



00381
18
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

"PARTICIPACION DE LOS GENES DE LA
FAMILIA ras EN LA TUMORIGENICIDAD DE
CELULAS NEOPLASICAS HUMANAS"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS (Biología)

P R E S E N T A :

ISABEL ENRIQUE MIRANDA PERALTA

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALEJANDRO GARCIA CARRANCA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1996



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.

A la memoria del joven Emilio Miranda Peralta; estudiante de Medicina cuya vida se vio truncada por el cáncer, y que fue el motivo que dirigió mis inquietudes de investigación hacia el estudio de esta enfermedad.

Agradecimientos.

He de manifestar mi agradecimiento al ***Dr. Fabio Salamanca*** y al ***Dr. Mario Gutiérrez*** por sus comentarios y asesoría durante el desarrollo experimental de la presente tesis. También a la ***Dra. Patricia Ostrosky*** y al ***Dr. Emilio Rojas*** que además de lo anterior, promovieron la realización de algunos experimentos (entre otras cosas) en su laboratorio, lo que permitió concluir este trabajo. A todos ellos, así como al ***Dr. Luis Benítez*** y la ***Dra. Alessandra Carnevale*** les agradezco sus comentarios y sugerencias para mejorar el presente manuscrito. He de reconocer la importante participación de ***Carla Santana*** y ***Salomón Hernández*** en la parte experimental de este trabajo. Por último me siento sumamente agradecido con el ***Dr. Alejandro García Carrancá*** por haberme otorgado todo su apoyo para iniciar, desarrollar y concluir este importante logro.

Indice.

Resumen, 6

Summary, 8

Introducción.

El Cáncer, la tumorigenicidad, y la muerte mitótica, 9

Oncogenes y genes supresores de tumores, 13

El gen c-H-ras, 18

Ras y el cáncer, 21

Ras supresor?, 23

Material y Métodos.

Construcción de los plásmidos que contienen a los genes neo y c-H-ras, 28

Obtención de clonas, 28

Ensayo de tumorigenicidad, 29

Ensayo de incorporación de timidina marcada radioactivamente, 30

Ensayo de incorporación de bromodeoxiuridina, 30

Obtención del DNA, 31

Southern blot, 31

Resultados.

Formación de tumores por diversas líneas celulares en los ratones atímicos desnudos, 32

Supresión de la tumorigenicidad por el gen c-H-ras normal, 33

Las células transfectadas con el gen c-H-ras normal presentan una proliferación disminuida, 39

La expresión anormal del gen c-H-ras induce la muerte mitótica de las células HeLa, 42

Artículo: Induced mitotic death of HeLa cells by abnormal expression of c-H-ras., 42

Discusión, 44

Referencias, 49

Resumen.

El oncogén *c-H-ras* ha sido considerado como un gen dominante cuya presencia es suficiente para inducir la transformación maligna de las células. La línea celular HeLa, establecida a partir de un cáncer cérvico-uterino humano, está constituida por células transformadas que contienen al gen *c-H-ras* mutado y pueden formar tumores en ratones atímicos desnudos. La transfección de el gen *c-H-ras* normal (*c-H-ras^{gly12}*) en estas células induce la generación de diferentes tipos de clonas con distinta capacidad para proliferar e inducir la formación de tumores en ratones atímicos. Algunas de ellas son incapaces de proliferar (y se mueren por catástrofe mitótica); otras proliferan muy lentamente y no desarrollan tumores (al menos por algún tiempo) al ser inyectadas en ratones atímicos desnudos; y otras retienen la capacidad de formar tumores, aunque de menor tamaño en comparación con los controles. En contraste, las células transfectadas con el gen mutado — *c-H-ras^{val12}* — (que sobreviven a la muerte mitótica), desarrollan tumores de mayor tamaño, en comparación con los controles. Además, tanto en las células transfectadas con el gen *c-H-ras* normal como con el mutado, se observó la aparición de células multinucleadas gigantes. Estas células, además de contener núcleos con una gran cantidad de cromosomas, presentan micronúcleos. También se observaron células gigantes con un número impar de núcleos. Adicionalmente, se detectaron alteraciones en algunos parámetros del ciclo celular, observándose la aparición de una subpoblación de células con un contenido anormal de DNA. Todos estos datos indican que la expresión aumentada de *c-H-ras* normal, o bien la transfección de un gen mutado, ocasionan la catástrofe mitótica y muerte de una subpoblación de células HeLa. Los resultados sugieren que Ras interfiere con los controles del ciclo celular, de la morfología celular,

del número de núcleos y cromosomas por célula, y que el gen normal puede suprimir (al menos transitoriamente) la tumorigenicidad de las células HeLa.

Summary.

C-H-*ras* oncogene has been considered as a dominant gene because cellular transformation is observed after transfection of its mutant form in normal cells. HeLa cell line, established from a human cervical tumor, possess a mutated c-H-*ras* gene and can form tumors in athymic nude mice. Transfection of HeLa cells with normal c-H-*ras* gene (c-H-*ras*^{gly12}) generate several kind of clones: some of them with cell growth arrest (that dies by mitotic catastrophe); others that grow slowly and shows a transitory suppression of tumorigenic phenotype, as assayed in athymic nude mice; and some clones that give rise to small tumors as compared to non-transfected cells. On the other hand, cells transfected with the mutant gene (c-H-*ras*^{val12}) give rise to large tumors as compared to non-transfected cells. Moreover, in both normal or mutated c-H-*ras* transfected cells we observed giant multinucleated cells. These cells, have nuclei with an increased number of chromosomes, and also they have micronuclei. Interestingly, odd numbers of nuclei were found in colonies of these giant cells. In addition, alterations in cell cycle parameters were observed, including the appearance of a subpopulation of cells with an abnormal content of DNA, probably representing dying cells. These data support the notion that abnormal expression of H-*ras* contributes to mitotic catastrophe and death of a subpopulation of HeLa cells. Also the results suggest that Ras is implicated in regulation of cell cycle and metabolic cycle, and that normal Ras can exert a transitory suppression of tumorigenic phenotype in a subpopulation of HeLa cells.

