

00322
169



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

PARTICIPACION DE R-Ras EN LOS PROCESOS DE ADHESION, EXTENSION Y MIGRACION DE CELULAS DE EPITELIO CERVICO UTERINO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ARMANDO SILVESTRE RODRIGUEZ CASTAÑEDA

DIRECTOR DE TESIS: DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

MEXICO, D. F.

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

2003.

.A



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.

PAGINACIÓN

DISCONTINUA



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: ARMANDO SILVESTRE RODRIGUEZ CASTAÑEDA
 FECHA: 25 MARZO 2003
 FIRMA: [Firma]

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Participación de R-Ras en los procesos de adhesión, extensión y migración de células de epitelio cérvico uterino".

realizado por ARMANDO SILVESTRE RODRIGUEZ CASTAÑEDA

con número de cuenta 9307370-5, quien cubrió los créditos de la carrera de:
BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

A t e n t a m e n t e

Director de Tesis
 Propietario

DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA

Propietario

DRA. ROCIO SALCEDA SACANELLES

Propietario

DRA. MARIA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

Suplente

M.en IBB. BENITO ESTRADA MENA

Suplente

DRA. ELSA GUADALUPE ESCAMILLA CHIMAL

FACULTAD DE CIENCIAS
 UNAM

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juán Manuel Rodríguez Chávez

DEPARTAMENTO
 DE BIOLOGIA

. B

DEDICATORIA

Considero que es muy grato darse la oportunidad de conocer y de vivir. La vida es una trama intrínsecamente enmarañada que nos conduce por senderos realmente inquietantes. Es un verdadero placer conocer un poco de los fenómenos que forman parte de la vida. Digo como individuo allegado un tanto al conocimiento científico que todo individuo (humano) en el momento en que deja de aprender, indudablemente muere.

En pocas palabras, este trabajo se lo dedico con gran ahinco al espíritu inquieto y con iniciativa del *homo sapiens sapiens*.

AGRADECIMIENTOS

A Gaia que nos mantiene con aliento día a día a pesar de nuestro orgullo, vanidad e ingratitud.

A las personas que aportaron las células germinales de las cuales tuve el honor de surgir.

A mi familia que día a día lucha por no perderse en los campos de cemento de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México.

A las personas que me brindaron su amistad, cariño y compañía durante las horas de clase y fuera de ellas.

A mi tutor por haberse dado la oportunidad de desarrollar la paciencia como una de sus principales habilidades.

A Nancy Mora por su tiempo y apoyo técnico.

A la profesión llamada arbitro que me ha dado las satisfacciones más determinantes de mi existir y sin la cual no hubiese sido posible financiar este trabajo.

En fin... a todo aquel individuo, organismo, población ó especie, a la cual le he quitado un poco de su ser. Aún cuando éste exista todavía, haya dejado de existir o no haya finalizado su existencia del todo.

Realmente me doy cuenta que soy un simple mortal.

Y sin embargo... se mueve. Galileo Galilei (1564-1642)

ÍNDICE

1	RESUMEN.....	1
2	INTRODUCCIÓN.....	2
	2.1 Cáncer.....	2
	2.1.1 Células normales y células malignas.....	3
	2.1.2 Factores determinantes del cáncer.....	5
	2.2 Cáncer cervico uterino.....	6
	2.3 Oncogenes.....	7
	2.3.1 De proto-oncogen a oncogen.....	8
	2.4 Ras.....	9
	2.5 R-Ras.....	11
	2.6 Adhesión celular.....	13
	2.6.1 Integrinas.....	14
	2.6.1.1 Unión a ligando.....	15
	2.6.2 Moléculas de adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas.....	15
	2.7 Extensión y migración celular: procesos posteriores a la adhesión.....	16
	2.7.1 Elongación.....	16
	2.7.2 Migración.....	19
	2.7.3 Fosfatidilinositol 3-Cinasa (PI 3-K).....	19
3	HIPÓTESIS.....	24
4	OBJETIVOS.....	24
	4.1 Objetivos particulares.....	24
5	MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
	5.1 Células.....	25
	5.2 Plásmidos.....	25
	5.3 Anticuerpos.....	25
	5.4 Inhibidores.....	26

	5.5 Transfección.....	26
	5.5.1 Método de co-precipitación de fosfato de calcio.....	26
	5.6 Ensayo de adhesión.....	27
	5.7 Ensayo de extensión celular.....	29
	5.8 Ensayo de migración celular.....	31
	5.9 Análisis estadístico.....	32
6	RESULTADOS.....	33
	6.1 Efecto de R-Ras en la adhesión de células epiteliales de cervix a fibronectina y colágena I.....	33
	6.2 R-Ras promueve la extensión de células epiteliales de cervix sobre fibronectina y colágena I.....	38
	6.3 R-Ras incrementa la migración de células de cervix a través de colágena I.....	40
	6.3.1 La migración de células de cervix sobre colágena I es modulada por la participación de integrinas de la familia $\beta 1$	42
	6.3.2 Posterior a los procesos de adhesión y elongación, las células de cervix que expresan R-Ras activa, migran mas, después de activar una mayor fracción de integrinas de la familia $\beta 1$	49
	6.3.3 R-Ras regula la migración de las células de cervix mediante la participación de la enzima PI 3-K.....	52
7	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	54
8	BIBLIOGRAFÍA.....	63

1 RESUMEN

El cáncer es una enfermedad considerada la tercera causa de muerte a nivel mundial. El cáncer es una enfermedad multifactorial. Dentro de los factores que desencadenan el comienzo y la promoción de un cáncer se encuentran factores epigenéticos y genéticos. En los factores epigenéticos se pueden mencionar factores ambientales como lo es la radiación ultravioleta. En los factores genéticos entra la transformación de una célula ya sea por una mutación en un proto-oncogen que vuelve a tal proto-oncogen un oncogen, o bien por la pérdida de funcionalidad de un gen supresor de tumor. Se han detectado más de 100 oncogenes. Dentro de los oncogenes que tienen una contraparte celular resaltan los genes que codifican para proteínas de la superfamilia de GTPasas **Ras**. Las GTPasas Ras son proteínas que tienen participación relevante en la regulación del crecimiento, morfogénesis, movilidad celular, direccionamiento del axón y control del tráfico protéico a través del aparato de Golgi, núcleo y endosomas. Para conocer los procesos celulares en que participa la GTPasa R-Ras, expresamos en la línea celular de cervix, C33A, una forma activa de la GTPasa R-Ras (R-Ras 87L). Así mismo las células fueron transfectadas con el vector donde fue insertada la proteína R-Ras (pDCR) y además de ser transfectadas con la dominante negativa de R-Ras (R-Ras 43N). Con estas células se realizaron ensayos de adhesión, ensayos de elongación y ensayos de migración sobre proteínas de matriz extracelular como fibronectina y colágena I. Los resultados obtenidos, muestran que las células que expresan la forma activa de R-Ras se adhieren más sobre fibronectina y mantienen la adhesión sobre colágena I, además de alcanzar mayor elongación que los dos tipos celulares restantes. Finalmente, las células con R-Ras activa, migran en mayor número, siendo este proceso migratorio dependiente de la participación de integrinas de la familia $\beta 1$ y de la enzima PI 3-K. Estos resultados aportan información respecto a la actividad de la GTPasa R-Ras en células epiteliales de cervix, información que a futuro se podría utilizar para controlar un carcinoma de cervix.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Cáncer

El cáncer es una enfermedad que actualmente se desarrolla en cerca de 8 millones de personas en el planeta [Peto, 2001]. El cáncer es una enfermedad multifactorial que básicamente se caracteriza porque hay una proliferación incontrolada de células, que a su vez tienen la facilidad de migrar relativamente lejos del sitio al cual se encontraban adheridas en un principio. Durante el proceso carcinogénico persisten cambios a nivel genético, así como a nivel epigenético. Estos cambios conllevan a una inestabilidad en el genoma celular y a alteraciones en la comunicación celular, lo que se traduce en una desregulación de la proliferación celular [Herrera, et al., 2001].

Se han catalogado cerca de 200 tipos de cáncer en el humano. Los tipos de cáncer han sido clasificados de acuerdo al tejido embrionario en que se originan. Por ejemplo, los tumores denominados carcinomas son derivados del ectodermo y endodermo; mientras que los llamados sarcomas, son derivados del mesodermo. Las leucemias son una clase de sarcomas, los cuales se desarrollan como células individuales en la sangre, a la cual pueden dar una apariencia lechosa [Alberts, et al., 1996; Darnel, et al., 1990].

La excesiva proliferación celular puede dar origen ya sea, a un tumor denominado benigno ó bien a otro tipo de tumor denominado maligno. El tumor benigno se encuentra delimitado por una capsula fibrosa de tejido conjuntivo. Este tumor mantiene una determinada localización, y por ende no es dispersado. Por lo que puede ser fácilmente removido a través de un procedimiento quirúrgico. El tumor maligno se encuentra integrado por células que poseen la capacidad de abandonar su localización primaria. De forma que las células que conforman el tumor maligno pueden invadir nuevos sitios del organismo, desencadenando con ello el proceso conocido como metástasis [Alberts, et al., 1996].

2.1.1 Células normales y células malignas

Generalmente las células tienen un periodo de vida que está determinado por el número de divisiones celulares y que varía con la funcionalidad y especificidad celular. Lo anterior se conoce como senescencia replicativa. En el periodo de senescencia replicativa las células culminan su periodo de replicación y las células son incapaces de responder a mitógenos. De esta manera no se permite que una célula sobreviva más tiempo del necesario, originando un recambio constante de células en todo el cuerpo. Es a través del proceso denominado homeostasis, que el sistema se mantiene en un equilibrio constante.

A diferencia de las células normales, las células cancerosas no se rigen por el proceso de senescencia replicativa y por ende, las células cancerosas no se integran al equilibrio homeostático [Stein, et al., 1998]. Existen tres diferencias principales entre las células cancerosas y las células normales. Las células cancerosas alcanzan *mayor proliferación, tienen un fenotipo anormal y aumentan su capacidad de migración*. Primero, en la *marcada proliferación* que muestran las células cancerosas, los mecanismos moleculares que están implicados en el control del ciclo celular se encuentran alterados. Esta modificación del ciclo celular lleva a una *"inmortalización"* de las células, lo que significa, que las células adquieren la capacidad de dividirse indefinidamente. La inmortalización depende del potencial de proliferación celular. A su vez, el potencial de proliferación es modificado por factores como: daño celular, diferenciación terminal, envejecimiento y por la muerte celular en forma definitiva [Macieira-Cohelo, 2000]. Segundo, las células cancerosas adquieren un *fenotipo anormal* a través de un proceso denominado *transformación*. Una vez adquirido el fenotipo transformado, las células presentan ciertas peculiaridades, como por ejemplo: tienen la capacidad de proliferar independientemente de factores de crecimiento [Lewin, 1997]. Tercero, las células cancerosas son *capaces de desprenderse* de su sitio de origen al cual se supone deben encontrarse unidas. Es decir, las células cancerosas presentan una independencia al anclaje, adquiriendo con ello una capacidad metastásica [Alberts, et al., 1996].

Aunado a las tres principales características que diferencian a una célula normal de una cancerosa, hay una serie de peculiaridades que están estrechamente asociadas al fenotipo transformado de las células cancerosas. Como por ejemplo: en las células cancerosas hay un rearreglo del citoesqueleto. Por lo cual, las células pierden su forma original y adquieren una apariencia redonda o irregular. Así mismo, el crecimiento de las células cancerosas no obedece a un crecimiento de inhibición por contacto. Esto conlleva a que las células cancerosas crezcan en varias capas de células y se agrupen en cúmulos densos [Lewin, 1997]. Las células cancerosas además, muestran una independencia al anclaje, es decir pueden proliferar sin que necesariamente se encuentren adheridas a un sustrato [Schwarzbauer, 1997]. Estas células usualmente incrementan de tamaño (incrementan su radio núcleo-citoplasma), y en su interior hay un prominente nucleólo. Se ha visto que las células cancerosas incrementan su número de eventos mitóticos y se reduce (de manera relativa) el número de estructuras especializadas u organelos. También ha sido posible observar que las células malignas tienen un número anormal e inestable de cromosomas [Lewin, 1997; Lodish, 1995].

2.1.2 Factores determinantes del cáncer

Existen diversos factores que se han asociado con el origen y desarrollo del cáncer. Dentro de los factores que modulan la presencia ó desarrollo de un cáncer, se encuentran factores químicos, físicos y biológicos. En los factores químicos, se incluyen una gran gama de productos químicos denominados carcinogénicos, como por ejemplo el benceno. Los factores físicos corresponden fundamentalmente a radiaciones tales como la radiación ultravioleta (UV) y la radiación ionizante. Dentro de los factores biológicos se incluyen las infecciones a las células por virus, así como la infección de microorganismos eucariontes en formas parásitas [Herrera, et al., 2001]. Fue mediante la infección por virus que se determinó que dichos agentes virales portaban ciertos genes que al ser introducidos en la célula provocaban cáncer. Por lo que la infección por virus adquiere gran relevancia en el origen y desarrollo del cáncer [Cooper, 1995].

Es importante puntualizar que cada uno de los factores mencionados anteriormente, tienen una participación variable en el establecimiento y proliferación de un determinado tipo de cáncer. A su vez, dicha participación es modulada por los hábitos alimenticios y estilo de vida que pueda llevar cada individuo. Como por ejemplo, la actividad que desarrolla en el trabajo; es decir si su actividad laboral lo hace más vulnerable a la exposición a ciertos factores carcinogénicos. Además, el hecho de sobrellevar ciertos hábitos como el tabaquismo y el alcoholismo, convierten al individuo un serio candidato para desarrollar algún tipo de cáncer [Peto, 2001; Potter, 1997; Willett, 2001].

2.2 Cáncer cervico uterino

Dentro de todos los tipos de cáncer, el cáncer cervico uterino ocupa el tercer lugar en el grado de incidencia en la mujer y el séptimo lugar al compararse con el total de los tipos de cáncer en todo el mundo [Parkin, 1998]. Se calcula que a nivel mundial, se presentan alrededor de 1 millón de nuevos casos de cáncer cervico uterino en mujeres anualmente, y que cerca de 500 000 mujeres mueren durante el mismo periodo de tiempo [Valadez, et al., 2000]. Los principales países donde el cáncer cervico uterino se presenta, son países en desarrollo de América Latina, el Caribe, la región del sur del Sahara en África y en el sureste de Asia [Lazcano-Ponce, et al., 1997; Parkin, 1998]. Aunque la tasa de sobrevivencia de los pacientes con cáncer cervico uterino es muy aceptable al llegar a 90% después de cinco años de haberse detectado el cáncer, es preciso decir que alrededor del 5% del total de las muertes por cáncer, se deben a cáncer de cervix. Tan sólo en México, de 1980 a 1995 se registraron 62 000 muertes por cáncer de cervix y en 1992 se contabilizaron 4348 decesos. Por lo tanto este padecimiento se considera un problema de salud en nuestro país [Lazcano-Ponce, et al., 1997].

Existen ciertos factores de riesgo que incrementan las posibilidades de desarrollar el cáncer de cervix. Dentro de los factores de riesgo se incluyen: el número de hijos (generalmente mujeres que tienen de 3-4 hijos son más propensas), la edad (alrededor de los 38-45 años), el número de parejas sexuales (múltiples parejas), la edad a la cual se efectuó la primera relación sexual, el consumo de anticonceptivos orales, el consumo de alcohol, el tabaquismo y la infección por virus del papiloma humano. [Coker, et al., 2001; Potter, 1997; Saranath, et al., 2002; Weiderpass, et al., 2001].

El principal agente causal del cáncer cervico uterino es el virus del papiloma humano. Aunque se han llegado a describir cerca de 100 cepas del virus del papiloma humano, el desarrollo y progresión del cáncer de cervix sólo se ha correlacionado con la infección de cepas oncogénicas del virus del papiloma, particularmente los tipos 16, 18, 31, 33 y 35. Se ha determinado que alrededor del 84% de los casos de cáncer de cervix se encuentran infectados ya sea por el papiloma tipo 16 ó tipo 18 [Coker, et al., 2001; Saranath, et al., 2002; Valadez, et al., 2000].

2.3 Oncogenes

En el genoma celular se encuentran una gran diversidad y número de genes implicados en una vasta cantidad de funciones para la célula misma. Hay un cierto tipo de genes que si llegan a presentar alguna modificación (mutación), favorecen la transformación celular y con ello el desarrollo de un cáncer. Partiendo de la premisa anterior, hay tres clases de genes que juegan un papel esencial en el proceso de transformación celular: ellos son los oncogenes, los genes supresores de tumor y los proto-oncogenes. Los oncogenes que pueden verse como formas mutadas de proto-oncogenes, son genes que pueden ser portados por virus e introducidos a la célula durante la infección viral. Una vez introducidos, los oncogenes inducen transformación neoplásica de la célula huésped. Esto se debe a la mutación que presentan dichos oncogenes y que se refleja en la variación de la estructura y funcionalidad de la proteína a la cual codifican [Cooper, 1995]. Existen oncogenes virales que no tienen como predecesor a un gen celular sino que su origen se debe más bien al modo habitual de propagación del mismo virus. Esto significa que se originan debido a los mecanismos de replicación del virus por lo que no todos los oncogenes celulares poseen una contraparte viral [Alberts, et al., 1996; Carney, et al., 1990].

Los proto-oncogenes son la versión normal en la célula de un oncogen. Ellos tienen una participación activa en procesos celulares como la proliferación y diferenciación celular, señalización bioquímica, control de la replicación celular. Los proto-oncogenes se han agrupado de acuerdo a su localización dentro de la célula y a la naturaleza de la proteína para la cual codifican. Por ejemplo, se han identificado proto-oncogenes correspondientes a ciertas proteínas cinasas, proteínas G, factores nucleares y factores de crecimiento [Potter, 1997].

