinion in Genetics & Development* 12(1): 73-79
- Krew W., Ewen M., Shirodrakar S., Arany Z., Kaelin W., Livingston D. 1994. Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. *Cell* 78(1): 161-172
- Lavoie J., L'Allemain G., Brunet A., Muller R., Pouyssegur J. 1996. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *Journal of Biological Chemistry* 271: 20608-20616
- Leone G., DeGregori J., Sears R., Jakoi L., Nevins J. 1997. Myc and Ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin E/Cdk2 and E2F. *Nature* 387: 422-426
- Liu J., Chao J., Jiang M., Ng S., Yen J., Yang-Yen H. 1995. Ras transformation results in an elevated level of cyclin D1 and acceleration of G1 progression in NIH 3T3 cells. *Molecular and Cellular Biology* 15(7): 3654-63.
- Lloy A., Obermüller F., Staddon S., Barth C., McMahon M., Land H. 1997. Cooperating oncogenes converges to regulate cycling/cdk complexes. *Genes & Development* 11: 663-677
- Macleod K., Sherry N., Hannon G., Beach D., Tokino T., Kinzler K, Vogelstein B., Jacks T. 1995. p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes & Development* 9 (8): 935-944
- Malumbres M. y Pellicer A. 1998. Ras pathways to cell cycle control and cell transformation. *Frontiers in Bioscience* 3: d887-912
- Marais R., Marshall C. 1996. Control of the ERK MAP Kinase cascade by Ras and Raf. *En: Cell Signaling*, [Parker P., Pawson T. Ed. *Cancer Surveys Vol 27*. CSHL Press. Pags. 101-125

- Marshall C. 1996. Ras effectors. *Current Opinion in Cell Biology* 8: 197-204
- Masui Y. 1996. A quest for cytoplasmic factors that control the cell cycle. *Progress in Cell Cycle Research* 2: 1-13
- McCormick F. 1993. How receptors turn Ras on. *Nature* 363: 15-16
- McCormick F. 1999. Signaling networks that cause cancer. *Trends in Cell Biology* 9(12): M53-56
- McDonald F. y Ford C. 1997. Molecular biology of cancer. *BIOS Scientific Publishers, Oxford UK*, 218 pp
- Miranda E., Santana C., Rojas E., Hernández S., Ostrosky-Wegman P., García-Carrancá A. 1996. Induced mitotic death of HeLa cell by abnormal expression of c-H-ras. *Mutation Research* 349(2): 172-182
- Mizutani S., Inouye K., Koide H., Kaziro Y. 2001. Involment of B-Raf in Ras-induced Raf-1 activation. *FEBS Letters* 507: 295-298
- Morgan D. 1997. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks and microprocessors. *Annual Review of Cell Development Biology* 13: 261-291
- Murray A., Marks D. 2001. Can sequencing shed light on cell cycling?. *Nature* 409: 844-846
- Ohtsubo M., Theodoras A., Schumacher J., Roberts J., Pagano M. 1995. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Molecular and Cellular Biology* 15(5): 2612-2624.
- Ookata K., Hisanaga S., Sugita M., Okuyama A., Murofushi H., Kitazawa H., Chari S., Buhnski J., Kishimoto T. 1997. MAP4 is the in vivo substrate for cdc2 kinase in HeLa cells: identification of an M-phase specific and a cell cycle -independent phosphorylation site in MAP4. *Biochemistry* 36: 15873-15883
- Oreccia R., Infusini E., Sciutto A., Rapallo A., Di Vinci A., Nigro S., Geido E., Giaretti W. 2000. *Ki-ras* activation in vitro affects G1 and G2M cell-cycle transit times and apoptosis. *Journal of Pathology* 190: 423-429
- Pepper D., Uptom T., Ladha M., Neuman E., Zalvide J., Bernards R., DeCaprio J., Ewen M. 1997. Ras signaling linked to the cell-cycle machinery by retinoblastoma protein. *Nature* 386: 177-181
- Pines J. 1995. Cyclins and cyclin dependant kinases: theme and variations. *Advances in Cancer Research* 66: 181-212
- Quilliam L., Khosravi-Far R., Huff S., Der C.. 1995. Guanine nucleotide exchange factors: activators of the Ras superfamily of proteins. *Bioessays* 17(5): 395-404
- Rebollo A., Martínez-A C. 1999. Ras proteins: recent advances and new functions. *Blood* 94(9): 2971-2980
- Reuther G., Der C. 2000. The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree. *Current Opinion in Cell Biology* 12(2): 157-165
- Rhind N., Russell P. 2000. Checkpoints: it takes more than time to heal some wounds. *Current Biology* 10: R908-R911
- Rommel C., Hafen E. 1998. Ras-a versatile cellular switch. *Current Opinion in Genetics & Development* 8: 412-418
- Roy S., McPherson R., Apolloni A., Yan J., Lane A., Clyde-Smith J., Hancock J. 1998. 14-3-3 facilitates Ras-dependent Raf-1 activation in vitro and in vivo. *Molecular and Cellular Biology* 18(7): 3947-3955
- Schaeffer H., Weber M. 1999. Mitogen-Activated Protein Kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Molecular and Cellular Biology* 19(4): 2435-2444
- Serrano M., Lin A., McCurrach M., Beach S., Lowe S. 1997. Oncogenic *ras* provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16^{INK4a}. *Cell* 88: 593-602
- Sewing A., Wiseman B., Lloyd A., Land H. 1997. High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21^{Cip1}. *Molecular and Cellular Biology* 17(9): 5588-5597