Introducción.

El cáncer, la tumorigenicidad, y la muerte mitótica.

El número de células en los tejidos del organismo está dado por un balance entre la proliferación, la detención del ciclo celular, y la muerte celular programada (apoptosis). El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por una pérdida del control de ese balance, lo que finalmente ocasiona la acumulación de células (como en leucemia linfocítica crónica), o bien la proliferación aumentada (muchas veces en forma maligna); esta última da origen a la formación de tumores (Williams, 1991; Williams y Smith, 1993; Vaux y cols., 1994).

Cuando las células normales de un órgano se disocian para ponerlas en cultivo, se dice que se tienen células primarias. La transferencia y subsecuente multiplicación de estas células en cultivo da origen a las llamadas células secundarias. Éstas se dividen un número determinado de veces (entre 20 - 100), para finalmente morir al cabo de unas cuantas semanas. Sin embargo, algunas células logran pasar esta etapa (periodo critico), y adquieren la capacidad de multiplicarse indefinidamente. La progenie derivada de tales células excepcionales forma lo que se conoce como líneas celulares establecidas, y frecuentemente se les refiere como células inmortalizadas (un ejemplo lo constituye la línea celular CV-1, establecida a partir de células de riñón de simio). Cuando en una célula normal ocurren cambios que la hacen adquirir muchas de las propiedades de crecimiento de las células de cáncer, se dice que ésta ha sufrido el proceso de transformación maligna. Este fenómeno ocurre espontáneamente a una frecuencia de 10^{-5} a 10^{-6} en algunas líneas celulares establecidas como las 3T3. Sin embargo, la transformación ocurre a una elevada frecuencia después de la infección con virus tumorigénicos, o después de la exposición a carcinógenos químicos o radiaciones. Las células transformadas, además de ser

inmortalizadas, presentan las siguientes propiedades: responden muy poco a la inhibición por contacto; pueden crecer a alta densidad celular; frecuentemente presentan una restricción menor para crecer en superficies sólidas; en general requieren bajas concentraciones de suero para su crecimiento; y frecuentemente tienen la propiedad de formar tumores cuando son inyectadas en ratones atímicos desnudos (Watson y cols., 1987). Un ejemplo son las células HeLa, las cuales fueron establecidas a partir de un cáncer cérvico-uterino de humano en 1952 (Gey y cols., 1952).

La muerte de las células puede ocurrir mediante alguno de los siguientes tres procesos: necrosis, apoptosis y muerte mitótica (Figura I). En la necrosis los componentes de las células sufren una degradación rápida que ocurre ante la falta de nutrientes (después de la defunción) o después del traumatismo de alguno de los tejidos. Por el contrario, durante la apoptosis las células se mueren en forma lenta, programada, dándose ésta en tejidos, órganos o células que deben eliminarse durante alguna etapa de la vida (un ejemplo lo constituye la muerte de las células de la región caudal de los renacuajos, las cuales se mueren mediante apoptosis en una etapa del desarrollo embrionario en que se debe perder la cola) (Tomei y Cope, 1991; Williams, 1991; Williams y Smith, 1993; Vaux y cols., 1994). Por otra parte se ha observado que el tratamiento de algunas células con agentes químicos tales como el etopósido (epipodofilotoxina) o agentes físicos como las radiaciones, les induce daño en su DNA y citotoxicidad. Estos eventos culminan en un proceso catastrófico de muerte lenta (denominado *catástrofe mitótica* o *muerte mitótica*), caracterizada por la aparición de poliploidía, fragmentación nuclear y un aumento exagerado del tamaño celular (Lock y Ross, 1990; Zucker y cols., 1991; Chang y Little, 1991; Rodilla, 1993; Tounekti y cols., 1993). Durante este proceso de muerte lenta, la célula pierde el control del ciclo celular, del tamaño celular, del número correcto de cromosomas, del número de núcleos, en pocas

palabras, la célula llega a una catástrofe que la conduce finalmente a la muerte. Cuando se ha

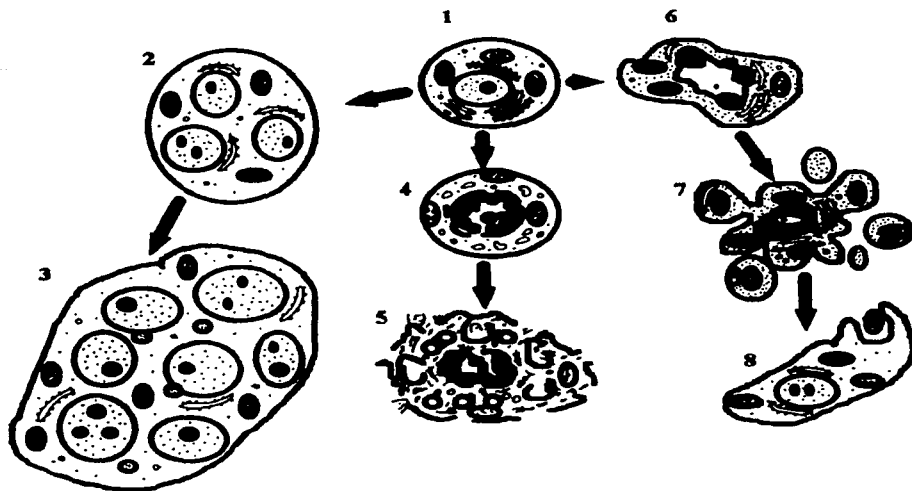


Figura 1. Tres tipos de muerte celular. En el diagrama se ilustran en forma secuencial los cambios ultraestructurales en la muerte mitótica (izquierda), la necrosis (centro) y la apoptosis (derecha). Una célula normal está esquematizada en 1. Al principio de la muerte mitótica (2) la célula empieza a perder el control del tamaño celular así como del número de núcleos y del número de cromosomas por núcleo. Esta célula progresa lentamente (3) hasta presentar un tamaño celular exagerado y la presencia de varios núcleos y micronúcleos para finalmente morir. Por otra parte durante la necrosis temprana en las células de algún tejido dañado (4) se puede observar al núcleo y demás organelos celulares con algún daño así como la presencia de vacuolas. En un estadio tardío (5) ocurre la ruptura de membranas con lo que la célula se desintegra. Finalmente durante la apoptosis temprana (6) la cromatina se compacta, el citoplasma se condensa y ocurre una deformación de las membranas. La progresión rápida (7) conduce a la fragmentación nuclear y al desarrollo de pedúnculos por la membrana celular. Tales estructuras se separan produciendo cuerpos apoptóticos los cuales son fagocitados por las células adyacentes (8). Adaptado de Tomei y Cope (1991).