Finalmente se encuentran los genes supresores de tumor. Estos genes supresores de tumor son genes que si se eliminan, favorecen la aparición de un cáncer. Esto significa que los genes supresores de tumor, codifican para proteínas que controlan la replicación celular. Dos genes supresores de tumor muy importantes en el control del proceso de proliferación celular, son el gen de retinoblastoma (rb) y el gen p53 [Saranath, et al., 2002].

A manera de síntesis, es importante recalcar que el desarrollo de un cáncer se puede promover con la adquisición de algún oncogen ó por la pérdida de funcionalidad de algún gen supresor de tumor [Alberts, et al., 1996].

2.3.1 De proto-oncogen a oncogen

Cómo ya se mencionó anteriormente, aunque no necesariamente los oncogenes poseen una contraparte celular, algunos oncogenes si tienen un gen celular como predecesor. El mecanismo de conversión de un proto-oncogen a un oncogen puede suceder de varias formas: a) de forma espontánea al ocurrir una mutación aleatoria en el proto-oncogen; b) debido a la acción de ciertos agentes químicos denominados como carcinogénicos sobre el mismo proto-oncogen; c) ó a su vez por infección a células por virus que portan oncogenes. Cualquiera de estos factores puede conllevar a que en la célula se de una alteración en la forma ó tipo en que es expresada la información genética . En el caso de la infección por virus, se puede inducir en la célula, una delección o mutación en la secuencia codificante, una amplificación génica ó bien un reordenamiento cromosómico. Estas alteraciones son originadas debido a los propios mecanismos de recombinación del virus cuando el virus forma parte de los retrovirus [Alberts, et al., 1996].

2.4 Ras

Se han detectado más de 100 oncogenes. Dentro de los oncogenes que tienen una contraparte celular resaltan los del tipo **Ras**. Los genes Ras reciben ésta denominación por haberse localizado en ciertos tipos de virus que al infectar ratas inducen la formación de sarcomas en estos animales [Alberts, et al., 1996]. Las proteínas codificadas por los proto-oncogenes Ras son incluidas en el grupo de proteínas conocidas como pequeñas GTPasas. Estas pequeñas GTPasas son proteínas monoméricas de 20-35 kDa y se encuentran asociadas a nucleótidos de guanina [Bourne, et al., 1990]. Estas proteínas tienen participación relevante en la regulación del crecimiento, morfogénesis, movilidad celular, direccionamiento del axón y control del tráfico proteico a través del aparato de Golgi, núcleo y endosomas. Las proteínas Ras fueron las primeras GTPasas descubiertas. Actualmente se han encontrado una gran cantidad de GTPasas muy similares a Ras. Todas ellas forman una superfamilia de proteínas Ras. La superfamilia Ras se ha subdividido en familias de proteínas Ras, Rho, factores de ADP-ribosilación (ARF), Rab y Ran. Todas las proteínas de la superfamilia Ras se encuentran asociadas a nucleótidos de guanina, de forma que cuando se unen a GDP (difosfato de guanina) se mantienen en su estado inactivo y alcanzan su estado activo una vez que se unen al GTP (trifosfato de guanina). Este intercambio de GDP a GTP es mediado o catalizado ya sea por ciertas proteínas llamadas Factores de Intercambio de Nucleótidos de Guanina (GEFs), ó por estimuladores de disociación de GDP ó bien por ciertas proteínas activadoras de GTPasas (GAPs). Los factores GEF catalizan la unión de Ras a GTP y a su vez las GAPs aceleran la tasa intrínseca de hidrólisis de GTP a GDP [Exton, 1998; Macara, et al., 1996].

Se han encontrado en mamíferos tres genes de las GTPasas Ras que codifican para cuatro proteínas Ras distintas conocidas como H-ras (Harvey), K-rasA (Kirsten), K-rasB y N-ras. Esto es porque K-ras presenta "splicing" alternativo y se originan las dos proteínas K-Ras ya mencionadas. Las proteínas de la familia Ras tienen un peso molecular de 21 kDa (por lo que son conocidas como p21^{Ras}) y un número aproximado de 188-189 aminoácidos [Lowe, et al., 1987]. Estas proteínas son las mejor descritas dentro del gran grupo de pequeñas GTPasas. Han sido objeto de intenso estudio, porque ciertas mutantes en estado activo de esas

proteínas se han encontrado en cerca del 30-40% de los tumores humanos [Adjei, 2001; Bourne, et al., 1990; McCormick, 1995; Shields, et al., 2000]. Las GTPasas Ras participan en puntos cruciales de los procesos de transducción de señales que llevan a la regulación de la proliferación y diferenciación celular [Bourne, et al., 1990].

Las proteínas de la familia Ras están conformadas por dos regiones básicamente. La primera de ellas corresponde a una región de GTPasa ó región efectora, mediante la cual las proteínas se unen a GTP ó a GDP con gran afinidad. La secuencia de aminoácidos que corresponde a la zona efectora de la misma región, comprende del residuo 25 al 45 y es idéntica en las cuatro proteínas Ras [McCormick, 1995; Shields, et al., 2000]. La segunda región se ubica en la zona carboxilo terminal y es en esta región donde las cuatro proteínas Ras son muy divergentes en la secuencia correspondiente a los últimos 25 aminoácidos. En tales 25 aminoácidos se localiza una zona hipervariable y una secuencia CAAX (C= cisteína, A= residuo alifático y X= serina ó metionina). En la secuencia CAAX es donde se llevan acabo dos modificaciones postraduccionales, que corresponden a una farnesilación y/o una palmitoilación. Este tipo de modificaciones postraduccionales que presentan las GTPasas Ras, son de gran relevancia para que estas proteínas puedan mantener su localización dentro de la célula; ya sea que permanezcan ancladas o no a la membrana, lo que conlleva a que puedan efectuar su función. Por ejemplo a K-RasB aparte del mecanismo de farnesilación, se le adiciona una secuencia polibásica de seis lisinas consecutivas. Por su parte N-Ras y H-Ras presentan una adición covalente del ácido graso palmitato, inmediatamente en el límite superior de la región CAAX [McCormick, 1995; Newman, et al., 1992; Shields, et al., 2000].

Cabe destacar que ciertas mutaciones que se dan en las proteínas Ras, básicamente en los residuos 12, 13 ó 61, ó bien en los residuos 116, 117, 119 y 146 pueden originar que las proteínas Ras no reconozcan a los factores GAP y a su vez se mantengan unidas a GTP. Este tipo de mutaciones, dan como consecuencia que las GTPasas Ras se activen de forma constitutiva. Tal activación conlleva a que estas proteínas adquieran propiedades oncogénicas y con ello se promueva la transformación celular [Vojtek, et al., 1998].

2.5 R-Ras

R-Ras es una GTPasa que tiene una identidad del 55% con las proteínas Ras p21 antes mencionadas. El gen humano que codifica para esta GTPasa se encontró en el cromosoma 19 y está compuesto de al menos seis exones. El gen fue aislado por hibridación de baja exigencia a través de sondas homólogas a H-ras. R-Ras tiene un tamaño de 218 aminoácidos y pesa 23 kDa [Osada, et al., 1999]. R-Ras posee en su región amino terminal una extensión de 26 aminoácidos [Lowe, et al., 1987]. R-Ras mantiene conservadas la región de unión a GTP, así como la secuencia que le permite mantener su localización en la membrana celular. Aunque la región efectora de R-Ras es muy similar a la región efectora de las proteínas p21, en R-Ras ésta es más pequeña y se ubica del aminoácido 30 al 40 [Self, et al., 2001].

Esta proteína mantiene una funcionalidad muy parecida a las proteínas p21 Ras, es decir, interacciona prácticamente con los mismos efectores de las GTPasas Ras. Como por ejemplo: PI 3-K, Raf1, ciertos factores de disociación de nucleótidos de guanina activadores de Ral (Ral-GDS) y algunos factores de intercambio de GTP (GEFs) [Self, et al., 2001]. A pesar de que en un principio se observó que R-Ras no podía inducir transformación celular [Fernández-Sarabia, et al., 1993], fueron las similitudes con las GTPasas Ras, lo que llevaron a pronosticar que R-Ras si podía inducir transformación celular a través de mutaciones puntuales análogas a las de las proteínas p21^{Ras}. Basado en esto, se indujeron mutaciones en el gen R-ras que correspondían a los residuos 38 y 87 de R-Ras y se transfeció con estas mutantes de R-Ras, una línea celular de fibroblastos (NIH3T3). Estas mutaciones podían conferir a R-Ras la capacidad de inducir transformación celular [Saez, et al., 1994]. Aunado a lo anterior, el momento a partir del cual R-Ras comienza a cobrar mayor importancia, es cuando se descubre que al expresar una mutante activa de R-Ras en células mieloides de ratón, estas células incrementan la adhesión a proteínas de matriz extracelular. Es decir, R-Ras induce que las integrinas con cadena $\beta 1$ y $\beta 3$ incrementen la afinidad por su ligando [Zhang, et al., 1996]. Asimismo, se logra ver que el aumento en la adhesión previamente observado, disminuye considerablemente al expresar una forma negativa de R-Ras. Se establece que el aumento en la adhesión celular se debe a que R-Ras activa integrinas de cadena $\beta 1$ y $\beta 3$ [Zhang, et al., 1996]. En otro estudio también se observó que al transfectar células de ovario

de ratón y fibroblastos con una forma activa de R-Ras, se pudo restablecer la extensión celular. Esta recuperación en la extensión celular se da a través de la participación de dominios citoplásmicos de integrinas $\beta 1$ y bajo dependencia de la enzima PI 3-K [Berrier, et al., 2000].

Aunque se han atribuido a R-Ras dos funciones principales: la regulación del proceso apoptótico a través de su interacción con Bcl-2 [Fernández-Sarabia, et al., 1993] y el control de la activación de integrinas [Zhang, et al., 1996]; es a partir de los trabajos ya descritos, que se enfatiza en el papel que juega R-Ras en los diversos procesos celulares, tales como: transformación celular, proliferación, adhesión, extensión celular, migración y metástasis [Keely, et al., 1999; Marte, et al., 1996; McCormick, 1995; Osada, et al., 1999].

2.6 Adhesión celular

Las interacciones celulares son esenciales en diversos procesos fisiológicos y son particularmente cruciales durante el desarrollo embrionario de los organismos pluricelulares [De Arcangelis, et al., 2000]. Desde los primeros estadios del desarrollo embrionario, se establecen los mecanismos que forman parte del proceso de adhesión celular. Se lleva a cabo por un lado la adhesión de la célula y las moléculas de matriz extracelular (MEC) y por otro lado la adhesión de la célula con otras células. Los mecanismos del proceso de adhesión celular son un prerrequisito para que se inicie la diferenciación celular y formación de tejidos y órganos durante el mismo desarrollo embrionario [De Arcangelis, et al., 2000].

En la compleja gama de interacciones célula-célula y célula-MEC que se dan en un organismo pluricelular, intervienen diversas moléculas ó receptores de adhesión. Las moléculas de adhesión tienen una funcionalidad muy variable y permiten que se efectúe la comunicación intercelular y se mantenga la homeostasis. Estos receptores de adhesión participan diferencialmente en procesos como el desarrollo embrionario, diferenciación celular, migración celular, inflamación, metástasis y cicatrización. Se han agrupado las moléculas de adhesión en diversas familias. Dentro de las familias formadas están: la familia de integrinas, la familia de selectinas, la familia de cadherinas y la superfamilia de las inmuno-globulinas. Las tres últimas familias son las principales familias de receptores celulares que median la adhesión célula-célula [Alberts, et al., 2002; Rosales, et al., 1995; Wright, et al., 2002]. Mientras que la familia de las integrinas participa básicamente en la adhesión célula-MEC. Las integrinas a través de la modulación de diversos procesos tales como adhesión, extensión, migración, proliferación, sobrevivencia y diferenciación celular entre otros, pueden modificar el comportamiento celular [De Arcangelis, et al., 2000]. La adhesión intercelular desencadena en el interior de las células cambios a nivel de rearrreglo del citoesqueleto, fosforilación de proteínas y expresión de genes [Hughes, et al., 1998].

2.6.1 Integrinas

Las integrinas son receptores transmembranales heterodiméricos compuestos de dos subunidades, denominadas α y β respectivamente. Ambas subunidades están unidas de forma no covalente. Las integrinas poseen una región extracelular larga, una región transmembranal y una región citoplásmica corta (muy divergente). Las tres regiones que componen la integrina, están conformadas por las subunidades α y β . De las dos cadenas, aquella que exhibe mayor variabilidad es la cadena α . Se conocen alrededor de 14 cadenas α . La subunidad α en las diferentes integrinas puede tener un peso de 120 a 180 kDa. La cadena α presenta una región extracelular de tipo globular con un peso de 100 kDa, una región intramembranal y una región citoplásmica muy corta de aproximadamente 50 aminoácidos, que corresponde a la región carboxilo terminal. En el dominio extracelular de la cadena α , el cual corresponde a la región amino terminal, se presentan una serie de siete dominios homólogos de aproximadamente 60 aminoácidos, los cuales corresponden a sitios de unión a calcio (Ca^{2+}). Ciertas integrinas poseen en la cadena α , una secuencia adicional conocida como región I, la cual está localizada entre el último sitio de unión a Ca^{2+} y la región amino-terminal.

De la cadena β se conocen alrededor de 8 tipos. La cadena β tiene un peso de 90-110 kDa y muestra 40-48% de homología en todas las integrinas. Cabe mencionar que la cadena β es la subunidad más conservada y se aprecia al presentar una región de 100-200 aminoácidos altamente conservada [Luque, et al., 1994]. Además de que la cadena β mantiene conservada la posición de las 56 cisteínas que la conforman y presenta series de cuatro cisteínas unidas de forma contigua. La región amino-terminal de la subunidad β alcanza un peso aproximado de 40 kDa-50 kDa y muestra un fuerte plegamiento por asas internas, lo cual corresponde a enlaces sulfuro de cisteínas [Albelda, et al., 1990; Hynes, 1992].

2.6.1.1 Unión a ligando

El proceso de unión a ligando y reconocimiento de ciertos componentes del citoesqueleto por parte de las integrinas, es dependiente de ambas cadenas y también de la presencia de cationes como el Ca^{2+} y Mg^{2+} . La unión a ligando es un proceso de baja afinidad (10^{-6} M). Se ha sugerido que el reconocimiento de ligando por parte de la subunidad β , ocurre en los residuos 135 al 155. Las integrinas reconocen ciertas regiones específicas en las moléculas de matriz extracelular. Por ejemplo, las integrinas $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ y $\alpha\text{IIb}\beta_3$ reconocen en fibronectina y vitronectina, regiones con secuencias RGD (Arginina, Glicina y Ácido aspártico). En el fibrinógeno la integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ se une a una región con la secuencia KQAGDV (Lis-Gln-Ala-Gly-Ac. Asp-Val). En el caso de la colágena, la integrina $\alpha_2\beta_1$ se une a regiones con secuencias DGEA (Ácido Aspártico, Glicina, Ácido Glutámico y Alanina) [Albelda, et al., 1990; Hynes, 1992].

2.6.2 Moléculas de adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas

Hay un diverso número de miembros de receptores pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Los receptores de la superfamilia de las inmunoglobulinas, no dependen de Ca^{2+} para mediar la adhesión célula-célula. Básicamente se incluyen a las proteínas que en su dominio extracelular poseen dominios tipo inmunoglobulina (Ig). Por lo que los miembros agrupados en esta superfamilia difieren con respecto al número de dominios de inmunoglobulina y fibronectina. Es decir, los miembros son definidos por la presencia de una ó más copias de dominios tipo inmunoglobulina. Los dominios tipo Ig corresponden a una estructura compacta de 60-100 aminoácidos, que se encuentran dispuestos primero en una hoja β antiparalela de tres pliegues colocada de frente a otra hoja β de cuatro pliegues [Rosales, et al., 1995].

Algunas moléculas de adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas, presentes en la superficie de las células, son los ligandos de algunas integrinas. De esta manera la interacción integrina-molécula Ig es responsable de la adhesión célula-célula. Un caso particular es la unión de la molécula ICAM-1 (molécula de adhesión intracelular I) con las integrinas de la familia β_2 en leucocitos [Taooka, et al., 1999].

2.7 Extensión y migración celular: procesos posteriores a la adhesión.

Los receptores celulares juegan un papel trascendental en procesos celulares como la adhesión, extensión y migración celular. El hecho de conocer el papel de los receptores de adhesión (principalmente las integrinas) en el proceso de adhesión, es un punto significativo para comprender como las células cancerosas regulan su mecanismo de adhesión a moléculas de MEC. Una vez que las células se adhieren a un sustrato, las mismas células pueden modular su proceso de extensión celular. Esto permite a la célula colocarse en la antesala del proceso migratorio. Proceso crucial para que la célula cancerosa lleve a cabo su diseminación ó metástasis.