- Shao J., Sheng H., DuBois R., Beauchamp R. 2000. Oncogenic Ras-mediated cell growth arrest and apoptosis are associated with increased ubiquitin-dependent cyclin D1 degradation. *Journal of Biological Chemistry* 275(30): 22916-22924
- Shields J., Pruitt K., McFall A., Shaub A. y Der C. 2000. Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over. *Trends in Cell Biology* 10(4): 147-154
- SSA 2000. Principales Causas de Mortalidad General en los Estados Unidos Mexicanos, 1999. www.ssa.gob.mx
- Stiegler P., De Luca A., Bagella L., Giordano A. 1998. The COOH-terminal region of pRb2/p130 binds to Histone Deacetylase 1 (HDAC1), enhancing transcriptional repression of the E2F-dependent cyclin A promoter. *Cancer Research* 58: 5049-5052
- Swank R., Thing J., Guo XW, Valdez J., Bradbury E., Gurley L. 1997. Four distinct cyclin-dependent kinases phosphorylate histone H1 at all of its growth-related phosphorylation sites. *Biochemistry* 36(45): 13761-13768
- Takuwa N., Takuwa Y. 1997. Ras activity late in G1 phase required for p27^{Wp1} downregulation, passage through the restriction point, and entry into S phase in growth factor-stimulated NIH 3T3 fibroblast. *Molecular and Cellular Biology* 17(9): 5348-5358
- Tocque B., Delumeau I., Parker F., Maurier F., Multon M., Schweighoffer F. 1997. Ras-GTPase Activating Protein (GAP): a putative effector for Ras. *Cellular Signaling* 9(2) 153-158
- Treinius I., Paterson HF, Hooper S., Wilson R., Marshall CJ. 1999. Activated MEK stimulates expression of AP-1 components independently of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) but requires a PI3-kinase signal to stimulate DNA synthesis. *Molecular and Cellular Biology* 19(1): 321-329.
- Tyers M., Jorgensen P. 2000. Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Current Opinion in Genetics & Development* 10 (1): 54-64
- Vidal A., Koff A. 2000. Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* 247: 1-15
- Villalonga P., Rius E., Bachs O., Agell N. 2000. [Lys61]N-Ras is able to induce full activation and nuclear accumulation of Cdk4 in NIH3T3 cells. *Oncogene* 19: 690-699
- Vlach J., Hennecke S., Amati B. 1997. Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *EMBO Journal* 16 (17): 5334-44.
- Vojtek A., Der C. 1998. Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry* 273 (32): 19925-19928
- Wasylyk B., Hagman J., Gutierrez-Hartman A. 1998. Ets transcription factors: nuclear effectors of the Ras-MAP-Kinase signaling pathway. *Trends in Biochemical Science: 213-216*
- Weber J., Raben D., Phillips P., Baldassare J. 1997. Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase. *Biochemical Journal* 326: 61-68
- Weber J., Hu J., Jefcoat S., Raben D., Baldassare J. 1997. Ras-stimulated Extracellular signal-Related Kinase 1 and RhoA activities coordinate Paleted-derived Growth Factor-induced G1 progression through the independent regulation of cyclin D and p27^{Wp1}. *Journal of Biological Chemistry* 272 (52): 32966-32971
- Weinberg R. 1996. How cancer arises. *Scientific American* 275(3): 62-70
- Welker M., Lukas J., Strauss M., Bartek J 1998. p21^{WAF1/CIP1} mutants deficient in inhibiting cyclin-dependent kinases (CDKs) can promote assembly of active cyclin D/CDK4(6) complexes in human tumor cells. *Cancer Research* 58 (22): 5053-5056.
- Woods D., Parry D., Chervinski H., Bosch E., Lees E., McMahon M. 1997. Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21^{Cip1}. *Molecular and Cellular Biology* 17(9): 5598-5611

- Zetterberg A., Larsson O., Wiman K. 1995. What is the restriction point?. *Current Opinion in Cell Biology* 7: 835-842
- Zhao J., Kennedy B., Lawrence B., Barbic D., Matera A., Fletcher J., Harlow E. 2000. NPAT links cyclin E-Cdk2 to the regulation of replication-dependent histone gene transcription. *Genes & Development* 14(18):2283-2297
- Zohn I., Campbell S., Khosravi-Far R., Rossman K., Der C. 1998. Rho family proteins and Ras transformation: the RHOad less traveled gets congested. *Oncogene* 17: 1415-1438.