analizado el ciclo celular de estas células, se ha observado que éstas parecen estar detenidas entre las fases G2 y M (Lock y cols., 1994). Algunos compuestos utilizados para el tratamiento

quimioterápico del cáncer (cis-platino, etopósido) son capaces de inducir la muerte mitótica de las células tumorales.

El problema fundamental en el tratamiento eficaz de los pacientes con cáncer es la semejanza entre las células del tumor y las normales. En tumores sólidos (la forma más frecuente del cáncer), puede ser que procedimientos locales como la cirugía y la radioterapia sean eficaces, pero sólo si las células malignas están confinadas en la zona tratada. Esto ocurre en aproximadamente un tercio de los pacientes con cáncer. Para la mayoría de ellos se requiere alguna forma de tratamiento sistémico selectivo. Aunque se cuenta con muchos fármacos citotóxicos, sólo se cura con ellos a una pequeña proporción de los pacientes; de tal manera que este padecimiento ocupa el segundo lugar como causa de defunción en nuestro país (Velazquez y cols., 1992; Debruyne y Schalken, 1993; Sikora, 1994).

En los casos de cáncer mas frecuentes, como los mamarios o el CaCu (éste último ocupa el primer lugar de incidencia entre las neoplasias que afectan a las mujeres adultas en México, Barroso y cols., 1986), simplemente no han llegado a reproducirse las felices curaciones de la leucemia infantil, por ejemplo. Y eso a pesar de los enormes esfuerzos que se realizan en el desarrollo de nuevos fármacos, de la introducción de las citocinas, de tratamientos con dosis elevadas, e incluso de los procedimientos de rescate de la médula ósea (Wolf, 1993; Sikora, 1994).

En la actualidad, se encuentran bajo investigación a nivel laboratorio, varios procedimientos directamente vinculados con la transferencia de genes. Entre estos están el uso de genes marcadores para detectar enfermedad mínima residual, la producción de novedosas vacunas contra el cáncer mediante la inserción de genes que hacen "visibles" para el sistema

inmunológico del paciente a las células cancerosas, la inserción de genes activadores de fármacos, y la corrección de oncogenes o de genes supresores de tumores (Miller, 1990; Sikora, 1994).

Oncogenes y genes supresores de tumores.

La noción de que los genes se encuentran en la parte central del origen del cáncer surge de tres fuentes: la percepción de la diátesis hereditaria del cáncer; la presencia de cromosomas dañados en las células de cáncer; y la evidencia de que agentes físicos, químicos y biológicos (virus) alteran al DNA de las células conduciéndolas al cáncer (Bishop, 1985).

Existen varias evidencias sobre la predisposición hereditaria del cáncer. En 1969, Frederick Li y Joseph Fraumeni reportaron la existencia de un síndrome familiar, con la característica de cierta predisposición al cáncer, y con un patrón hereditario dominante autosómico. Actualmente es posible reconocer un componente hereditario (cromosoma o gen. como se verá mas adelante) en varios tipos de cáncer como cáncer mamario, osteosarcoma, tumores cerebrales, leucemia, retinoblastoma y diversos carcinomas (Friend y cols., 1986; Hansen y Cavence, 1987; Malsin y cols., 1990; Ponder, 1990; Bell y cols., 1992; Cowley, 1993).

El número correcto de cromosomas (46, diploide) en las células humanas fue establecido en 1956. Cuatro años después, la primera relación entre un cromosoma defectivo y el cáncer fue reportada, cuando Nowell y Hungerford describieron un cromosoma 22 anormalmente corto, el cromosoma "Philadelphia", en pacientes con leucemia granulocítica crónica (Nowell y Hungerford, 1960). Actualmente se sabe que muchos tipos de cáncer, como leucemia, linfoma, neuroblastoma, cancer de pulmón, etc., presentan aberraciones cromosómicas (Yunis y

Hoffman, 1989; Sparkes, 1989 y 1990; Isom y cols., 1991). Los cromosomas pueden alterarse por efecto de agentes físicos y químicos como las radiaciones ionizantes, los agentes alquilantes e hidrocarburos aromáticos entre otros (Ames, 1979; Yunis y Hoffman, 1989). Lo interesante de esto es que los rompimientos cromosómicos generalmente ocurren en sitios específicos de los cromosomas, a los que se ha denominado "sitios frágiles" (Yunis y Hoffman, 1989).

El análisis experimental de los virus que ocasionan cáncer hizo por primera vez manifiestos a los genes del cáncer u oncogenes. Ya desde principios de siglo los trabajos de Ciuffo, de Rous, y de Ellerman y Bang sugirieron la participación de los virus en el cáncer ya que era posible la transmisión de leucemia y sarcoma mediante el uso de filtrados libres de células (Witkowski, 1990). Para fines de la década de los 70s ya se tenían identificados varios tipos de virus causantes de cáncer en diversas especies de animales (Gallo y Wong-Staal, 1982; Gallo, 1983). A partir de uno de ellos, específicamente de un retrovirus causante de sarcoma en aves, se logró aislar al primer oncogén, al cual se le denominó *src* (Stehelin y cols., 1976a). La presencia y sobreexpresión de este gen en la célula es suficiente para activar la proliferación celular. Posteriormente se vio que las células normales, no solo de aves sino de diversas especies, poseen secuencias homólogas al gen *src* (Stehelin y cols., 1976b; Spector y cols., 1978). Este gen codifica para una proteína tirosina cinasa (Collet y Erikson, 1978; Hunter y Sefton, 1980), la cual se localiza en la superficie interna de la membrana celular (Willingham y cols., 1979). Dicha proteína se detectó en un principio únicamente en células tumorales infectadas con el retrovirus del sarcoma de Rous (Brugge y cols., 1977), aunque después se vio que también se expresa en células neuronales normales durante el desarrollo embrionario (Maness y Matten, 1990). Aunque la función normal de la proteína Src no es muy clara, se ha sugerido una participación substancial

en la regulación de la proliferación celular y la diferenciación; de hecho se han generado ratones con una disrupción homocigótica del gen *src* observándose una disminución en la viabilidad neonatal (Cooper y Howell, 1993).