2.7.1 Extensión

La extensión celular o elongación es el paso subsecuente al proceso de adhesión celular. Después de la adhesión, el proceso de extensión celular es necesario para que se inicie la migración celular. En el proceso de extensión celular, se da la extensión ó proyección de prolongaciones membranales en la célula. Por lo que se puede decir que una célula que presenta proyecciones ó prolongaciones en su membrana, está prácticamente lista para migrar (ver fig. 1). Las proyecciones membranales se catalogan de acuerdo a la forma en que los filamentos de actina se encuentran ordenados espacialmente dentro de la célula. Básicamente se describen tres tipos de prolongaciones membranales, las cuales son: lamelipodios, filipodios y pseudópodos. Los lamelipodios son estructuras relativamente anchas y gruesas, se asemejan a hojas y los presentan células epiteliales, fibroblastos y algunas neuronas. Por su parte los filipodios son estructuras delgadas y de forma cilíndrica y se encuentran en los conos de crecimiento migratorio de los fibroblastos. Los pseudópodos son estructuras que se encuentran conformados por una malla de filamentos de actina. Los presentan principalmente las amibas y neutrófilos [Alberts, et al., 2002]. Se ha determinado que las proyecciones membranales se encuentran estrechamente acopladas a la polimerización de filamentos de actina. Por lo que en dichas prolongaciones membranales es donde se generan y actúan las fuerzas de extensión, lo que hace que tales proyecciones membranales se conviertan en sitios de empuje celular, permitiendo con ello el desplazamiento de la célula

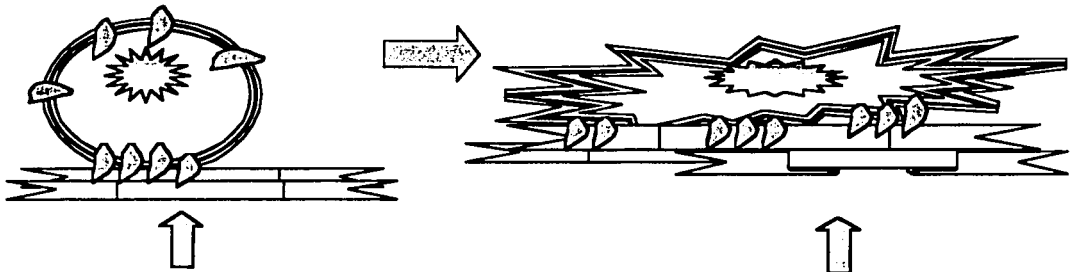
[Lauffenburger, et al., 1996]. En tales proyecciones membranales convergen una diversa gama de componentes por parte de la célula, por ejemplo: se agrupan receptores de adhesión como las integrinas, convergen también componentes del citoesqueleto y un variado grupo de proteínas que interactúan con los receptores celulares y los componentes del citoesqueleto. Esto conlleva a que se facilite la formación de sitios de adhesión focal. Por lo que las proyecciones membranales pueden ser consideradas como puntos calientes durante todo el proceso adhesión-extensión-migración [Lauffenburger, et al., 1996].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PROCESO DE ADHESION Y EXTENSION CELULAR

ADHESION CELULAR

EXTENSION CELULAR



Unión de los receptores de adhesión celular a proteínas de matriz extracelular (MEC). Polarización de la célula.

Proyección de extensiones membranales

Figura 1. Proceso de extensión celular que tiene lugar una vez que la célula se une a las moléculas de la matriz extracelular.

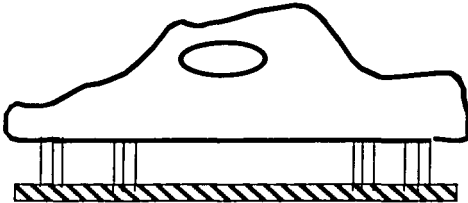
2.7.2 Migración

La migración es un proceso celular de gran importancia en diversos estadios y/o funcionalidad de las células. La migración particularmente adquiere gran relevancia durante la diferenciación celular, en la embriogénesis, en la cicatrización, en la inflamación y en metástasis de las células cancerosas [Banyard, et al., 1999; Kassis, et al., 2001]. El primer paso del proceso migratorio de una célula comienza con la polarización de la misma. La polarización celular corresponde a una polarización morfológica y a una polarización molecular. En la célula se forman dos regiones: la primera de ellas corresponde a un extremo líder o de avance y la segunda región corresponde a un extremo retrasado ó posterior. Es en el extremo líder ó de avance, donde los receptores de adhesión como son las integrinas se concentran. Esta concentración de receptores favorecen la interacción de los receptores con los componentes del citoesqueleto celular y a su vez la unión a proteínas de la matriz extracelular [Lauffenburger, et al., 1996].

El proceso migratorio se puede dividir en tres principales pasos: primero ocurre la adhesión al sustrato, posteriormente se da la extensión celular (se proyecta el extremo líder) y finalmente se presenta la retracción del extremo posterior de la célula. El contacto célula-sustrato aparte de mantener a la célula anclada, permite que se generen nuevas fuerzas de tracción celular, lo que promueve el avance de la célula. Así mismo, el contacto célula-sustrato permite la generación y transducción de señales mecánicas y químicas en la célula. Además de que ésta interacción célula-sustrato permite que la relación célula-sustrato-citoesqueleto presente un cierto grado de reforzamiento, lo cual es trascendental en el proceso migratorio [Lee, et al., 1993; Schwarzbauer, 1997].

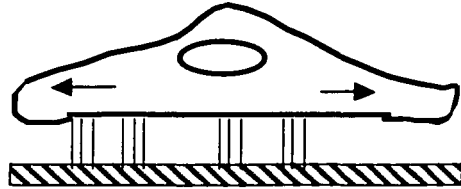
MIGRACION CELULAR

a) Adhesión



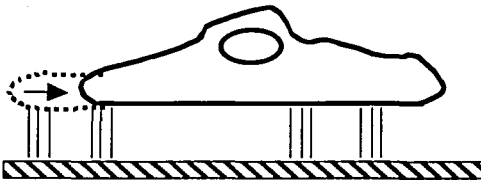
Unión de los receptores de adhesión a moléculas de matriz extracelular

b) Extensión



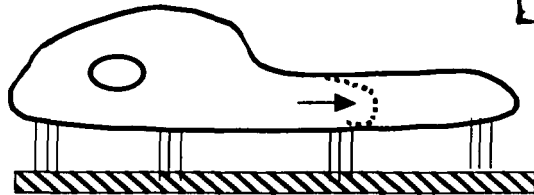
Acción de las fuerzas de avance celular, y proyección de extensiones membranales

c) Retracción del margen posterior



Establecimiento de nuevos sitios de unión al sustrato en el margen de avance y retracción del margen posterior

d) Extensión de prolongaciones celulares



Nuevos sitios de unión: sustrato-receptores de adhesión y proyección de nuevas prolongaciones celulares.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 2. Pasos generales del proceso migratorio de una célula.

2.7.3 Fosfatidilinositol 3-Cinasa (PI 3-K)

Las proteínas conocidas como fosfatidilinositol 3-Cinasas (PI 3-K), forman parte de una familia de proteínas de naturaleza enzimática que fosforilan al grupo hidroxilo localizado en la posición 3 del anillo de inositol de las estructuras inositol fosfolípidos (PtdIns). Por medio de esto se originan varios productos fosfoinositidos, dentro de los cuales están: PtdIns (3)P, PtdIns (3,4)P₂ y PtdIns (3,4,5) P₃ [Cantrell, 2001; Chan, et al., 1999]. Las proteínas PI 3-K pueden actuar sobre ciertas moléculas de fosfoinositidos y dar origen a moléculas que fungen como segundos mensajeros. Con lo cual se desencadena dentro de la célula, una diversa gama de interacciones moleculares que conlleva a la modulación de diversos mecanismos celulares. Algunos mecanismos que pueden ser modulados en la células son: la regulación del citoesqueleto, proliferación celular y el tráfico vesicular. O bien, las PI 3-K pueden interactuar directamente con diversas proteínas como Ras, algunos factores de intercambio de GDP y ciertas proteínas moduladoras. Así mismo, los productos lipídicos originados con la actividad de las proteínas PI 3-K, pueden participar en los mecanismos de señalización llamados de dentro hacia fuera y con ello modular el grado de afinidad de las integrinas [Kolanus, et al., 1997]. Lo cual origina cambios en el interior de la célula. Específicamente cambios en procesos como el metabolismo de lípidos, forma en que es utilizada la glucosa y biosíntesis proteica [Cantrell, 2001; Chan et al. 1999 y Leever, 1999]. Hay múltiples isoformas de PI 3-K, las cuales se han agrupado en tres clases. Las tres clases de PI 3-K se han diferenciado en base a la estructura primaria que presentan, así como por la actividad mostrada sobre una molécula particular de fosfoinositido [Cantrell, 2001; Chan et al. 1999 y Leever, 1999]. Las enzimas pertenecientes a la clase I de las PI 3-K, participan en diferentes procesos celulares como: control del tráfico vesicular, biosíntesis proteica, apoptosis, proliferación celular, modulación de la estructura del citoesqueleto, modulación de la morfología celular, metabolismo de lípidos y utilización de la glucosa. Estas enzimas son proteínas heterodiméricas conformadas por una subunidad catalítica y una subunidad reguladora. En esta clase, existen dos subclases de subunidad catalítica: Ia y Ib. La subclase correspondiente a la subunidad catalítica Ia está integrada por tres miembros conocidos como p110 α , p110 β y p110 δ . Quienes son reguladas por proteínas con dominios abundantes en

prolías ó por proteínas que son fosforiladas en tirosinas . Por lo que respecta a la subclase Ib sólo se le conoce un integrante, el cual es p110 γ . p110 γ participa en la transducción de señales intracelulares cuyo origen tiene lugar en ciertos receptores acoplados a proteínas G. En este grupo de enzimas, la subunidad catalítica se localiza en la región carboxilo terminal, y es en la región amino terminal donde se localiza un dominio de unión a Ras. La subunidad regulatoria de la subclase Ia, forma un complejo de una familia de proteínas. Tal familia está integrada por dos moléculas muy relacionadas quienes son p85 α y p85 β . Básicamente este primer grupo de PI 3-K responden a estímulos provenientes del exterior de la célula, y el sustrato principal de este grupo corresponde a fosfoinosítidos 4, 5 bifosfato (ptdins (4,5)P₂) [Cantrell, 2001; Chan et al, 1999 y Leever, 1999].

El grupo II de las enzimas PI 3-K consisten de dos tipos de subclases. La primer subclase se denomina α y la segunda de ellas β . En su región carboxilo terminal, este grupo contiene dominios tipo C2, mediante los cuales se pueden unir a moléculas de fosfolípidos. Aunque no se sabe el tipo de subunidad regulatoria que posee el grupo II de estas enzimas, lo que si se sabe es que básicamente ejercen su actividad sobre moléculas de fosfoinosítidos 4 fosfato (ptins (4)P) [Cantrell, 2001; Chan et al, 1999 y Leever, 1999].

El tercer grupo de enzimas de PI 3-K se les ha localizado en levaduras. A su vez, actúan sobre moléculas de fosfoinosítidos dando origen a fosfoinosítidos 3 fosfato (ptins (3)P). Las enzimas de este grupo adquieren relevancia en procesos celulares como la osmoregulación, endocitosis y transporte vesicular [Cantrell, 2001; Chan et al, 1999 y Leever, 1999].

PI 3-K tiene gran importancia en la señalización celular. Particularmente se ha descrito su participación en la vía de señalización mediada por GTPasas Ras. Como previamente fue descrito, PI 3-K junto con proteínas como Raf1, Rac, ERK, p120^{GAP}, ciertos factores de disociación de nucleótidos de guanina activadores de Ral (Ral-GDS) y algunos factores de intercambio de GTP (GEFs), forman parte de las moléculas efectoras de Ras [Khwaja, et al., 1997; Self, et al., 2001; Rodríguez-Viciano, 1997; Berrier, 2000; Reyes-Reyes, 2001]. Así mismo, PI 3-K participa en la extensión de las células, migración y por ende en la adhesión celular. PI 3-K guarda estrecha relación con Ras y se ha determinado que en células

que expresan formas activas de Ras y/o R-Ras, cuando se abate la actividad de PI 3-K, la adhesión celular disminuye notoriamente, así como el grado de extensión que alcanza la célula [Berrier, et al., 2000; Rincón-Arano, et al., 2003].

3 HIPÓTESIS

R-Ras en su forma activa en células epiteliales de cervix, es capaz de activar integrinas y por tanto provocar un aumento en la adhesión, extensión y migración celular.

4 OBJETIVO GENERAL

En el presente estudio se pretendió conocer algunas propiedades que caracterizan a los procesos de adhesión, extensión y migración llevados a cabo en células de epitelio cervico uterino.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para evaluar el efecto de la expresión de R-Ras en células C33, y su papel en procesos celulares como la adhesión y migración, se plantearon los siguientes objetivos:

- Mantener en cultivo células de epitelio de cervix (C33) las cuales se transfectaron de forma estable, con una forma activa de R-Ras (R-Ras 87L), una forma dominante negativa de R-Ras (R-Ras 43N) ó con el plásmido vacío en el que se clonaron las formas mutadas de R-Ras.
- Realizar ensayos de adhesión, extensión y migración celular sobre proteínas de matriz extracelular (MEC) como fibronectina y colágena-I, con las tres variantes celulares.
- Determinar el tipo de integrinas que participan en la migración celular.
- Analizar la participación de R-Ras 87L en la activación de la enzima PI 3-K.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Células

La línea celular de cáncer cervico uterino C33A fue mantenida en cultivo, en medio DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium; Gibco), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), en ausencia de antibióticos, a 37 °C y con 5 % de CO₂. Debido a que las células C33 crecen en monocapa, fue necesario desprenderlas para utilizarlas en los diversos ensayos. Para ello, fueron incubadas por cinco minutos a 37 °C en Tripsina-EDTA (0.05 %). Posterior al desprendimiento de las células, se les adicionó medio DMEM con 10 % de suero para inhibir el efecto de la tripsina [ver Rincón-Arango et al, 2003].

5.2 Plásmidos

La GTPasa R-Ras en su forma mutada R-Ras 43N (dominante negativa) está clonada en el plásmido retroviral pZIP. Del mismo modo R-Ras 87L (forma activa) fue clonada en el plásmido pDCR. Al efectuar las construcciones, R-Ras fue unida al epítope HA (hemaglutinina). Todos los plásmidos confieren resistencia a geneticina (G418)(Gibco), así como resistencia a ampicilina. Las células transfectadas fueron seleccionadas en 0.5 mg/ml de geneticina. Estas construcciones fueron donadas por la Dra. Adrienne D. Cox (University of North Carolina).

5.3 Anticuerpos

Se utilizó el anticuerpo anti-hemaglutinina (anti-HA; 12CA5) para detectar a R-Ras 87L. También se usaron los anticuerpos TS2/16 (que reconoce a las integrinas de la familia $\beta 1$), el anticuerpo W6/32 (quien reconoce a la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad clase I) y el anticuerpo IB4 (que reconoce a las integrinas de la familia $\beta 2$); tales anticuerpos fueron purificados en nuestro laboratorio. El sobrenadante del anticuerpo AIB2 fue facilitado por David Garcia-Diego y el Dr. Jesús Chimal (Depto. de Biología Celular, Inst. Inv. Biomédicas, UNAM).

5.4 Inhibidores

Se utilizaron los inhibidores LY294002 a 50 μM y wortmanina a 50 nM para inhibir a la enzima fosfatidilinositol 3-Cinasa (PI 3-K).

5.5 Transfección

Las células C33 fueron transfectadas de forma estable con el plásmido pDCR vacío, con una mutante activa de R-Ras (R-Ras 87L) ó una mutante negativa de R-Ras (R-Ras 43N). La transfección se efectuó por el método de co-precipitación de fosfato de calcio. La expresión de R-Ras 87L se confirmó por Western blot, mediante el reconocimiento del epítipo HA por el anticuerpo 12CA5.

5.5.1 Método de co-precipitación de fosfato de calcio

Se tomaron 2×10^5 células y se cultivaron en placas de 6 pozos un día antes de la transfección. Se preparó el co-precipitado de fosfato de calcio y DNA. Se agregó en un tubo 10 μg del plásmido deseado y se llevó a un volumen final de 105 μl con agua desionizada. Se agregaron después, 105 μl de una disolución de 0.5 M de CaCl_2 . De forma paralela, en otro tubo se adicionaron 210 μl de la solución HBS (280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM Na_2HPO_4 , 12 mM D-Glucosa y 50 mM Hepes pH 7.05).

La mezcla de ADN y CaCl_2 se adicionó por goteo al tubo que contenía la disolución HBS. Se agitó de forma suave y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente, esto es para permitir que se formara el precipitado. Las células se incubaron con la mezcla anterior por 12 horas a 37 °C y después de ello se incubaron con medio DMEM + 10% de glicerol por tres minutos a temperatura ambiente. Posterior a esto, las células se lavaron por tres ocasiones con DMEM libre de suero y se dejaron incubando en DMEM con 10% de SFB durante 36 horas a 37 °C. Finalmente el medio se cambió por medio DMEM con 10% de SFB y 0.5 mg/ml de geneticina. De esta manera fueron seleccionadas las células que expresaron a R-Ras de forma estable. Es relevante decir que la presión de selección se mantuvo durante todo el tiempo en que las células permanecieron en cultivo.

5.6 Ensayo de adhesión

Placas de 96 pozos se recubrieron con proteínas de matriz extracelular (colágena I ó fibronectina) a concentraciones de 0, 5, 10, 15, 20 30 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y se incubaron toda la noche a 4 °C. Posteriormente se removió el exceso de proteína y se cubrió cada pozo con 300 μl de albúmina bovina (BSA) 3% en PBS, incubándose por 2 horas a temperatura ambiente. Posterior a esto, se extrajo el contenido de BSA y se adicionó a cada pozo 50 μl de una suspensión celular (5×10^5 células/ml en 1 % BSA en medio DMEM). Las placas se incubaron por 2 horas a 37 °C y después se lavaron muy cuidadosamente por tres ocasiones con PBS. A cada pozo se adicionaron 50 μl de disolución de tinte y la placa se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con 300 μl de agua destilada y después a cada pozo se le agregó 100 μl de sodio duodecil sulfato 1 % (SDS) para lisar las células. Finalmente las placas se incubaron 1 hora a temperatura ambiente y el colorante desprendido fue leído en un lector de placas EL, 808 (BIO-TEK) a una longitud de onda de 590 nm.

Disolución de tinte

- 0.5 % cristal violeta
- 20 % de metanol

* Se disuelve en PBS pH = 7.4

Placa de 96 pozos
recubierta con varias
concentraciones de
fibronectina o
colágena I.

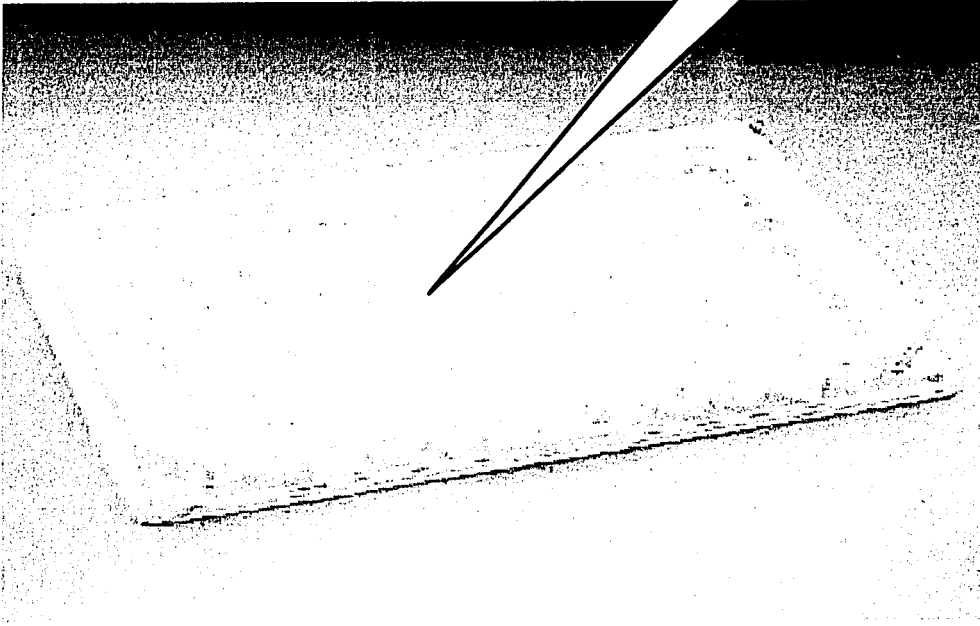


Figura 3. Placas estériles de 96 pozos fueron utilizadas para realizar los ensayos de adhesión. Los pozos fueron recubiertos previamente con varias concentraciones de fibronectina o colágena I.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.7 Ensayo de extensión celular

Placas de 12 pozos se recubrieron con 350 μ l de fibronectina ó colágena I a una concentración de 15 μ g/ml. Después la placa se incubó durante toda la noche a 4 °C en agitación rotatoria. Al día siguiente, se extrajo de cada pozo el exceso de proteína y se adicionó en el centro de cada pozo, 100 μ l de una suspensión celular (2×10^5 células /ml) en medio DMEM. La placa se incubó 1.5 horas a 37 °C. Posterior a esto las células se fijaron con 100 μ l de disolución fijadora y se incubó nuevamente por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente las células se observaron al microscopio y fueron cuantificadas 120 células de campos aleatorios, registrándose las células que se extendieron (ver fig. 4). Se sacó un porcentaje de las células extendidas con respecto a las células totales observadas por campo, de la forma siguiente:

$$\% \text{ Células extendidas} = \frac{\text{número de células extendidas}}{\text{número total de células}} \times 100$$

La extensión celular fue visualizada através de un microscopio invertido modelo TMS (Nikon Inc., Melville N.Y.), a un objetivo de 40X y con un ocular SFWE 10 x A¹⁸.

Disolución fijadora

- 2.5 % formaldehído
- 2.5 % glutaraldehído

* Se disuelve en PBS pH = 7.3

EVALUACION DE LA EXTENSION CELULAR

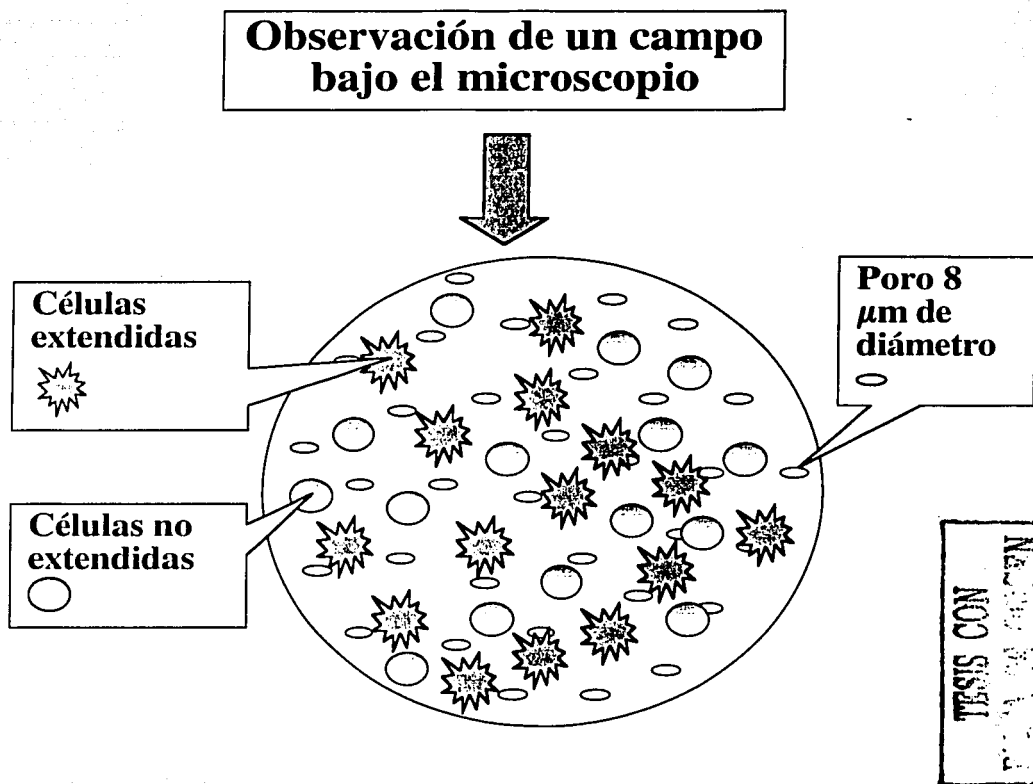


Figura 4. Esquema que representa la forma en que fue evaluada la extensión celular. Las células extendidas mostraban proyecciones membranales evidentes, por lo que eran diferenciadas claramente de las células no extendidas.

5.8 Ensayo de migración celular

Se preparó una suspensión celular (2.5×10^5 células/ml) en medio DMEM y se adicionó 100 μ l de esta suspensión sobre la parte superior de la membrana del (Costar, 6.5 mm de diámetro y poro de 8 μ m). Previamente fueron adicionados 600 μ l de medio con DMEM 10 % SFB a la parte inferior de cada "transwell". Las células se incubaron por 24 horas a 37 °C. Pasado ese tiempo se removió el medio de la parte superior del "transwell". Las membranas se incubaron 8 minutos en 1 ml de metanol a temperatura ambiente y luego se enjuagaron en 1 ml de agua destilada. Se dejó escurrir el exceso de agua por espacio de 5 minutos. Se procedió a teñir las membranas con 600 μ l de disolución de tñido por 30 minutos a temperatura ambiente. Después, las membranas se enjuagaron tres veces en 1 ml de agua destilada por 1 minuto cada vez. Al final del tercer lavado, el lado donde fueron agregadas las células se frotó con un hisopo húmedo para remover las células que no migraron. Finalmente, las membranas fueron desprendidas del pozo con la ayuda de una navaja y se montaron sobre un portaobjetos, fijando los lados del cubreobjetos con barniz de uñas. Se realizaron los conteos bajo un microscopio óptico (Nikon Eclipse 600) a un objetivo de 20X y con un ocular CFI 10 x 22.

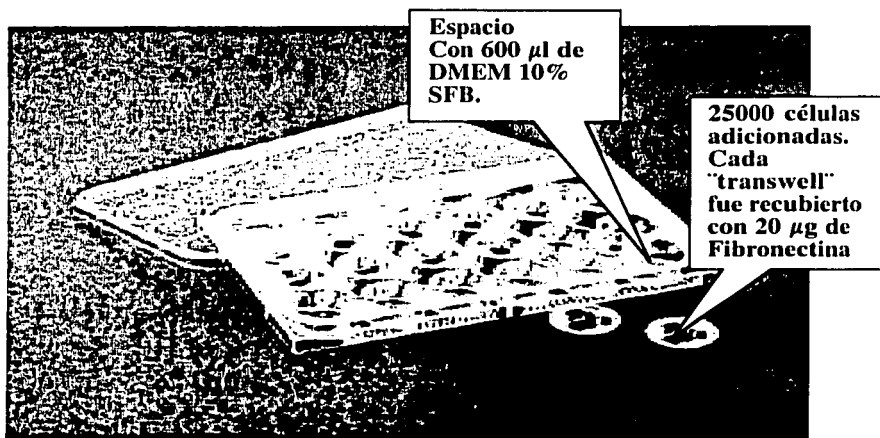


Figura 5. Los ensayos de migración se realizaron en "transwells" de 6.5 mm de diámetro y con poros de 8 μ m. Cada "transwell" fue recubierto con una disolución de fibronectina ó colágena I a una concentración de 20 μ g/ml.

5.9 Análisis estadístico

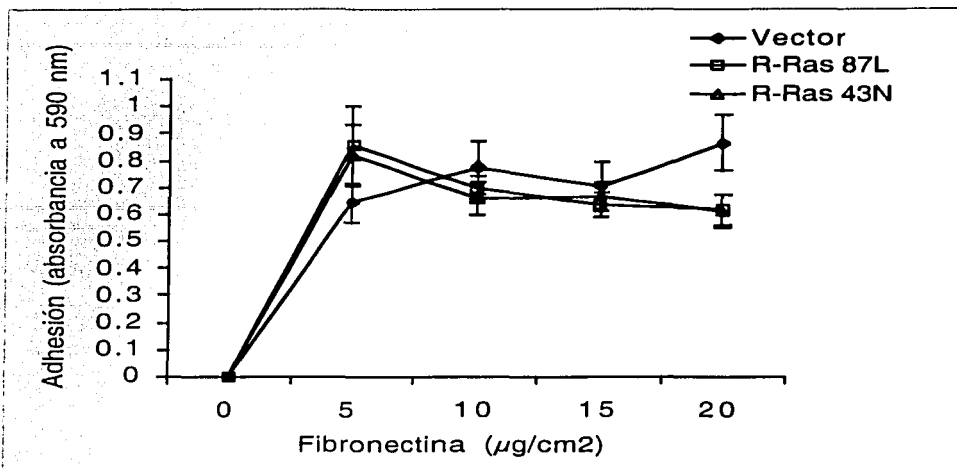
Los resultados de los experimentos de adhesión, extensión y migración celular, fueron analizados estadísticamente mediante el uso del programa Microsoft Excel versión 2001 para Macintosh y con el programa estadístico GraphPad Instat 3.0 para Windows de Instant Biostatistics. Las diferencias se consideran estadísticamente significativas a valores de $p \leq 0.05$.

6 RESULTADOS

6.1 Efecto de R-Ras en la adhesión de células epiteliales de cervix a fibronectina y colágena I

Se ha reportado que al transfectar fibroblastos y células epiteliales de ovario de hámster con mutantes positivas de R-Ras, se promueve la activación de integrinas en éstas células [Zhang, et al., 1996]. Para determinar si R-Ras tenía un efecto sobre la adhesión celular mediada por integrinas, se realizaron ensayos de adhesión.

Las células C33 que tienen R-Ras silvestre (Vector) se adhieren a fibronectina. Las células se adhirieron igual a diferentes concentraciones de fibronectina ($p > 0.05$) (Fig. 6). Desde $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ se observó que la adhesión prácticamente no aumenta a pesar de aumentar la concentración de fibronectina en la placa hasta $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Las células con la dominante negativa de R-Ras (R-Ras 43N) también se adhirieron a fibronectina en forma similar que las células control (Vector). Por su parte, las células con R-Ras activa (R-Ras 87L) se adhirieron igual a fibronectina que los otros dos tipos celulares ($p > 0.05$) (Fig. 6). Estos datos sugieren que R-Ras no tiene un efecto directo sobre la adhesión de células C33 a fibronectina.

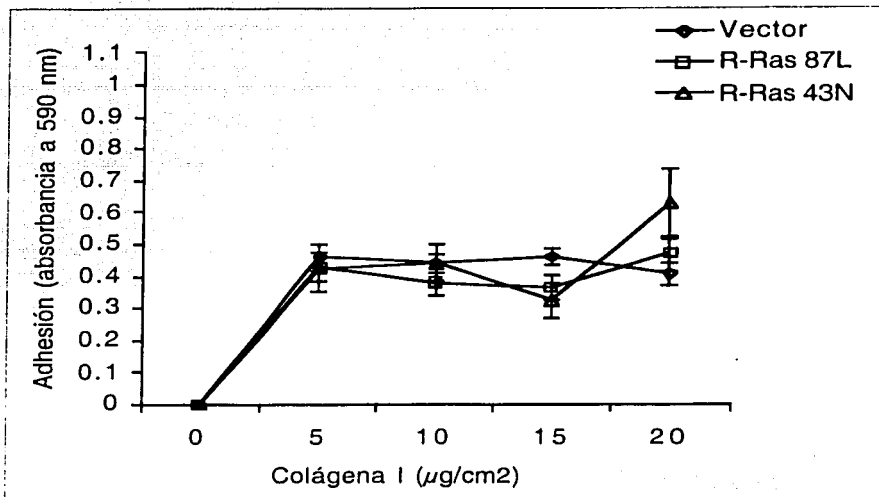


TESIS CON
 FALTA DE COPIAS

Figura 6.- Adhesión de células C33 de cervix a fibronectina. Las células C33 transfectadas con el vector vacío (Vector), ó con la mutante oncogénica de R-Ras (R-Ras 87L), ó la dominante negativa de R-Ras (R-Ras 43N), se colocaron sobre pozos de placas de 96 pozos recubiertos con fibronectina y se incubaron 1 hora a 37 °C. Las células adheridas se tiñen con cristal violeta y se lee la absorbancia del colorante a 590 nm. Se muestra el promedio \pm error estándar de cuatro experimentos realizados por cuadruplicado.

A pesar de que no vimos diferencias de adhesión a fibronectina, era probable que R-Ras tuviera efecto sobre otras integrinas, como lo son las que unen a colágena I. Para esto se realizaron ensayos de adhesión de células C33 á colágena I.

Las células con R-Ras silvestre (Vector) se adhieren a colágena I. Así mismo, las células C33 con R-Ras oncogénica (R-Ras 87L) y las células con la forma negativa de R-Ras (R-Ras 43N) se adhieren a colágena I ($p > 0.05$) (Fig. 7). En las tres variantes celulares se observa que la adhesión alcanzada a $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ es muy similar aún al aumentar la concentración de colágena I hasta $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($p > 0.05$). Esto sugiere al igual que la adhesión observada en fibronectina (Fig. 6) que R-Ras 87L no tiene efecto sobre la adhesión a colágena I. Sin embargo si se compara la adhesión a fibronectina con la adhesión a colágena I (Figs. 6 y 7), las células C33 se adhieren más a fibronectina ($p < 0.0001$).

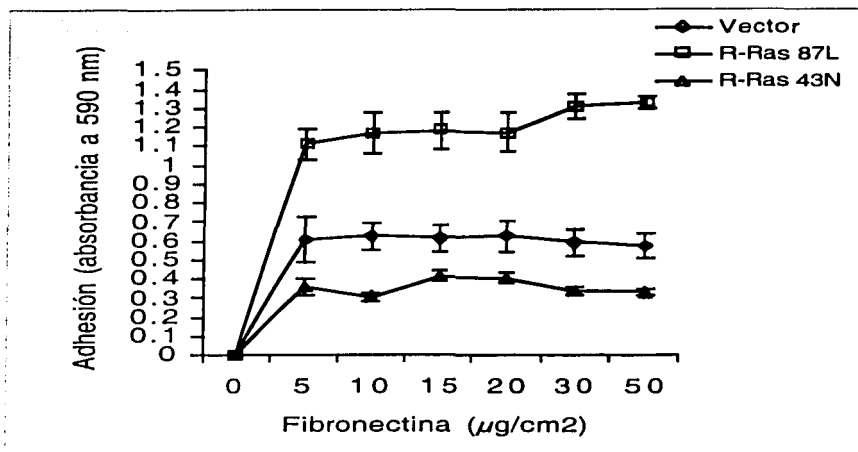


TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figura 7.- Adhesión de células C33 de cervix a colágena I. Las células C33 transfectadas con el vector vacío (Vector), ó con la mutante oncogénica de R-Ras (R-Ras 87L), ó la dominante negativa de R-Ras (R-Ras 43N), se colocaron sobre pozos de placas de 96 pozos recubiertos con colágena I y se incubaron 1 hora a 37 °C. Las células adheridas se tiñen con cristal violeta y la absorbancia del colorante se lee a 590 nm. Se muestra el promedio ± error estándar de cuatro experimentos realizados por cauduplicado.

Como las integrinas tienen funciones tempranas y tardías, quisimos ver si R-Ras tendría efectos sobre la adhesión de células C33, a tiempos más largos. Para lo cual se procedió a efectuar los ensayos de adhesión a dos horas de incubación.

Las células que portan el vector (Vector), al igual que las células que expresan la forma negativa de R-Ras (R-Ras 43N), y las células con la forma activa de R-Ras (R-Ras 87L), se adhieren a fibronectina. La adhesión en estos tres tipos celulares muestra diferencias significativas (Fig. 8). Las células que expresan la forma oncogénica de R-Ras (R-Ras 87L) se adhieren a fibronectina, en mayor proporción con respecto a las células con el vector y aquellas con R-Ras 43N ($p < 0.0001$) (Fig. 8). Así mismo, las células que portan el vector, se adhieren más que las células que expresan R-Ras 43N ($p < 0.025$).