Posteriormente se logró identificar mas genes, que al activarse (por diversas alteraciones moleculares) aceleran el crecimiento celular — oncogenes — y otros que en condiciones normales inhiben o frenan la división celular, pero cuya ausencia o inactivación conduce al cáncer — genes supresores de tumores — (Sager, 1989; Sikora, 1994). Actualmente se conocen mas de 100 genes relacionados con el cáncer en humanos. Estos genes en condiciones normales cumplen con diversas funciones como son: regulan la transcripción, la replicación, la proliferación celular, la diferenciación, el desarrollo embrionario, el ciclo celular, y la muerte celular (Bock y Marsh, 1990; Witkowski, 1990; Klein, 1993b; Müller y cols., 1993; Boulikas, 1994; Duhem y cols., 1994; Hass, 1994; Hoffman y Lieberman, 1994; Laderoute, 1994). A estos genes se les ha clasificado en cinco grupos principales: 1) genes codificantes de factores de crecimiento o de sus receptores: *sis*, *int-2*, *met*, *PDGF*, *EGF*, *FGF*, *TGF*, *ret*, *erb B*, *fms*, *mas*, *kit*, etc.; 2) genes cuyos productos tienen actividad de efectores citoplásmicos: *src*, *abl*, *mos*, *fgr*, *yes*, *raf*, *grb2*, *crk*, MAPs, etc.; 3) proteínas G: *ras*; 4) genes que codifican para proteínas nucleares: *myc*, *myb*, *fos*, *jun*, *mad*, *max*, *ets*, *E1A*, etc.; y 5) genes supresores de tumores: *p53*, *Rb*, *WT*, *APC*, *K-rev*, etc. (Cooper, 1992; Klein, 1993a; Hunter y cols., 1994).

En relación a los genes supresores de tumores, a fines de la década de los 60s se demostró que cuando se fusionan células tumorales de ratón con células normales, las células híbridas resultantes son usualmente no malignas e incapaces de formar tumores en ratones atímicos (Harris y cols., 1969). Algo similar se encontró después en el caso de células humanas

(Stanbridge, 1976). Poco después se observó que la supresión del fenotipo maligno en los híbridos dependía de la retención de cromosomas específicos procedentes de las células normales. Así mismo se detectó que la pérdida de alguno de estos cromosomas en las células híbridas, ocasionaba la generación de revertantes malignas (Stanbridge y cols., 1981). Posteriormente se logró suprimir la tumorigenicidad de las células malignas mediante la introducción de tan solo un cromosoma específico normal, esto con la ayuda de microcélulas (Saxon y cols., 1986; Weissman y cols., 1987; Oshimura y cols., 1990). Actualmente es posible suprimir el fenotipo maligno de las células de cáncer mediante la transferencia de tan solo un gen, procedente de las células normales.

Ya desde la década de los 40s, en un estudio de carcinogénesis experimental se sugirió que el cáncer podría originarse mediante la inactivación de los dos alelos de un gen anticancer (Charles y Luce-Clausen, 1942). Estudios epidemiológicos sobre la incidencia de tumores y su posible herencia han conducido a la conclusión de que se requiere de dos eventos mutacionales para el desarrollo de retinoblastoma (Knudson, 1971). La observación citogenética de que una proporción de estos tumores presentan deleciones del cromosoma 13q14 ha sugerido la posible inactivación de un gen (Yunis y Ramsay, 1978), al que se ha denominado *Rb*. La confirmación de la hipótesis de que se requiere la inactivación de los dos alelos del gen *Rb* para que se origine un retinoblastoma, se logró al descubrirse que existe una pérdida de la heterocigocidad (tanto en el locus del gen *Rb* como en otros marcadores del cromosoma 13), en las células tumorales procedentes de pacientes predispuestos a retinoblastoma familiar (Cavenee y cols., 1983). Se ha observado que diversos mecanismos (deleciones, mutaciones puntuales, presencia de virus como el HPV) pueden conducir a la inactivación o pérdida de la función del producto del gen *Rb*

(Murphree y Benedict, 1984; Cavenee y cols., 1985; Dyson y cols., 1989). La clonación del gen *Rb* (Friend y cols., 1986) ha permitido realizar un experimento contundente en la identificación de un gen supresor de tumores. Tal experimento consiste en la supresión del crecimiento maligno mediante la transferencia del gen silvestre hacia las células tumorales (esto es de gran relevancia para el contexto en el que se considera al gen *H-ras* en el presente trabajo). Lo que se observó es que el gen *Rb* silvestre es capaz de suprimir la proliferación y la tumorigenicidad tanto de las células de retinoblastoma como de otras células neoplásicas (Huang y cols., 1988; Bookstein y cols., 1990). La proteína Rb tiene una función esencial en la regulación del ciclo celular y por lo tanto de la proliferación celular (DeCaprio y cols., 1989; Wiman, 1993). Se han generado ratones homocigotos con alelos no funcionales de *Rb*, y se ha observado que estos animales mueren antes de cumplir los 16 días de vida fetal (Jacks y cols., 1992; Knudson, 1993).