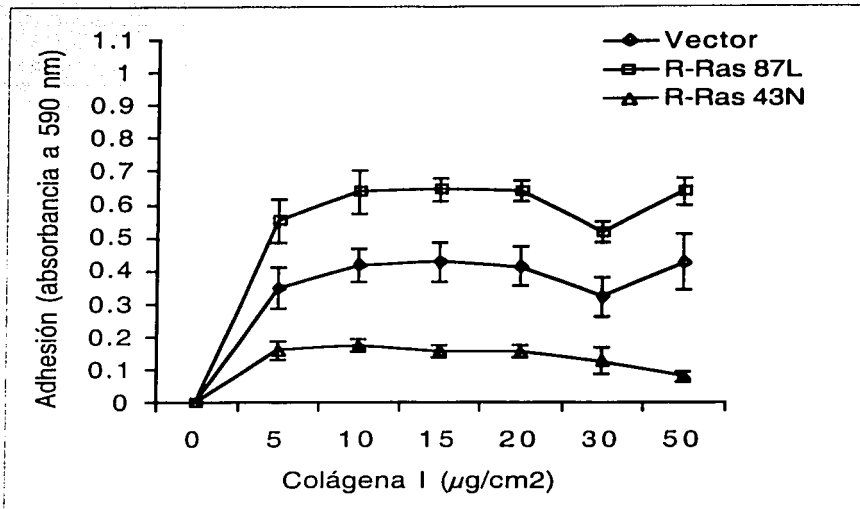


TESIS CON
 PALLA DE CEMENTO

Figura 8. Adhesión de células C33 a fibronectina. Ensayo de adhesión efectuado por dos horas de incubación a 37 °C. Se siguió el mismo procedimiento que el llevado a cabo en los ensayos de adhesión a una hora de incubación (Figs. 6 y 7). Se muestra el promedio \pm error estándar de cuatro experimentos realizados por cuadruplicado.

Según lo anterior, nos hace sugerir que R-Ras sí favorece la adhesión de células C33 epiteliales de cervix a fibronectina, sólo que para que se logren apreciar los efectos de R-Ras sobre estas células es necesario que el proceso de adhesión sea evaluado por un lapso de tiempo mayor a una hora. Por otro lado también sugiere que la expresión de R-Ras 43N inhibe la adhesión de las células epiteliales de cervix a fibronectina. Esto último quiere decir que en efecto, R-Ras 43N tiene un efecto antagónico, con respecto a R-Ras 87L en la adhesión alcanzada en fibronectina.

De la misma forma, la adhesión de las células C33 a colágena I también se evaluó a dos horas. Se aprecia que las células que portan el vector y las células que expresan R-Ras 43N se adhieren de forma diferencial a colágena I. Quienes alcanzan mayor adhesión, son las células que portan el vector ($p < 0.01$) (Fig. 9). A su vez, las células que expresan R-Ras 87L también se adhieren a colágena I. A diferencia de las células con el vector (Vector) y las células con la forma negativa de R-Ras (R-Ras 43N), las células con R-Ras activa se adhirieron más a colágena I ($p < 0.0002$) (Fig. 9). En los tres tipos celulares, no hay diferencias significativas en la adhesión alcanzada en las seis concentraciones de colágena I evaluadas (5, 10, 15, 20, 30 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ($p > 0.05$) (Fig. 9).



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

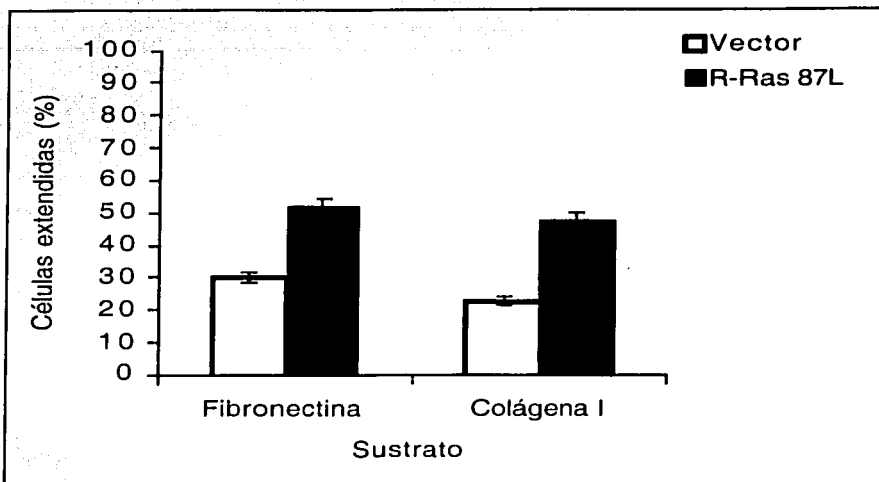
Figura 9. Adhesión de células C33 a colágena I. El ensayo de adhesión se realizó a dos horas de incubación a 37 °C. Se muestra el promedio \pm error estándar de cuatro experimentos realizados por caudruplicado.

Si comparamos la adhesión de los tres tipos celulares a una hora y dos horas de incubación en fibronectina y colágena I, podemos notar que R-Ras 87L aumenta la adhesión de las células C33 a dos horas de incubación sobre fibronectina ($p < 0.001$) (Fig. 8). Asimismo, las células con R-Ras 87L no muestran cambios significativos en su adhesión a colágena I alcanzada a una hora, una vez que son incubadas por dos horas ($p > 0.05$) (ver Figs. 7 y 9). Además, tanto en fibronectina ($p < 0.05$) como en colágena I ($p < 0.01$), la adhesión a dos horas de incubación de las células con R-Ras 43N es menor a la adhesión alcanzada a una hora de incubación por parte de las mismas células (ver Figs. 6 y 7 y comparar con Figs. 8 y 9). En el caso de la adhesión alcanzada en fibronectina y colágena I por las células que llevan el vector, no se presentan cambios significativos ($p > 0.05$), respectivamente. Esto nos indica que R-Ras activa, por un lado es capaz de aumentar la adhesión de células C33 a fibronectina y por otro lado, R-Ras 87L mantiene la adhesión de las células C33 a colágena I, al aumentar el tiempo de incubación. Asimismo, R-Ras 43N modula de forma negativa la adhesión celular, una vez que se incrementa el tiempo de incubación de 1 a 2 horas.

6.2 R-Ras promueve la extensión de células epiteliales de cervix sobre fibronectina y colágena I.

Con la finalidad de ver la participación de R-Ras en procesos posteriores a la adhesión, se realizaron ensayos de extensión celular. Las células fueron incubadas en placas de 12 pozos. Los pozos fueron recubiertos con fibronectina ó colágena I e incubados por dos horas a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las células fueron fijadas y cuantificadas bajo el microscopio óptico. Se consideró que una célula estaba extendida cuando tenía proyecciones citoplásmicas evidentes y su morfología no era circular.

Lo que se obtuvo, fue que las células con el vector (Vector) se extienden en fibronectina. A su vez las células con R-Ras oncogénica (R-Ras 87L) también se extienden sobre fibronectina, pero en mayor grado que las células que llevan el vector ($p < 0.001$) (Fig. 10). Se aprecia que las células que llevan el vector (Vector) se extienden sobre colágena I. Aunque las células que expresan R-Ras activa (R-Ras 87L) se extienden en mayor grado en colágena I que las células que portan el vector ($p < 0.001$) (Fig. 10).



TESIS CON
 FALJA DE CUBIERTA

Figura 10.- Extensión de células C33 sobre fibronectina y colágena I. Las células con el vector (Vector) y con R-Ras activa (R-Ras 87L) fueron incubadas en Fibronectina y Colágena I por dos horas a 37 °C. El porcentaje de extensión celular fue determinado contando bajo el microscopio las células que mostraban proyecciones citoplásmicas evidentes y cuya morfología no era circular. Los datos son porcentajes y se muestra un experimento representativo de dos.

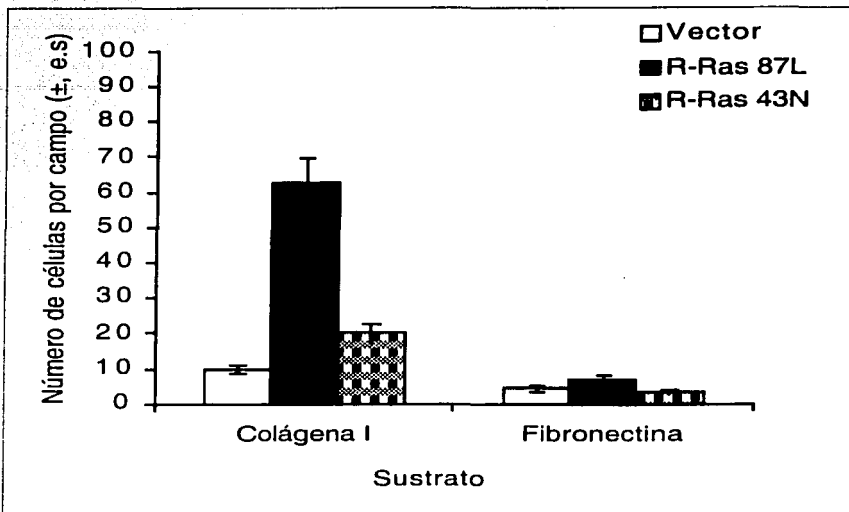
Al comparar la extensión de ambos tipos celulares sobre fibronectina y colágena I, se observa que las células que portan el vector (Vector), se extienden en mayor proporción sobre fibronectina que sobre colágena I. En las células que expresan R-Ras oncogénica (R-Ras 87L) la extensión es igual tanto en fibronectina como en colágena I (Fig. 10).

Los datos correspondientes a la extensión de células con la forma negativa de R-Ras (R-Ras 43N), no se muestran debido a que en ensayos efectuados en el laboratorio, se aprecia que la extensión de las células con R-Ras 43N fue similar a la extensión de las células con el vector (Vector).

6.3 R-Ras incrementa la migración de células de cervix através colágena I

Habíamos observado por un lado que R-Ras favorecía la adhesión de células C33 a fibronectina y podía mantener la adhesión a colágena I. Por otro lado, habíamos notado que R-Ras podía promover la extensión de células C33 sobre fibronectina y sobre colágena I. Por lo que ahora resultaba interesante saber si R-Ras tenía participación en la migración de células C33 através de las mismas proteínas de matriz extracelular. Los ensayos de migración fueron realizados en un principio a dos horas de incubación, no observándose migración durante este periodo de tiempo (dato no mostrado). Por lo que los ensayos de migración se realizaron incubando las células por un lapso de 24 horas, dado que a este tiempo es muy usual que se evalúe la migración celular. Los "transwells" fueron recubiertos con una disolución de fibronectina y colágena I a una concentración de 20 µg/ml. Las células fueron incubadas por 24 horas, posteriormente las células fueron fijadas, teñidas y finalmente las membranas fueron desprendidas de su base y se contabilizaron las células de varios campos.

La migración através de colágena I y fibronectina de las células que contienen el vector (Vector), alcanza niveles más bajos através de fibronectina que con respecto a colágena I ($p < 0.0005$). Esto mismo sucede con la migración de las células que expresan R-Ras 43N y R-Ras 87L ($p < 0.0005$). (Fig. 11). En la migración de las células C33 sobre colágena I, se aprecian diferencias significativas en la migración de las células que expresan R-Ras 87L, quienes migran en mucha mayor proporción que los otros dos tipos celulares ($p < 0.0005$). (Fig. 11). Entre las células con el vector y las que expresan R-Ras 43N, no hay diferencias significativas en la migración ($p > 0.05$).



TESIS CON
 FALTA DE CUBRIR

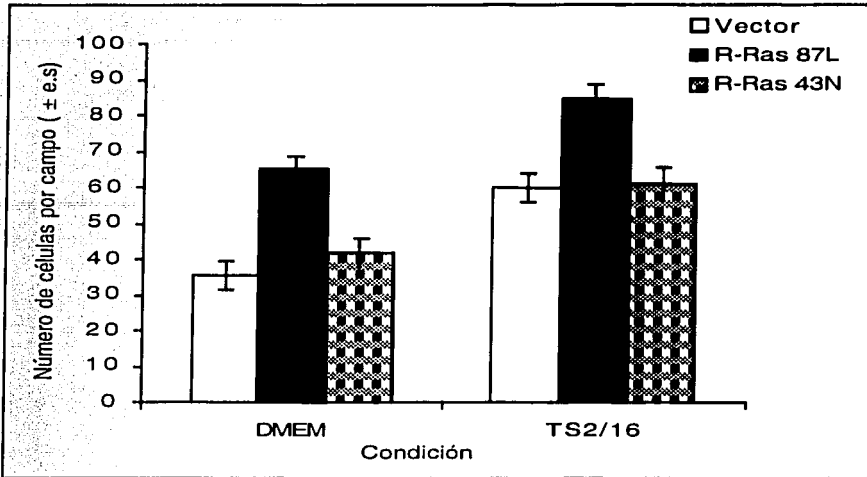
Figura 11.- Migración de células C33 sobre fibronectina y colágena I. Las células C33 transfectadas con el vector vacío (Vector), ó con la mutante activa de R-Ras (R-Ras 87L), ó la dominante negativa de R-Ras (R-Ras 43N), se colocaron sobre las membranas de los "transwells" recubiertos con fibronectina y colágena I y se incubaron 24 horas a 37 °C. Las células se fijan con metanol, se tiñen con cristal violeta y se enjuagan con agua destilada. Las células que no migran son removidas al frotar un hisopo húmedo y finalmente las membranas son desprendidas de su base y montadas, contando varios campos en el microscopio de forma aleatoria. Se muestra el promedio \pm error estándar de cinco campos observados aleatoriamente de cuatro experimentos realizados.

Lo anterior nos sugiere por un lado que las células C33 no dependen de fibronectina para su migración y que las células C33 migran mejor sobre colágena I. Por otro lado, nos sugiere que R-Ras sí media la migración de estas células sobre colágena I.

6.3.1 La migración de células de cervix sobre colágena I es modulada por la participación de integrinas de la familia $\beta 1$.

Como el principal receptor celular a colágena I es la integrina $\alpha 2\beta 1$, miembro de la familia $\beta 1$ [De Arcangelis, et al., 2000], se pretendió averiguar si la migración observada a través de colágena I era dependiente de integrinas de esta familia. Para evaluar la participación de las integrinas $\beta 1$ en la migración celular, las células fueron incubadas con el anticuerpo TS2/16, el cual reconoce a las integrinas de la familia $\beta 1$. Las células fueron incubadas durante cinco minutos con el anticuerpo TS2/16 a una concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$. Posteriormente, las células fueron colocadas en los pozos de cultivo y se incubaron por 24 horas, en presencia del anticuerpo.

Como se describió arriba, las células que portan el vector (Vector), las células que expresan la forma activa de R-Ras (R-Ras 87L) y las células que expresan la forma negativa de R-Ras (R-Ras 43N) migran a través de colágena I. La migración de las células que contienen el vector es muy similar a la migración de las células que contienen la forma negativa de R-Ras (R-Ras 43N) ($p > 0.05$). Las células que expresan R-Ras 87L migran más que los otros dos tipos celulares ($p < 0.0005$) (Fig. 12). Una vez que las células son incubadas durante cinco minutos con el anticuerpo TS2/16, se observa un aumento en la migración de los tres tipos celulares a través de colágena I ($p \leq 0.002$). Así mismo se observa que la migración de las células que portan el vector (Vector) y la migración de las células que expresan R-Ras 43N, no muestra diferencias ($p > 0.05$). Por su parte las células que expresan R-Ras 87L migran más que las otras dos variantes celulares ($p \leq 0.004$) (Fig. 12).



TESIS CON
 FALTA DE CONTIN

Figura 12.- Migración de células C33 através de colágena I. Las células transfectadas con el vector (Vector), al igual que las células transfectadas con R-Ras activa (R-Ras 87L) y las células transfectadas con la forma negativa de R-Ras (R-Ras 43N) fueron incubadas por cinco minutos a 37°C con el anticuerpo TS2/16 a 30 µg/ml, previamente al periodo de incubación de 24 horas. Se muestra el promedio \pm error estándar de cinco campos observados aleatoriamente de cuatro experimentos realizados.

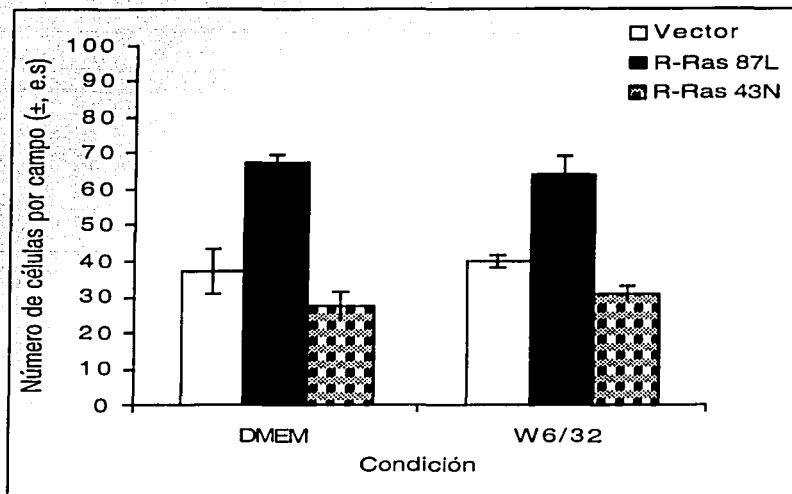
Si se comparan las dos condiciones observadas en la figura 12, se aprecia que hay un aumento en la migración de los tres tipos celulares después de que las células son incubadas con el anticuerpo TS2/16. Asimismo, se aprecia que el hecho de que la migración se incremente después que las células son incubadas con el anticuerpo TS2/16, no modifica el patrón de migración observado al poner a migrar las tres variantes celulares por sí solas. Es decir, que las células que portan el vector (Vector) y las células que expresan R-Ras 43N migran de forma similar y que las células que tienen a R-Ras 87L (activa) siguen migrando más que los otros dos tipos celulares.

Lo cual sugiere que efectivamente R-Ras en su forma activa, favorece la migración de las células C33. En lo que respecta al aumento en la migración de los tres tipos celulares después de incubar las células con el anticuerpo TS2/16, llevó a pensar que quizás éste aumento en la migración se debía a un efecto inespecífico del anticuerpo, y por tanto cualquier anticuerpo lo presentaría, ó bien se debía a un efecto activador del anticuerpo

TS2/16, sobre las integrinas $\beta 1$, como se ha visto en la línea celular de melanoma (DX3), neuroblastoma (NB100), eritroleucemia (K562) y células de pecho (MCF-10A) [Luque, et al., 1994; Plopper, et al., 2000; Tsuchida, et al., 1997].

Para descartar la primera posibilidad, las células se incubaron con dos anticuerpos que no tenían una función relevante en el proceso de migración. Los anticuerpos utilizados fueron el W6/32 y el IB4. Ambos anticuerpos fueron utilizados a una concentración de 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El primero reconoce a la molécula de MHC clase I la cual se encuentra presente en todas las células [Abbas, et al., 2000; Goldsby, et al., 2000] y el segundo se une a las integrinas de la familia $\beta 2$ presentes sólo en leucocitos [Albelda, et al., 1990]. Por lo que se esperaba que no hubiesen cambios en la migración observada en presencia de estos anticuerpos.

Después de incubar los tres tipos celulares con el anticuerpo W6/32 se aprecia que el número de células que migran a través de colágena I no difiere del número de células que migran en condiciones basales ó control en cada uno de los tres tipos celulares ($p > 0.05$) (Fig. 13).

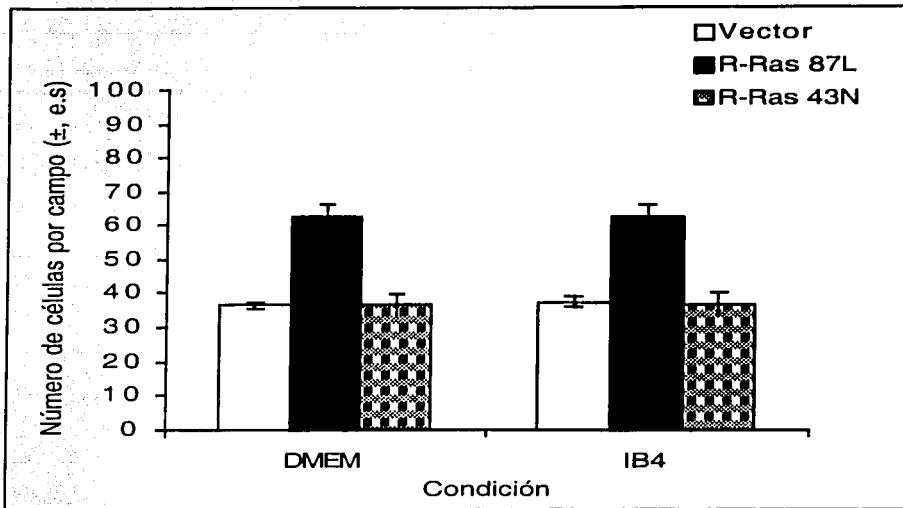


TESIS CON
 FOLIO DE CUBIERTA

Figura 13.- Migración de células C33 a través de colágena I. Las células transfectadas con el vector (Vector), al igual que las células transfectadas con R-Ras activa (R-Ras 87L) y las células transfectadas con la forma negativa de R-Ras (R-Ras 43N) fueron incubadas por cinco minutos con el anticuerpo W6/32 a una concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$, previo al periodo de incubación de 24 horas. Se muestra el promedio \pm error estándar de cinco campos observados aleatoriamente de tres experimentos realizados.

Posteriormente se incubaron los tres tipos de células con el anticuerpo IB4. Como ya se mencionó, el anticuerpo IB4 reconoce a integrinas de la familia $\beta 2$.

Las células que portan el vector (Vector) al igual que las células que expresan R-Ras 87L y las células que expresan R-Ras 43N al ser incubadas con el anticuerpo IB4 no muestran diferencias en el patrón de migración en comparación con los mismos tipos celulares considerados control. Lo cual significa que entre las células que portan el vector y las que expresan R-Ras 43N, no hay diferencias en el patrón migratorio ($p > 0.05$). Así mismo, las células que expresan R-Ras 87L, migran en mayor forma que los dos tipos celulares antes descritos ($p < 0.002$) (Fig. 14).

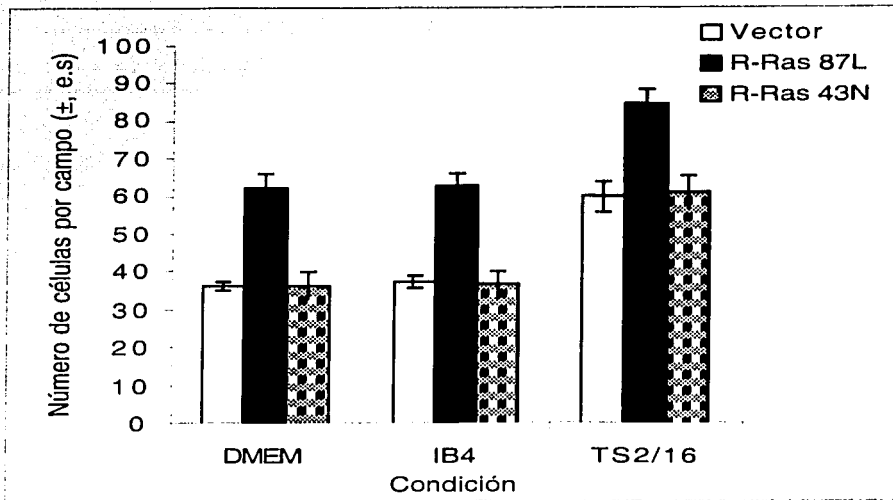


TESIS CON
 PATRÓN DE ORIGEN

Figura 14.- Migración de células C33 a través de colágena I. Las células transfectadas con el vector (Vector), al igual que las células transfectadas con R-Ras activa (R-Ras 87L) y las células transfectadas con la forma negativa de R-Ras (R-Ras 43N) fueron incubadas por cinco minutos con el anticuerpo IB4 a la misma concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$, previo al periodo de incubación de 24 horas. Se muestra el promedio \pm error estándar de cinco campos observados aleatoriamente de tres experimentos realizados.

Con la finalidad de comparar la migración celular bajo todas las condiciones anteriores, se realizó un experimento incluyendo: las células que no se incubaron con anticuerpo (considerados controles), células incubadas con el anticuerpo TS2/16 y células incubadas con el anticuerpo IB4 (Fig. 15).

La migración de los tres tipos celulares considerados control (sin agregar anticuerpo alguno), es igual a la migración de los tres tipos celulares que fueron incubadas con el anticuerpo IB4 ($p > 0.05$). Al incubar las células C33 con el anticuerpo TS2/16 ocasiona que la migración se incremente en los tres tipos celulares y que sea mayor a la migración de las células control ($p < 0.004$).



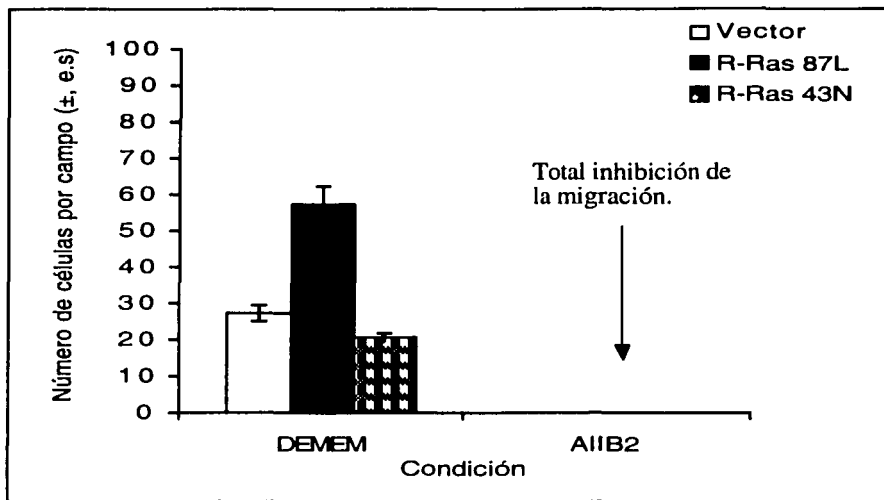
TESIS CON
 FALLA DE...

Figura 15.- Migración de células C33 a través de colágena I. Las células transfectadas con el vector (Vector), al igual que las células transfectadas con R-Ras activa (R-Ras 87L) y las células transfectadas con la forma negativa de R-Ras (R-Ras 43N) fueron incubadas por cinco minutos con el anticuerpo IB4, ó con el anticuerpo TS2/16 ó en medio DMEM a una concentración de 30µg/ml, previo al periodo de incubación de 24 horas. Los datos son promedios ± error estándar de cinco campos observados aleatoriamente de tres experimentos realizados.

Los resultados mostrados en las figuras 13, 14 y 15 nos señalan que el incremento en la migración de los tres tipos celulares no se debe a un efecto inespecífico del anticuerpo TS2/16. Además muestran que al añadir el anticuerpo TS2/16 a las células epiteliales de cervix, dicho anticuerpo activa las integrinas de la familia β1, reflejándose tal efecto en un incremento de la migración celular.

Para probar que el incremento en la migración celular al incubarse las células con el anticuerpo TS2/16 se debe a que este anticuerpo tiene un efecto activador y no inhibitorio sobre las integrinas de la familia β1 que unen a colágena I, las tres variantes celulares fueron incubadas con el anticuerpo AIIB2, el cual se une a las integrinas de la familia β1. En ensayos realizados en el mismo laboratorio pero con otro tipo celular se comprobó el efecto inhibitorio del anticuerpo AIIB2 sobre las integrinas de la familia β1. Las células C33 fueron incubadas por cinco minutos con el anticuerpo AIIB2, previo a la incubación por 24 horas y se siguió el protocolo ya establecido para evaluar la migración celular.

La migración de los tres tipos celulares consideradas control se mantiene sin cambios ($p > 0.05$). Sin embargo, la migración de las tres variantes celulares al ser incubadas con el anticuerpo AIIB2 es nula ($p < 0.0002$) (Fig. 15). Lo que prueba que el anticuerpo TS2/16 activa integrinas en los tres tipos de células y que además promueve una mayor migración de las células que expresan R-Ras 87L (ver figuras 12 y 15).



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

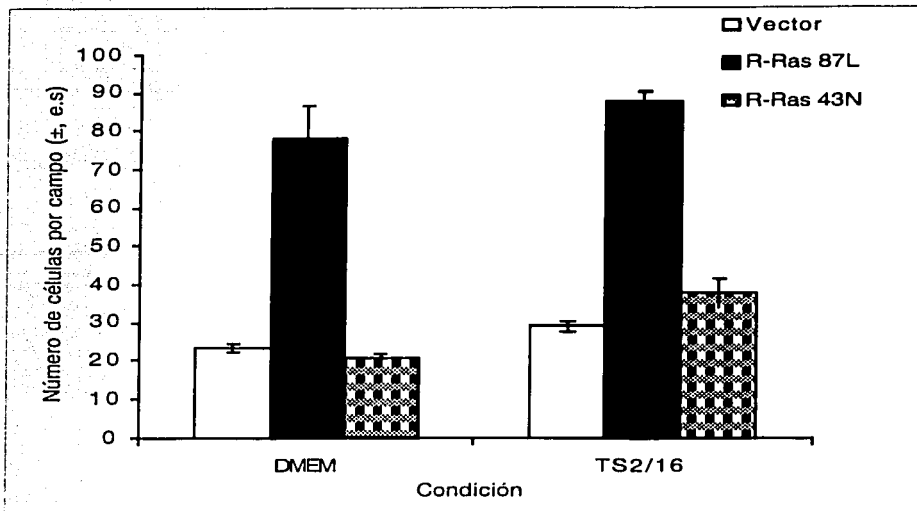
Figura 16.- Migración de células C33 a través de colágena I. Las células transfectadas con el vector (Vector), al igual que las células transfectadas con R-Ras activa (R-Ras 87L) y las células transfectadas con la forma negativa de R-Ras (R-Ras 43N) fueron incubadas por cinco minutos con el anticuerpo AIIB2 previamente al periodo de incubación de 24 horas. Los datos son promedios \pm error estándar de cinco campos observados aleatoriamente de tres experimentos realizados.

6.3.2 Posterior a los procesos de adhesión y extensión, las células de cervix que expresan R-Ras activa, migran mas, después de activar una mayor fracción de integrinas de la familia $\beta 1$.

Con la finalidad de apreciar el efecto del anticuerpo TS2/16 sobre las integrinas $\beta 1$, una vez de que las células C33 se han adherido y comenzado el proceso de extensión celular, se efectuaron ensayos de migración donde primero se dejaron migrar las células durante cuatro horas a 37 °C. Posteriormente a las células se les agregó el anticuerpo TS2/16 a una concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$ y las células fueron incubadas por 20 horas a 37 °C.

Después de seguir el procedimiento anterior, no se aprecian diferencias en la migración de los tres variantes celulares considerados controles y las células que fueron incubadas con el anticuerpo TS2/16 ($p > 0.05$) (Fig. 17). Aún siguen migrando en mayor proporción, las células con R-Ras 87L que los dos tipos de células restantes ($p < 0.008$).

Esto sugiere que una vez que las células C33 han llevado acabo los procesos de adhesión y extensión celular (elongación), y comenzado el proceso migratorio, no requieren de una activación de más integrinas de la familia $\beta 1$ por parte del anticuerpo TS2/16 para completar su migración. Al menos, después de que han comenzado su proceso migratorio por un lapso de tiempo de cuatro horas.



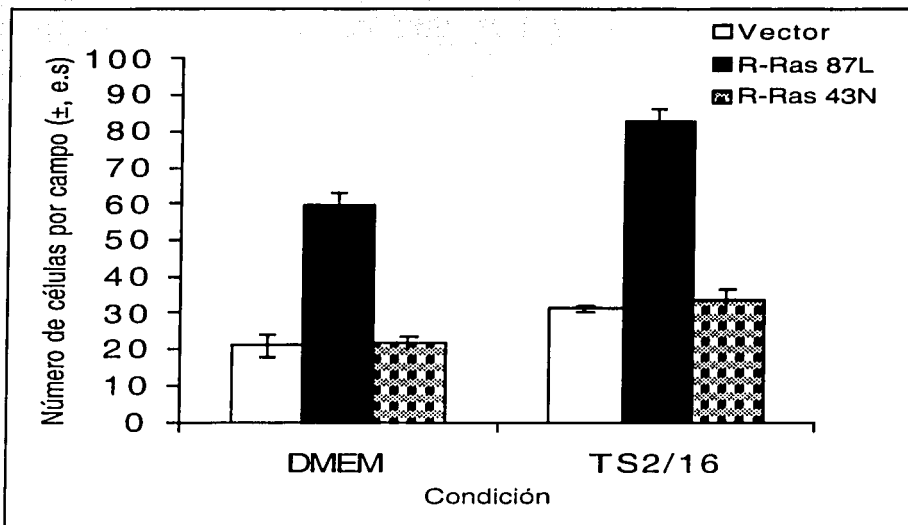
TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figura 17.- Migración de células C33 através de colágena I. Las células transfectadas con el vector (Vector), al igual que las células transfectadas con R-Ras activa (R-Ras 87L) y las células transfectadas con la forma negativa de R-Ras (R-Ras 43N) fueron incubadas por cuatro horas sin ningún anticuerpo. Posterior a este periodo, fue adicionado a las células el anticuerpo TS2/16 a una concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$ y finalmente las células C33 fueron incubadas por 20 horas a 37 °C. Los datos son promedios \pm error estándar de cinco campos observados aleatoriamente de dos experimentos realizados.

Tomando en cuenta los resultados anteriores, en los cuales no se observó un efecto directo del anticuerpo TS2/16 sobre la migración de las células C33, una vez que estas han llevado acabo el proceso de adhesión e iniciado los procesos de extensión y migración, se procedió a incubar las tres variantes celulares por un periodo de tiempo menor sin anticuerpo alguno (dos horas) antes de agregar el anticuerpo TS2/16. Después, a las células C33 se les adicionó el anticuerpo TS2/16 a una concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$, y finalmente las células fueran incubadas por 22 horas más. Con esto se pretendía evaluar el efecto del anticuerpo TS2/16 propiamente sobre la migración de las células C33.

La migración de los tres tipos de células consideradas controles se mantiene ($p > 0.05$). Siendo mayor la migración alcanzada por las células que expresan R-Ras 87L ($p < 0.002$). Una vez que el anticuerpo TS2/16 es agregado a las células C33 y después de que estas mismas células son incubadas por un periodo de tiempo de dos horas, se observa que se incrementa la migración de las células que expresan R-Ras 87L y R-Ras 43N ($p < 0.01$).

Por otro lado, el anticuerpo TS2/16 no tiene un efecto significativo sobre la migración de las células que portan el vector vacío ($p > 0.05$) (Fig. 18).



TESIS CON
FALLA DE CALIFICACION

Figura 18.- Migración de células C33 a través de colágeno I. Las células transfectadas con el vector (Vector), al igual que las células transfectadas con R-Ras activa (R-Ras 87L) y las células transfectadas con la forma negativa de R-Ras (R-Ras 43N) fueron incubadas por dos horas sin ningún anticuerpo. Posterior a este periodo, fue adicionado a células el anticuerpo TS2/16 a una concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$ y finalmente las células fueron incubadas 22 horas a 37 °C. Los datos son promedios \pm error estándar de cinco campos observados aleatoriamente de dos experimentos realizados.