Actualmente se conocen varios genes con alguna o varias de las siguientes propiedades: presentan una pérdida de la heterocigocidad durante la transformación desde células normales hacia células neoplásicas; presentan mutaciones o deleciones que conducen a una pérdida de la función, lo cual predispone para algún tipo de neoplasia; pueden suprimir la proliferación de células neoplásicas; pueden suprimir la formación de tumores de células neoplásicas humanas en ratones atímicos. Algunos ejemplos son: *Rb*, *p53*, *WT1*, *K-rev*, *S-myc*, *NF1*, *VHL*, *APC*, *DCC*, *BRCA1*, *MLM*, *MEN1*, *BCNS* y *LC1* (Sager, 1989; Stanbridge, 1990; Marshall, 1991; Mitchell, 1991; Weinberg, 1991; Anderson y Stanbridge, 1993; Klein, 1993a; Knudson, 1993; Weinberg, 1993).

En el caso del gen *p53*, este inicialmente fue considerado como un oncogén, debido a que se encontró sobreexpresado en células tumorales (Crawford y cols., 1981; Koeffler y cols., 1986),

se observó que podía cooperar con el gen *ras* para transformar células en cultivo (Parada y cols., 1984), y se vio que su sobreexpresión resultaba en la inmortalización de las células (Jenkins y cols., 1984). Sin embargo después se encontró que el gen *p53*, utilizado en los experimentos anteriores, tenía mutaciones, observándose también la presencia de mutaciones (que inactivan a la proteína P53) en el gen *p53* de diversos tumores humanos (Nigro y cols., 1989). Al clonarse el gen silvestre, se comprobó que este no era capaz de transformar células, ni aun en cooperación con el gen *ras*; así mismo se observó que el gen silvestre es capaz de actuar como un supresor de la transformación maligna (Eliyahu y cols., 1989; Finlay y cols., 1989).

Hasta aquí se han descrito las evidencias que han conducido al descubrimiento, así como las características de un oncogén (*src*), de un gen supresor de tumores (*Rb*), y de un gen que inicialmente se consideró como oncogén, pero que actualmente se sabe, es un gen supresor de tumores (*p53*). Veamos ahora el caso del gen c-H-*ras*.

El gen c-H-ras.

En 1964 Harvey describió un virus (el HaSV = *Harvey sarcoma virus*) que ocasionaba la producción rápida de tumores en roedores (Harvey, 1964). Posteriormente se aisló al gen que le confiere la capacidad transformante a este virus y se le denominó v-H-*ras* (v = viral; H = Harvey; *ras* = *rat sarcoma*). A principios de la década de los ochentas se descubrió que el HaSV (conteniendo al gen v-H-*ras*) es un retrovirus que se generó mediante la transducción del gen celular c-H-*ras* de la rata (DeFeo y cols., 1981). Por este tiempo, el gen c-H-*ras* fue inadvertidamente redescubierto (mediante ensayos de transferencia de genes), cuando algunos grupos de investigadores determinaron la existencia de oncogenes dominantes en tumores

humanos. Esto fue a partir del DNA procedente de las células de un tumor de vejiga humana, que es capaz de transformar a las células normales de ratón (Krontiris y Cooper, 1981; Perucho y cols., 1981; Shih y cols., 1981; Goldfarb y cols., 1982; Pulciani y cols., 1982; Shih y Weinberg, 1982). En 1982 se reportó que la única diferencia entre el gen *c-H-ras* aislado de las células tumorales y el correspondiente obtenido de células normales, es el cambio de una base en el DNA, lo cual ocasiona la substitución del aminoácido 12; una glicina por valina (Reddy y cols., 1982; Tabin y cols., 1982; Taparowsky y cols., 1982). Poco después se logró conocer la secuencia completa de este gen (Capon y cols., 1983a). Ahora se sabe que existen en el genoma humano otros genes (*K-ras* y *N-ras*) que presentan un elevado porcentaje de homología con el gen *c-H-ras*, y que (algunos de ellos) están altamente conservados entre las especies (De Feo-Jones y cols., 1983; Dhar y cols., 1984; Neuman-Silberberg y cols., 1984; Powers y cols., 1984; Reymond y cols., 1984; Fukui y Kaziro, 1985; Mozer y cols., 1985; Nadin-Davis y cols., 1986b; Swanson y cols., 1986; Brock, 1987; Gibbs y Marshall, 1989), lo cual sugiere que estos genes desempeñan un papel fundamental en la célula. El gen *c-H-ras* mide aproximadamente 6.6 kb y se localiza en el cromosoma 11p15.5 en el humano (O'Brien y cols., 1983; Fearon y cols., 1984). Este gen está constituido por cuatro exones, los cuales dan origen a un transcrito de 1.4 kb, que codifica para una proteína de 21 kDa (Barbacid, 1987; Lowy y Willumsen, 1993).

La familia de proteínas Ras (H, K y N-Ras) pertenece a la gran superfamilia de proteínas Ras (Ras, Rho, Rac, etc., con más de 50 elementos en las células de mamífero) que funcionan como reguladores críticos de múltiples, y frecuentemente distintos, procesos biológicos (Bokoch y Der, 1993). Se han visto implicadas en proliferación celular (Mulcahy y cols., 1985), diferenciación (Noda y cols., 1985; Bar-Sagi y Feramisco, 1985; Weeks y Pawson, 1987; Bishop