Los resultados de las figuras 18 sugieren que una vez que las células C33 han concluido su proceso de extensión, pueden reclutar nuevas integrinas en estado activo y aumentar con ello su migración. Siendo la activación de las nuevas integrinas en periodos cercanos al inicio del proceso migratorio. Al menos esto se puede notar en las células que expresan R-Ras 87L y R-Ras 43N.

6.3.3 R-Ras regula la migración de las células de cervix mediante la participación de la enzima PI 3-Cinasa.

Como está determinado que ciertas mutantes activas de R-Ras activan a la enzima PI 3-K en algunos tipos celulares [Berrier, et al., 2000; Rincón-Arano, et al., 2003], nos interesaba saber si el proceso de migración mediado por R-Ras en las células C33, era dependiente de la enzima PI 3-K. Para ello se realizaron ensayos de migración, donde se incubaron las tres variantes celulares con el inhibidor de la enzima PI 3-K LY294002 a 50 μ M.

La migración de los tres tipos celulares se mantiene en colágena I. Siguen migrando en mayor proporción las células con R-Ras 87L ($p < 0.002$). Después de que las células son incubadas con el inhibidor de la enzima PI 3-K, la migración de las células que expresan R-Ras activa decrece significativamente ($p < 0.01$). Por su parte, las células que sólo contienen el vector y las células que expresan R-Ras 43N, no presentan variación en su patrón de migración ($p > 0.05$) (Fig. 19).

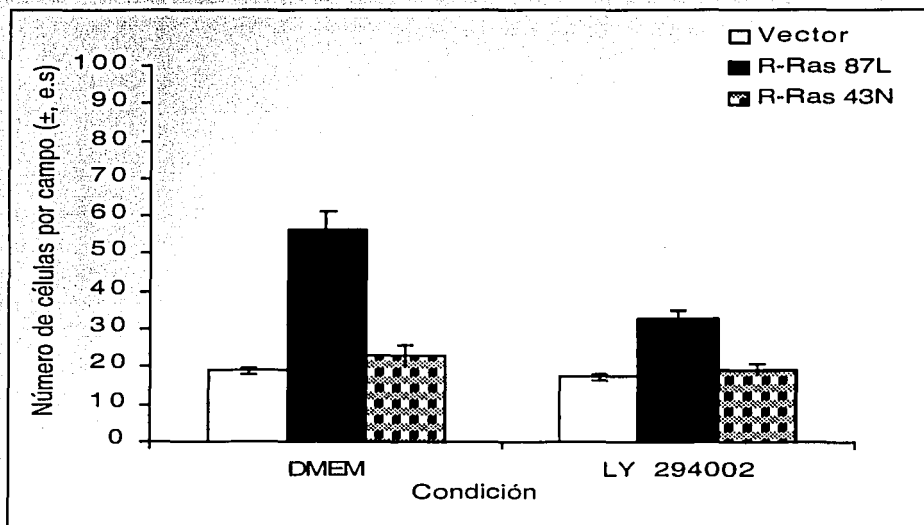


Figura 19.- Migración de células C33 através de colágena I. Las células transfectadas con el vector (Vector), al igual que las células transfectadas con R-Ras activa (R-Ras 87L) y las células transfectadas con la forma negativa de R-Ras (R-Ras 43N) fueron incubadas por 30 minutos con el inhibidor de la enzima PI 3-Cinasa LY294002 a una concentración de 50 μ M. Posteriormente las células fueron incubadas por un periodo de tiempo de 24 horas. Los datos son promedios \pm error estándar de cinco campos observados aleatoriamente de tres experimentos realizados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En base a los resultados anteriores, pensamos que muy posiblemente, la enzima PI 3-K está siendo activada por R-Ras 87L en las células C33. Por lo que el proceso migratorio de las células C33 que expresan R-Ras 87L es dependiente de la enzima PI 3-K. Esto sugiere además que la(s) vía(s) de señalización en las cuales participa R-Ras, tiene una gran relevancia PI 3-K. Al menos en los procesos de extensión y migración de las células C33 mediados por R-Ras, si es notoria la relevancia de PI 3-K.

7 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los procesos celulares como la adhesión, la extensión y la migración, son procesos mutuamente excluyentes e interdependientes. Es decir, son procesos claramente diferentes entre sí, pero a su vez mantienen una interrelación muy estrecha. Para que se efectúe la extensión celular es necesario que se lleve a cabo el proceso de adhesión. Así mismo, para que el proceso migratorio se lleve a cabo, es fundamental que la célula presente un cierto grado de extensión. Durante el proceso migratorio se establece una diversa gama de interacciones célula-célula o célula-sustrato, lo que promueve que la migración sea regulada por la forma en que se da la adhesión celular [Lauffenburger, et al., 1996].

Se ha descrito en la literatura que al expresar una forma activa de R-Ras en células de fibroblastos, se observa, en las células, que las integrinas incrementan su afinidad por moléculas de matriz extracelular. Este incremento en la afinidad de las integrinas se traduce en un aumento en la adhesión [Zhang, et al., 1996]. La pregunta principal del presente trabajo consistía en saber si la expresión de una forma activa de R-Ras en células de epitelio de cervix humano favorecía su migración. Los pasos previos al proceso migratorio de una célula a través de moléculas de la matriz extracelular son: en primer lugar, la adhesión y en segundo lugar, la extensión. Para responder la pregunta, se comenzó realizando ensayos de adhesión celular en placas de 96 pozos recubiertas previamente con proteínas de matriz extracelular como fibronectina y colágena I. Tres tipos de células de una línea de epitelio cervico uterino fueron utilizadas. El primer tipo fue transfectado sólo con un vector. En dicho vector fue donde se logró expresar R-Ras tanto en su forma activa (R-Ras 87L), como en su forma dominante negativa (R-Ras 43N). El segundo tipo celular correspondió a las células que expresaban R-Ras 87L. El tercer tipo correspondió a las células que expresaban R-Ras 43N. Con lo anterior se pensó que se obtendría información respecto a la participación de R-Ras en el proceso adhesión-extensión-migración de las células de epitelio cervico uterino.

En los ensayos de adhesión efectuados a una hora, se esperaba que las células que expresaban la forma positiva de R-Ras se adhirieran más a fibronectina y colágena I que los dos tipos restantes de células. El hecho de que la adhesión alcanzada por los tres tipos

celulares en colágena I y en fibronectina no mostró cambios entre los tres tipos celulares, puede significar que R-Ras no tiene un efecto sobre las integrinas que reconocen a tales moléculas de la matriz extracelular. O también nos puede sugerir que el tiempo de incubación (1 hora) no es suficiente para ver el posible efecto de R-Ras sobre las integrinas que median la adhesión a las moléculas de MEC en estas células. Para dilucidar la posible participación de R-Ras en la adhesión celular, los ensayos de adhesión se efectuaron por dos horas. Después de este tiempo, sí se apreciaron diferencias en la adhesión a fibronectina y a colágena I de los tres tipos celulares. Hay un incremento significativo en la adhesión a fibronectina de las células que expresan R-Ras activa con respecto a las células que expresan la dominante negativa de R-Ras y las células que portan el vector. Asimismo, las células con R-Ras 87L tienen mayor adhesión a colágena I, con respecto a la adhesión alcanzada por las células con el vector y las células con R-Ras 43N. Lo cual indica que R-Ras sí tiene un efecto sobre las integrinas de las células de cervix, sólo que para visualizar su efecto, se requieren de tiempos más largos de unión al sustrato de las integrinas.

Si se compara la adhesión de las células que expresan la forma activa de R-Ras alcanzada sobre fibronectina y sobre colágena I, se aprecian dos casos: en el primero la adhesión sobre fibronectina aumenta cuando se pasa a dos horas y en el segundo, la adhesión sobre colágena I se mantiene al pasar de una a dos horas. Esto nos habla de que la participación de R-Ras en la adhesión celular es dependiente de la molécula de adhesión a la cual se une la célula. Por lo que la actividad de R-Ras en la célula de cervix es reflejada de una forma diferencial y es dependiente del tipo de integrinas involucradas en el reconocimiento del sustrato.

Un aspecto muy interesante que sobresale después de incubar las células de cervix por una y dos horas en ambos sustratos, es que las células que portan el vector no muestran cambios significativos en la adhesión. Es decir, mantienen su grado de adhesión. Por lo que puede ser debido a que la relación integrina-ligando no es modificada por el tiempo de exposición. En lo que respecta a la adhesión de las células que expresan R-Ras 87L, da la impresión de que al expresar las células la forma activa de R-Ras, efectivamente se favorece un cambio en el estado de afinidad de las integrinas involucradas en la adhesión celular.

Principalmente en aquellas integrinas que se unen a fibronectina ($\alpha 5 \beta 1$), como ya fue reportado en otros tipos celulares.

En el caso de las células que expresan la forma dominante negativa de R-Ras, aparte de presentar diferencias entre sí, tanto en la adhesión a fibronectina como a colágena I, disminuyen sus niveles de adhesión alcanzados en una hora al cambiar el ensayo a dos horas. Esto puede significar que en las células de cervix, R-Ras en su forma negativa (R-Ras 43N) está cumpliendo con una función antagonista a la forma activa de R-Ras (R-Ras 87L). Lo cual se refleja en los niveles bajos de la adhesión alcanzados por las mismas células. En otras palabras, la disminución en la adhesión de las células con R-Ras 43N, a pesar de que estas células se encuentran adheridas al sustrato, hace suponer que en estas células, no se refuerza la relación sustrato-integrina-citoesqueleto. Por lo que quizás no se desencadenan en el interior de las células señales de sobrevivencia que ayudan a conservar o incrementar la adhesión celular [Lee, et al., 1993; Schwarzbauer, 1997]. Quizás lo anterior sirva como explicación del porque las células se adhieren más a un sustrato que a otro. Teniendo en cuenta que cuentan con igual proporción de receptores.

En reportes previos se menciona que al expresar en células formas activas de Ras y de R-Ras se promueve un incremento en la extensión de las células. Esta extensión es dependiente de la enzima cinasa PI 3-K [Berrier, et al., 2000; Khwaja, et al., 1997; Marte, et al., 1996; Rodríguez-Viciana, et al., 1997]. En otros reportes se menciona que al disminuir la extensión de las células modificando la región citoplásmica de la cadena B1 de las integrinas, y posteriormente transfectando las células con una forma activa de R-Ras, las células recuperan su grado de extensión [Berrier, et al., 2000].

Tomando en cuenta lo anterior y que R-Ras activa incrementa la adhesión sobre fibronectina y mantiene la adhesión sobre colágena I de las células de cervix, la siguiente pregunta que nos hicimos fue ver si R-Ras promovía la extensión celular de estas células sobre los mismos sustratos. Las células que expresan la forma activa de R-Ras se extendieron más sobre fibronectina y colágena I que los otros dos tipos celulares. Las células con R-Ras activa extendidas alcanzan un porcentaje de 50%, mientras que el porcentaje de extensión de las células extendidas con el vector vacío o con R-Ras 43N, solo llega a 30%. Esto es tanto en

fibronectina como en colágena I. La extensión de las células con R-Ras 87L es igual sobre ambos sustratos. Esto significa que R-Ras favorece la extensión de las células de cervix sobre fibronectina y colágena I. Todo parece señalar que la participación de R-Ras 87L en la extensión celular es a través de las integrinas que modulan la adhesión celular. El proceso de extensión de las células de cervix de alguna manera muestra que a pesar de que los procesos de adhesión y extensión son interdependientes, estos son regulados por R-Ras con la participación de las integrinas.

Como R-Ras tiene participación en procesos previos a la migración celular, tales como la adhesión y extensión, el siguiente cuestionamiento recayó en saber si R-Ras participaba en la migración de las células de cervix. Aunque las células de cervix sólo migraron sobre colágena I; se aprecia claramente que las células con R-Ras 87L migran en mayor grado. Esto sugiere que efectivamente R-Ras tiene ingerencia en la migración de las células de cervix. Por un lado se observó que las células con R-Ras 87L se adhirieron más sobre fibronectina, pero por otro lado solo migraron y en mayor grado sobre colágena I. Lo anterior pareciera ser una paradoja. Dado que se hubiese esperado que la migración celular guardara concordancia con la adhesión y por ende la migración hubiera sido mayor sobre fibronectina. Esto resulta muy interesante debido que al parecer en las células de cervix que expresan R-Ras activa, se estimula un tipo de integrinas necesario para incrementar la adhesión y otro tipo diferente de integrinas para el proceso migratorio. Lo cual hace pensar que tiempos más largos de unión al sustrato son requeridos por parte de las integrinas para desencadenar señales que promuevan la migración celular. Quizás el hecho de permanecer mayor tiempo en contacto con el sustrato desencadene en la célula a través del sistema sustrato-integrina-citoesqueleto, fuerzas contráctiles diferentes a las originadas cuando la integrina se une al sustrato por tiempos más cortos. Posiblemente a esto se deba la diferencia en la actividad de un cierto tipo de integrinas en la adhesión celular y la actividad de otro tipo de integrinas en la migración celular. Por lo que quizás el factor tiempo de unión al sustrato por parte de las integrinas pueda conllevar a una modulación en la actividad de diferentes integrinas. [Shimizu, et al., 1996].

Para confirmar la participación de las integrinas en la migración de las células de cervix, las células fueron incubadas con un anticuerpo que reconoce a las integrinas de la familia $\beta 1$. Esto originó que los tres tipos celulares después de ser incubadas con el anticuerpo TS2/16 (anti-integrina $\beta 1$) aumentaran su migración. A pesar del incremento en la migración, se mantiene el patrón ó tendencia de la migración en los tres tipos de células. Es decir, las células con R-Ras activa migran en mayor grado que los dos tipos celulares restantes, quienes a su vez no muestran diferencias entre sí. Después de que las células de cervix se incubaron con los anticuerpos W6/32 (anti-moléculas MHC clase I) e IB4 (anti-integrinas $\beta 2$) irrelevantes en el proceso migratorio, no hubo diferencias en el patrón migratorio de los tres tipos celulares. Por lo que se infirió que el efecto del anticuerpo TS2/16 sobre las integrinas de la familia $\beta 1$ era activador y no inhibitorio. Para determinar la actividad del anticuerpo TS2/16 sobre las integrinas $\beta 1$ de las células de cervix, las células se incubaron con el anticuerpo AIIB2, quien a su vez también reconoce a las integrinas de la familia $\beta 1$. Al agregar el anticuerpo AIIB2 la migración de los tres tipos de células se inhibe en su totalidad. Esto hace suponer que efectivamente el anticuerpo TS2/16 activa las integrinas $\beta 1$. Aunque directamente no fue determinado el grado de activación de las integrinas $\beta 1$ al agregar el anticuerpo TS2/16, la información que arrojan los experimentos previamente descritos, apuntan hacia esa dirección. Considero que sería importante llevar a cabo ensayos, como por ejemplo una citometría de flujo, que permitan determinar el estado de activación de las integrinas en las células de cervix, después de que el anticuerpo TS2/16 es agregado. O bien, quizás sería conveniente utilizar anticuerpos que reconozcan a las integrinas en su estado activo y determinar el efecto del anticuerpo TS2/16 en las integrinas de las células de cervix. Como ya fue descrito anteriormente, la función activadora del anticuerpo TS2/16 sobre las integrinas $\beta 1$ se ha reportado en líneas celulares de melanoma (DX3), neuroblastoma (NB100), eritroleucemia (K562) y células de pecho (MCF-10A) [Luque, et al., 1994; Plopper, et al., 2000; Tsuchida, et al., 1997]. El hecho de que se mantenga el patrón de migración después de agregar el anticuerpo TS2/16, sugiere que, de alguna forma R-Ras tiene un efecto sobre las integrinas $\beta 1$. El efecto de R-Ras sobre las integrinas $\beta 1$ puede notarse en el hecho de que las células con la forma activa de R-Ras

migran más que las células con el vector vacío y la forma negativa de R-Ras, aún después de activar las integrinas con el anticuerpo TS2/16. Muy posiblemente R-Ras tiene un efecto sobre la integrina $\alpha 5\beta 1$ que se une a colágena I.

El incubar las células de cervix por cinco minutos con el anticuerpo TS2/16 y posteriormente evaluar la migración incubando las células por 24 horas, aunado al hecho de que tal anticuerpo estaba presente durante todo el ensayo de migración; nos llevó a pensar que el efecto activador del anticuerpo TS2/16 se estaba llevando a cabo desde los procesos previos a la migración de las mismas células, como su adhesión y su extensión. Por lo que para ver el efecto del anticuerpo TS2/16 sobre las integrinas $\beta 1$ involucradas propiamente en el proceso migratorio, el anticuerpo fue agregado a las células de cervix, después de que las células se habían incubado por 2 y 4 horas. Cuando el anticuerpo fue adicionado a las células después de que estas mismas habían iniciado su migración por 2 horas, persiste la tendencia en las células con R-Ras 87L a incrementar su migración sobre Colágena I. Bajo estas condiciones, las células que expresan R-Ras 43N también tienden a incrementar su migración después de ser estimuladas con el anticuerpo TS2/16. Cuando el anticuerpo TS2/16 se adiciona a las células una vez que las mismas han sido incubadas por cuatro horas, se aprecia una tendencia en las tres variantes celulares a aumentar su migración, aunque no hay diferencias significativas en el patrón migratorio de los tres tipos de células. Quizás sea necesario hacer más repeticiones del ensayo ó utilizar una metodología diferente para poder dilucidar el papel del anticuerpo TS2/16 una vez que las células han comenzado su proceso migratorio. Se aprecia claramente que la acción del anticuerpo TS2/16 en las integrinas de las células de cervix, puede revertir el efecto de R-Ras 43N. Lo cual puede significar que las integrinas involucradas en la migración celular, son activadas en un cierto rango de tiempo después de haber alcanzado el reconocimiento del sustrato. Esto además sugiere que la actividad de las integrinas $\beta 1$ puede ser modulada en su grado de actividad de manera temporal. Es decir, que las integrinas $\beta 1$ pasan por diversos estados de actividad, que son dependientes del tiempo de unión al sustrato.

En ensayos realizados en el laboratorio se detectó la presencia de PI 3-K en su forma activa en las células con R-Ras activa. Además, al realizar ensayos de extensión celular e

incubar las células con el inhibidor de PI 3-K LY294002, se vió que disminuía la extensión alcanzada por las mismas células [Rincón-Arano et al, 2003]. Así que resultaba interesante dilucidar el posible papel de PI 3-K en el proceso migratorio de las células de cervix. Para lo cual, dichas células fueron incubadas con el mismo inhibidor de PI 3-K utilizado durante los ensayos de extensión. Al evaluar el papel de PI 3-K agregando el inhibidor LY294002, no hay diferencias significativas en la migración de las células que portan el vector y las células que expresan la dominante negativa de R-Ras. Por su parte las células con R-Ras activa, disminuyen su migración aproximadamente en un 50 %. Esto significa que los procesos de extensión y migración celular modulados por R-Ras, son dependientes de la enzima PI 3-K [Rincón-Arano et al, 2003]. Como la migración de las células con R-Ras activa se abate a la mitad y no alcanza niveles basales, sugiere que posiblemente hay otras moléculas diferentes a PI 3-K en la vía de señalización de R-Ras y que muy posiblemente tienen participación en el proceso migratorio. O bien, puede significar también que en la migración de las células de cervix, participan moléculas distintas a PI 3-K que forman parte de otra(s) vía(s) de señalización diferente(s) a la(s) originada(s) por R-Ras. Un claro ejemplo puede ser la participación de GTPasas de la familia Rho. Dado que las GTPasas Rho modulan procesos como la adhesión al sustrato y la adhesión célula-célula. Particularmente a este tipo de GTPasas se les ha asociado con la regulación del citoesqueleto y por ende adquieren gran relevancia en la migración celular [Ridley, 2001].

Por un lado R-Ras en su estado activo desencadena una vía de señalización de la cual PI 3-K forma parte y que tal vía se dirige hacia el exterior de la célula a través de integrinas, siendo llamada señalización de adentro hacia afuera. Por otro lado se promueve una vía de señalización en dirección contraria llamada de afuera hacia dentro, cuando se activan las integrinas $\beta 1$ con el anticuerpo TS2/16. Aunque se ha reportado que por ambas vías se activa la enzima PI 3-K [Shimizu, et al., 1996], nuestros resultados sugieren fuertemente que esto no se cumple en las células de epitelio de cervix. Lo cual quiere decir que al activar un tipo determinado de integrinas con el anticuerpo TS2/16, no forzosamente se trata del tipo de integrinas que desencadenan la señal adecuada para la activación de PI 3-K. Además es importante hacer distinción en las vías de señalización involucradas. Una vía parte de R-Ras

activa y otra vía se origina al estimular con el anticuerpo TS2/16. Se debe tomar en cuenta el tipo celular que se está manejando, ya que aunque se ha visto que la activación de PI 3-K mediado por integrinas se cumple en monocitos, el metabolismo de un monocito no es igual al metabolismo de una célula epitelial. ¿De que forma participa cada vía en el proceso de migración celular?. Es complicado definirlo. Lo que parece claro es que la activación de las integrinas $\beta 1$ con el anticuerpo TS2/16 tiene un efecto sumatorio en el proceso migratorio de las células epiteliales de cervix, aunado a la participación de R-Ras activa.

La adhesión de la célula a un sustrato desencadena en su interior señales de sobrevivencia. Los procesos de transducción de señales se inician através de la participación de ciertos receptores de membrana, desencadenándose una cascada de señalización que involucra una gran gama de proteínas, dentro de las que se encuentran ciertas proteínas cinasas y que desembocan en cambios en la morfología celular y expresión génica [Macara, et al., 1996]. Para Ras está definido que su receptor corresponde a un receptor de proteínas cinasas de tirosinas (RTKs). Por medio de la estimulación de los receptores RTKs, se activa la vía de señalización de las MAP cinasas (cinasas activadas por mitógenos). Aunque R-Ras es una proteína que guarda una estrecha relación con los receptores de adhesión como son las integrinas, no se ha determinado que tipo de receptor tiene. En las células epiteliales de cervix, R-Ras por un lado incrementa la adhesión de dichas células a moléculas de la matriz extracelular por medio de la interacción con las integrinas. Por otro lado R-Ras es capaz de activar una cascada de señalización en la cual se recluta PI 3-K y se promueve con ello la extensión celular. Reflejándose ambos aspectos en el aumento de la migración de las mismas células.

Se han detectado mutaciones en los genes que codifican para las GTPasas de la familia Ras en carcinomas de cervix. Específicamente de las proteínas H-Ras, N-Ras y K-Ras. Estas mutaciones se han correlacionado con un avance en el grado patológico de la enfermedad. En el caso de nuestro estudio, se logró expresar una forma activa de R-Ras en células de epitelio de cervix. La expresión de la forma activa de R-Ras permite ver el papel que juega R-Ras en los procesos de adhesión, extensión y migración de las células epiteliales de cervix.

A manera de conclusión, se puede decir que R-Ras en las células de cervix: aumenta su adhesión a fibronectina, también favorece su extensión sobre fibronectina y colágena I, y finalmente incrementa su migración sobre colágena I. Al modificar el nivel de expresión y la estructura de la GTPasa R-Ras en las células de cervix, claramente se aprecian cambios en las células de cervix que se asemejan mucho a los adquiridos por una célula cancerosa. Tomando en cuenta estos resultados, es por ende, relevante conocer como es que R-Ras modula ó participa en los procesos celulares como adhesión, extensión y migración. Procesos que presentan modificaciones sustanciales en un cáncer. Esta información podrá a futuro ayudar a controlar la actividad de R-Ras y así evitar una patología como lo es el carcinoma de cervix. Padecimiento que puede ser originado o coadyuvado al presentarse una mutación en una GTPasa como R-Ras.

8 BIBLIOGRAFIA

Abbas, A. K., Lichtman, A. H. y Pober, J. S. (2000). Capítulo 4: The Major Histocompatibility Complex. En: *Cellular and molecular immunology* Fourth Edition. W.B. Saunders Company. New York. p. 63-78.

Adjei, A. A. (2001). Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *Journal National Cancer Institute* **14**: 1062-1074.

Albelda, S. M. y Buck, C. A. (1990). Integrins and other cell adhesion molecules. *The FASEB Journal* **4**: 2868-2880.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. (1996). *Biología Molecular de la Célula*. Tercera Edición. Ediciones Omega, S.A. Barcelona. pp. 1387.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. Fourth. Garland Science Taylor & Francis Group. New York. pp. 1463.

Banyard, J. y Zetter, B. R. (1999). The role of cell motility in prostate cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* **17**: 449-458.

Berrier, A. L., Mastrangelo, A. M., Downward, J., Ginsberg, M. y LaFlamme, S. E. (2000). Activated R-Ras, Rac1, PI3-Kinase and PKC ϵ Can Each Restore Cell Spreading Inhibited by Isolated Integrin β 1 Cytoplasmic Domains. *The Journal of Cell Biology* **151**: 1549-1560.

Bourne, H. R., Sanders, D. A. y McCormick, F. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* **348**: 125-132.

Cantrell, D. A. (2001). Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *Journal of Cell Science* **114**: 1439-1445.

Carney, D. y Sikora, K. (1990). *Genes and Cancer*. John Wiley & Sons. New York. pp. 348.

Chan, T. O., Rittenhouse, S. E. y Tsichlis, P. N. (1999). AKT/PKB and other D3 Phosphoinositide-Regulated Kinases: Kinase Activation By Phosphoinositide-Dependent Phosphorylation. *Annual Review of Biochemistry* **68**: 965-1014.

Coker, A., Gerasimova, T., King, M., Jackson, K. L. y Pirisi, L. (2001). High-Risk HPVs and Risk of Cervical Neoplasia: A Nested Case-Control Study. *Experimental and Molecular Pathology* **70**: 90-95.

Cooper, G. M. (1995). *Oncogenes*. Second edition. Jones & Bartlett Publishers. Boston Massachusetts. pp. 323.

Darnel, J., Lodish, H. y Baltimore, D. (1990). *Molecular Cell Biology*. second. Scientific American Books. New York. pp. 1105.

De Arcangelis, A. y Georges-Labouesse, E. (2000). Integrin and ECM functions. *Trends in Genetics* **9**: 389-395.

Exton, J. H. (1998). Small GTPases Minireview Series. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 19923.

Fernández-Sarabia, M. J. y Bischoff, J. R. (1993). Bcl-2 associates with the ras-related protein R-ras p23. *Nature* **366**: 274-275.

Goldsby, R. A., Kind, T. J. y Osborne, B. A. (2000). Capítulo 7: The major histocompatibility complex. En: *Kuby Immunology*. W.H.Freeman and company. New York. p. 173-199.

Herrera, L. A. y Ostrosky-Wegman, P. (2001). Do helminths play a role in carcinogenesis? *TRENDS in Parasitology* **17**: 172-175.

Hughes, P. E. y Pfaff, M. (1998). Integrin affinity modulation. *Trends in Cell Biology* **8**: 359-364.

Hynes, R. O. (1992). Integrins: Versatility, Modulation, and Signaling in Cell Adhesión. *Cell* **69**: 11-25.

Kassis, J., Lauffenburger, D. A., Turner, T. y Wells, A. (2001). Tumor invasion as dysregulated cell motility. *Seminars in Cancer Biology* **11**: 105-117.

Keely, P. J., Rusyn, E. V., Cox, A. D. y Parise, L. V. (1999). R-Ras Signals through Specific Integrin α Cytoplasmic Domains to Promote Migration and Invasion of Breast Epithelial Cells. *The Journal of Cell Biology* **145**: 1077-1088.

Khwaja, A., Rodríguez-Viciana, P., Wennström, S., Warne, P. H. y Downward, J. (1997). Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *The EMBO Journal* **16**: 2783-2793.

Kolanus, W. y Seed, b. (1997). Integrins and inside-out signal transduction: convergin signals form PKC and PIP3. *Current Opinion in Cell Biology* **9**: 725-731.

Lauffenburger, D. A. y Horwitz, A. F. (1996). Cell Migration: A Phisically Integrated Molecular Process. *Cell* **84**: 359-369.

Lazcano-Ponce, E. C., Nájera-Aguilar, E. B., Alonso-de-Ruiz, P. K., Cantoral, L. y Hernández-Ávila, M. (1997). The cervical cancer screening programs in Mexico: problems with acces and coverage. *Cancer Causes and Control* **8**: 698-704.

Lee, J., Ishiquira, A. y Jacobson, K. (1993). How do cells move along surfaces? *Trends in Cell Biology* **3**: 366-370.

Lewin, B. (1997). GENES VI. Oxford University Press. New York. pp. 1260.

Lodish, e. a. (1995). Molecular Cell Biology. Third edition. Scientific American Books. New York. pp. 1344.

Lowe, D. G., Capon, D. J., Delwart, E., Sakaguchi, A. Y., Naylor, S. y Goeddel, D. V. (1987). Structure of the Human and Murine R-ras Genes, Novel Genes Closely Related to ras Proto-oncogenes. *Cell* **48**: 137-146.

Luque, A., Sánchez-Madrid, F. y Cabañas, C. (1994). Functional regulation of the human integrin VLA-I (CD49a/CD29) by divalent cations and stimulatory B1 antibodies. *FEBS letters* **246**: 278-284.

Macara, I. A., Lounsbury, K. M., Richards, S. A., MCKiernan, C. y Bar-Sagi, D. (1996). The Ras superfamily of GTPases. *The FASEB Journal* **10**: 625-630.

Macieira-Cohelo, A. E. (2000). Cell Inmortalization. Springer. New York. pp. 207.

Marte, B. M., Rodríguez-Viciana, P., Wennström, S., Warne, P. H. y Downward, j. (1996). R-Ras can active the phosphoinositide 3-kinase but not the MAP kinase arm of the Ras effector pathways. *Current Biology* **7**: 63-70.

McCormick, F. (1995). Ras-Related Proteins in Signal Transduction and Growth Control. *Molecular Reproduction and Development* **45**: 500-506.

Newman, C. M. y Magee, A. I. (1992). Postranslational Processing of the ras superfamily of small GTP-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **1155**: 79-96.

Osada, M., Tolkacheva, T., Li, W., CHan, T. O., Tsihchlis, P. N., Saez, R., Kimmelman, A. C. y CHan, A. M.-L. (1999). Differential Roles of Akt, Rac, and Ral in R-Ras-Mediated Cellular Transformation, Adhesion, and Survival. *Molecular and Cellular Biology* **19**: 6333-6344.

Parkin, D. M. (1998). The global burden of cancer. *Cancer Biology* **8**: 219-235.

Peto, J. (2001). Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* **411**: 390-5.

Plopper, G. E., Huff, J. L., Rust, W. L., Schwartz, M. A. y Quaranta, V. (2000). Antibody-Induced Activation of B1 Integrin Receptors Stimulates cAMP-Dependent Migration of Breast Cells on Laminin-5. *Molecular Cell Biology Research Communications* **4**: 129-135.

Potter, D. M. (1997). Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. World Cancer Research Fund & The American Institute of Cancer Research. Washington, D.C. pp. 670.

Reyes-Reyes, M., Mora, N., Zentella, A. y Rosales, C. (2001). Phosphatidylinositol 3-Kinase mediates integrin-dependent NF- κ B and MAPK activation through separate signaling pathways. *Journal of Cell Science* **114**: 1579-1598.

Ridley, A. J. (2001). Rho GTPases and cell migration. *Journal of Cell Science* **114**: 2713-2722.

Rincón-Arano, H., Rosales, R., Mora, N., Rodríguez-Castañeda, A. y Rosales, C. (2003). R-Ras promotes tumor growth of cervix epithelial cells. *Cancer* **97**: 575-585.

Rodríguez-Viciano, P., Warne, P. H., Khwaja, A., Marte, B. M., Pappin, d., Das, P., Waterfield, M. D., Ridley, A. y Downward, J. (1997). Role of Phosphoinositide 3-OH Kinase in Cell Transformation and Control of the Actin Cytoskeleton by Ras. *Cell* **89**: 457-467.

Rosales, C., O'Brien, V., Kornberg, L. y Juliano, R. (1995). Signal transduction by cell adhesion receptors. *Biochimica et Biophysica Acta* **1242**: 77-98.

Saez, R., Chan, A. M., Miki, T. y Aaronson, S. A. (1994). Oncogenic activation of human R-ras by point mutations analogous to those of prototype H-ras oncogenes. *Oncogene* **9**: 2977-2982.

Saranath, D., Z., K., Tandle, A. T., Dedhia, P., Sharma, B., Contractor, R., Shrivastava, S. y Dinshaw, K. (2002). HPV16/18 Prevalence in Cervical Lesions/Cancers p53 Genotypes in Cervical Cancers Patients from India. *Gynecologic Oncology* **86**: 157-162.

Schwarzbauer, J. E. (1997). Cell migration: May the force be with you. *Current Biology* **7**: R292-R294.

Self, A. J., Caron, E., Paterson, H. F. y Hall, A. (2001). Analysis of R-Ras signalling pathways. *Journal of Cell Science* **114**: 1357-1366.

Shields, J. M., Pruitt, K., McFall, A., Shaub, A. y Der, C. J. (2000). Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends in Cell Biology* **10**: 147-154.

Shimizu, Y. y Hunt, S. W. (1996). Regulating integrin-mediated adhesion: one more function for PI 3-kinase? *Immunology Today* **17**: 565-573.

Stein, G. S., Baserga, R., Giordano, A. y Denhardt, D. T. (1998). Replicative senescence and immortalization. En: *The molecular basis of the cell cycle and growth control.*, Wiley-Liss. New York. p. 348-373.

Taooka, Y., Chen, J., Yednock, T. y Sheppard, D. (1999). The Integrin alpha 9beta 1 Mediates Adhesion to Activated Endothelial Cells and Transendothelial Neutrophil Migration through Interaction with Vascular Cell Adhesion Molecule-1. *J. Cell Biol.* **145**: 413-420.

Tsuchida, J., Ueki, S., Saito, Y. y Takagi, J. (1997). Classification of "activation" antibodies against integrin B1 chain. *FEBS letters* **416**: 212-216.

Valadez, G. V., Sutter, G., José, M. V., García-Carranca, A., Erfle, V., Moreno, M. N., Merchant, H. y Rosales, R. (2000). Human Tumor Growth Is Inhibited by a Vaccinia virus Carrying the E2 Gene of Bovine Papillomavirus. *Cancer* **88**: 1650-1662.

Vojtek, A. B. y Der, C. J. (1998). Increasing Complexity of the Ras Signaling Pathway. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 19925-19928.

Weiderpass, E., Ye, W., Tamimi, R., Trichopolous, D., Nyren, O., Vainio, H. y Adami, H.-O. (2001). Alcoholism and Risk for Cancer of the Cervix Uteri, Vagina, and the Vulva. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **10**: 899-901.

Willett, W. C. (2001). Diet and Cancer: One View at the Start of the Millennium. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **10**: 3-8.

Wright, J. W., Kramár, E. A., Meighan, S. E. y Harding, J. W. (2002). Extracellular matrix molecules, long-term potentiation, memory consolidation and the brain angiotensin system. *Peptides* **23**: 221-246.

Zhang, Z., Vuori, K., Wang, H.-G., Reed, J. C. y Ruoslahti, E. (1996). Integrin Activation by R-Ras. *Cell* **85**: 61-69.