y Corces, 1988), supervivencia (Kataoka y cols., 1984; Tatchell y cols., 1984; Reymond y cols., 1985) y reproducción (Pawson y cols., 1985; Fukui y cols., 1986). Las proteínas de la familia Ras (H-Ras, K-Ras y N-Ras) unen nucleótidos de guanina (Scolnick y cols., 1979; Shih y cols., 1980; Tamanoi y cols., 1984; Temeles y cols., 1985; Milburn y cols., 1990), presentan una actividad de GTPasa (Gibbs y cols., 1984; McGrath y cols., 1984; Sweet y cols., 1984; Manne y cols., 1985; Temeles y cols., 1985) y se encuentran ancladas en la cara interna de la membrana celular (Willingham y cols., 1980; Willumsen y cols., 1984; Fujiyama y Tamanoi, 1986; Hall, 1994). Éstas proteínas participan en la transducción de señales: cuando ocurre la unión de un factor de crecimiento, tal como el factor de crecimiento epidérmico, con su receptor (que es una tirosina cinasa anclada a la membrana celular), se induce una autofosforilación de este receptor en sus residuos de tirosina (Marshall, 1995). Entonces proteínas como Grb/Sem5 interactúan con el receptor fosforilado y pueden activar a los factores de intercambio (Sos) para que conviertan a la proteína Ras desde su forma inactiva (Ras-GDP), hacia su forma activa (Ras-GTP) (Lowenstein y cols., 1992; Baltensperger y cols., 1993; Chardin y cols., 1993; Howe y Marshall, 1993). Una vez que Ras hidroliza al GTP (con la participación de GAP) (McCormick, 1989; Parsons, 1990), la señal es transmitida hacia el producto del oncogén *raf* (Ras interactúa físicamente con el dominio amino-terminal de Raf en una manera dependiente de GTP) (Moodie y cols., 1993; Warne y cols., 1993; Zhang y cols., 1993), el cual fosforila a una segunda cinasa (la proteína cinasa de la cinasa activada por mitógenos, MAPKK). Entonces esta cinasa fosforila a una tercer cinasa (la proteína cinasa activada por mitógenos, MAPK o Erk-1, Erk-2). Esta proteína se transloca al núcleo en donde fosforila a ciertos factores de transcripción (como Elk) que regulan la expresión de otros genes. Además, existe la interacción de esta cascada de fosforilación con otras rutas de señales

(Dent y cols., 1992; Egan y Weinberg, 1993; Lange-Carter y cols., 1993; Prendergast y Gibbs, 1993; Hall, 1994; Moodie y Wolfman, 1994). Se ha sugerido que se requiere de la función apropiada de la proteína Ras para la realización del ciclo celular en las células epiteliales. Se ha propuesto que al menos en tres diferentes puntos del ciclo se requiere de Ras: primero durante la transición de G₀ a G₁; segundo durante la transición de G₁ hacia la fase S; y tercero para la salida del ciclo durante la diferenciación terminal (Howe y cols., 1993; Moodie y Wolfman, 1994). Adicionalmente se ha mostrado que se requiere de la proteína Ki-Ras en las células NRK durante la transición desde G₂ hacia la mitosis (Durkin y Whitfield, 1987).

Ras y el cáncer.

Alteraciones en los genes *ras* han sido observadas en 5-40% de la mayoría de tumores humanos (Barbacid, 1987). La expresión de estos genes se ha observado incrementada (2-10 veces mas que en el tejido control normal) en el 50% de los tumores humanos analizados (Barbacid, 1987). Se han observado alteraciones de *ras* en: tumor de vejiga (Der y cols., 1982), carcinoma de colon (Capon y cols., 1983b; Thor y cols., 1984), carcinoma de pulmón (Capon y cols., 1983b; Shimizu y cols., 1983; Rodenhuis y Slebos, 1992), cáncer de tiroides (Tanaka y cols., 1986), adenocarcinoma de estomago (Tanaka y cols., 1986), cáncer mamario (Thor y cols., 1986), cáncer de próstata (Viola y cols., 1986), neoplasias hematopoyéticas (Gambke y cols., 1984; Bos y cols., 1985; Radich y cols., 1990) y otros tumores de diversos órganos como riñón, hígado, ovario, páncreas, así como en fibrosarcomas, melanomas, teratocarcinomas y neuroblastomas (Barbacid, 1987). También en las células HeLa, se ha detectado la presencia del gen *c-H-ras* mutado (Toledo, 1994).

El gen *c-H-ras* mutado ha sido considerado como un oncogén dominante, cuya presencia es suficiente para el desarrollo del fenotipo tumoral, tal como sucede después de la infección con el virus HaSV (Harvey, 1964), o después de la transfección de células normales con el oncogén procedente de células de un tumor de vejiga (Krontiris y Cooper, 1981; Perucho y cols., 1981; Shih y cols., 1981; Goldfarb y cols., 1982; Pulciani y cols., 1982; Shih y Weinberg, 1982). También se ha observado que el oncogén *c-H-ras* es capaz de cooperar con el oncogén *c-myc* (Alexander y cols., 1989), *raf* (Alexander y cols., 1989; Cuadrado y cols., 1993), *fos* (Greenhalgh y cols., 1990), y con el virus del papiloma humano (Matlashewski y cols., 1987; Campo y cols., 1990) para inducir la transformación maligna de las células normales. En ensayos de carcinogenesis experimental *in vivo* con compuestos químicos, se ha observado que uno de los primeros genes que se mutan es el *H-ras*, y esto acompaña a la inducción de papilomas benignos de la piel (Balmain y cols., 1984). El cultivo de estas células permite su evaluación en ratones atímicos desnudos observándose igualmente la formación de papilomas (Strickland y cols., 1988). Además, se ha observado la participación del oncogén *c-H-ras* en la progresión tumoral, y en los procesos de invasividad y metástasis (Kasid y cols., 1985; Viola y cols., 1986; Muschel, 1990; Hofmann y cols., 1993).

Se ha observado que el gen *c-H-ras* no solamente puede alterarse por mutaciones puntuales, ya que la elevada expresión, inducida por una amplificación o por una desregulación de las secuencias promotoras y potenciadoras localizadas a ambos lados (5' y 3') del gen, también ha sido observada en cáncer (Barbacid, 1987). De hecho la elevada expresión del proto-oncogén *c-H-ras* es capaz de transformar células normales (Chang y cols., 1982). Otro mecanismo de alteración de *ras* observado en cáncer es la delección, aunque este se discutirá más adelante. La

presencia de un gen *c-H-ras* mutado (activado) se sigue considerando en la actualidad como un evento que induce a la proliferación y la transformación maligna de las células (Serrano y cols., 1995).

Ras supresor?

El cromosoma 11 humano consiste de aproximadamente $1.3-1.4 \times 10^8$ pb de DNA -- conteniendo varios genes clínicamente importantes (Miwa y cols., 1993). Se ha observado frecuentemente la pérdida de alelos de la banda 11p15 en tumores primarios de la glandula mamaria, vejiga y testículo (Fearon y cols., 1985; Ali y cols., 1987; Miyagi y cols., 1992; Looijenga y cols., 1994). En ensayos de carcinogenesis experimental, se ha observado una pérdida de la heterocigocidad en la banda 11p15 (lugar donde se localiza el gen *c-H-ras*) durante la transición de papiloma benigno hacia carcinoma maligno (Quintanilla y cols., 1986). Lo anterior recuerda a los datos obtenidos sobre la pérdida de la heterocigocidad con *p53* y *Rb*. Las deleciones en la región cromosómica 11p15 y la pérdida de la heterocigocidad en el locus de *c-H-ras* durante la transición hacia el cáncer sugieren una pérdida de la función del gen. De hecho así es: se sabe que la proteína Ras normal es una GTPasa y que la correspondiente proteína codificada por el gen mutado es una proteína deficiente en esa actividad, la cual por lo tanto deja de cumplir con una función muy importante para la célula (Sweet y cols., 1984). Esta pérdida de función también ha sido observada en el caso de la proteína N-Ras mutada (Trahey y cols., 1987).

De los ensayos de transformación maligna de las células NIH 3T3 con el gen *c-H-ras* mutado, se han generado revertantes, que presentan una dependencia de suero y de anclaje como lo hacen las células normales, a pesar de contener al gen *c-H-ras* mutado y de expresarlo

eficientemente (Yamada y cols., 1991); lo mismo se ha observado para el caso del gen *N-ras* (Paterson y cols., 1987). Así mismo se ha reportado la presencia del gen *c-H-ras* mutado en el DNA del tumor de vejiga de un paciente, así como en el DNA de la parte normal de la vejiga y en los leucocitos (normales) del mismo paciente lo que indica que la presencia del gen mutado no siempre está asociada con células tumorales y que no es dominante para la transformación (Muschel y cols., 1983). Mediante la fusión de células tumorales (originadas mediante la transformación de células normales con el gen *c-H-ras* mutado) con células normales, se han generado híbridos no tumorigénicos con características de células normales pero aun conteniendo al gen *c-H-ras* mutado (Craig y Sager, 1985). Igualmente, al fusionar células de tumor de vejiga (conteniendo al gen *c-H-ras* mutado) con fibroblastos normales, se generan híbridos no tumorigénicos con características de células normales, pero que expresan el mRNA y la proteína p21 del gen mutado a niveles similares a los de las células parentales tumorigénicas (Geiser y cols., 1986). Recientemente se ha logrado introducir una mutación en uno de los dos alelos del gen *c-H-ras* de fibroblastos normales mediante recombinación homóloga; las células heterocigotas expresaron cantidades iguales del alelo normal y del mutado, sin embargo las células no fueron transformadas hacia la malignidad (Finney y Bishop, 1993). Lo anterior indica que el gen *c-H-ras* mutado no es un gen dominante para la transformación maligna.

Durante la inducción de las células HL60 hacia la diferenciación, se ha observado que las células diferenciadas (semejantes a células normales) dejan de expresar al gen *c-myc*, pero en cambio siguen expresando en forma constante al gen *N-ras* mutado (Watanabe y cols., 1985). En organismos inferiores, como los hongos, existen genes homólogos al gen *c-H-ras*, a los cuales se ha atribuido funciones de regulación del desarrollo y la diferenciación celular (Reymond y cols.,

1984; Nadin-Davis y cols., 1986a; Thiery y cols., 1992). En células de mamífero (PC12) la infección con el virus HaMSV (conteniendo al gen *H-ras* mutado) o bien la microinyección de la proteína c-H-Ras mutada induce la diferenciación hacia neuronas (Bar-Sagi y Feramisco, 1985; Noda y cols., 1985). Lo anterior indica que Ras puede ejercer diferentes efectos biológicos en diferentes tipos celulares.

Se han propuesto varios mecanismos para tratar de revertir el fenotipo tumorigénico de las células malignas que tienen mutado al gen c-*H-ras*. Algunos de ellos son: 1) la microinyección de anticuerpos neutralizantes anti-Ras o bien de una proteína Ras mutante que compite con la proteína endógena por la interacción con GAP por ejemplo; 2) el uso de antibióticos como la compactina y la lovastatina que bloquean la farnesilación y por lo tanto la asociación de Ras con la membrana celular; 3) la transfección con el gen *K-rev* (gen que comparte un 50% de homología con el gen c-*H-ras*), el cual se sabe suprime la tumorigenicidad de células transformadas con el gen *K-ras* mutado (Noda y cols., 1989; Feig, 1993; Noda, 1993). Sin embargo ninguno de estos mecanismos tiene aplicación clínica en la actualidad.

Desde 1976 se observó que la fusión de células malignas (HeLa) con fibroblastos normales, da origen a células híbridas que pierden la capacidad para formar tumores (Stanbridge, 1976). Mediante técnicas de bandeado cromosómico, se estableció una asociación entre la pérdida del cromosoma 11 y la reexpresión de la tumorigenicidad en algunos de estos híbridos (Stanbridge y cols., 1981; Stanbridge y cols., 1982). Poco después, mediante el análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), se determinó que cuando las dos copias del cromosoma 11 procedentes de los fibroblastos normales están presentes en los híbridos, las células no son tumorigénicas; la pérdida de una copia de este cromosoma ocasiona la

reexpresión del fenotipo tumorigenico (Srivatsan y cols., 1986). Mas aun, la introducción de una simple copia del cromosoma 11 normal (con ayuda de microcélulas) en las células HeLa, es suficiente para suprimir la tumorigenicidad lo cual sugiere la presencia de uno o varios genes supresores de tumores en este cromosoma (Saxon y cols., 1986). Posteriormente se demostró que la transfección de fibroblastos de rata (transformados previamente con el gen c-H-*ras* mutado), con el gen c-H-*ras* normal humano induce la supresión del fenotipo tumorigénico. Estas células no tumorigenicas expresan al gen mutado y al normal, aunque éste último a niveles elevados en comparación con el mutado (Spandidos y Wilkie, 1988). Lo anterior sugiere que la transfección (con la sobreexpresión) del gen c-H-*ras* normal podría suprimir la tumorigenicidad de las células HeLa.

Por otra parte, se ha reportado que la transfección y sobreexpresión del gen c-H-*ras* mutado en fibroblastos embrionales de rata, induce una detención en G₁/S o G₂/M del ciclo celular, con la subsecuente muerte de las células (Hicks y cols., 1991). Finalmente, se ha visto que algunos fragmentos subcromosómicos conteniendo DNA procedente del cromosoma 11 normal, son capaces de inducir *in vitro* una detención en el ciclo celular de células de rabadomiosarcoma. Esta actividad supresora ha sido mapeada entre los genes de la β-globina y de la insulina (Koi y cols., 1993), justo donde se localiza el gen c-H-*ras* (Fearon y cols., 1984). Lo anterior sugiere que Ras normal podría suprimir la tumorigenicidad mediante un mecanismo de detención del ciclo celular y de la proliferación (como lo hace *Rb*) aunque el hecho de que el gen mutado induzca el mismo efecto indica que se requieren mas estudios para conocer la verdadera función o funciones de este interesante gen.

En el presente trabajo, se ha analizado el efecto de la transfección del gen *c-H-ras* normal o mutado, sobre la tumorigenicidad, la morfología celular, el ciclo celular y la estructura de la cromatina de las células HeLa.

Material y Métodos.

Construcción de los plásmidos que contienen a los genes *neo* y *H-ras*. Los plásmidos pEJ y pEC (donados por la Dra. Esther Chang), fueron cortados con la enzima BamH1 (Figura II). El fragmento de 6.6 kb que contiene al gen *c-H-ras* fue insertado en el sitio BamH1 del plásmido pSV2-*neo*. Los plásmidos resultantes que contienen al gen *c-H-ras* normal (RAS^{wt}/*neo*) o al mutado (RAS^{mut}/*neo*) se cortaron con EcoRI antes de usarlos en los ensayos de transfección.

Obtención de clonas. Las células HeLa se sembraron a una densidad de 5×10^5 células por caja (de 10 cm de diámetro) en 10 ml de medio DMEM conteniendo 10% de suero neonato de ternera y antibióticos. Las células semiconfluentes fueron electroporadas con el DNA linealizado de los plásmidos en dos modalidades: en la primera se utilizó una combinación de dos plásmidos formada con 50 μ g del plásmido pEC y 1 μ g del plásmido pSV2-*neo*; en la segunda se utilizó únicamente un plásmido (5 μ g) ya sea el RAS^{wt}/*neo* o el RAS^{mut}/*neo*. En todos los casos se electroporaron células con el plásmido pSV2-*neo* únicamente, las cuales se utilizaron como un control. Dos días después de la transfección, se adicionaron 800 mg/ml del antibiótico G418 (Gibco) para seleccionar las células resistentes. Una parte de estas células se congeló en nitrógeno líquido, otra parte se expandió para los ensayos de tumorigenicidad, y otra parte se utilizó para generar clonas. Las clonas se separaron mediante la captura directa de las colonias (crecidas cada una a partir de una célula) con un palillo estéril o bien con una micropipeta, y se sembraron en pozos de microplaca. También se utilizó el método de dilución limitante. Algunas de las clonas obtenidas que contienen al gen *c-H-ras* se pudieron expandir y una parte de ellas se congeló en

nitrógeno líquido mientras que la otra parte fue utilizada para los ensayos que se describen a continuación así como los que están descritos en el artículo.

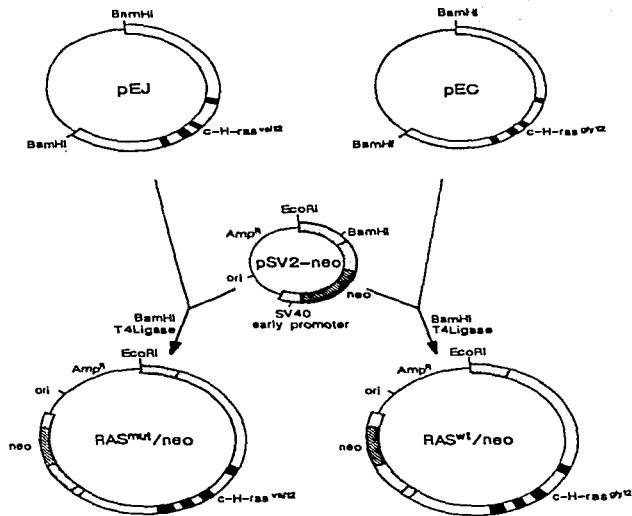


Figura II. Construcción de los plásmidos usados. Los plásmidos pSV2-neo y pEJ o pEC fueron cortados con BamHI. Entonces los DNAs se mezclaron y ligaron mediante el uso de la enzima T4 DNA ligasa, y con ellos se transformaron bacterias de *E. coli* para resistencia a ampicilina (Amp^R). Se obtuvo el DNA plasmídico de las clonas seleccionadas y se caracterizó mediante el uso de enzimas de restricción. Los plásmidos resultantes, RAS^{mut}/neo y RAS^{wt}/neo contienen secuencias del gen neo derivado de pSV2-neo y del gen $c-H-ras^{val12}$ o $c-H-ras^{gly12}$ derivados de pEJ o pEC respectivamente. Las secuencias de PBR322 están representadas por la línea delgada y contienen el origen de replicación de PBR322 y el gen que codifica para la β -lactamasa (Amp^R); el segmento rayado representa al gen neo; las secuencias de SV40 están indicadas como segmentos con puntos. El promotor temprano de SV40 está presente en el fragmento pequeño que se localiza inmediatamente hacia el lado 5' del gen neo. El DNA de $c-H-ras$ está representado por el arco blanco y las cajas negras esquematizan los exones de este gen.

Ensayo de tumorigenicidad. Un millón de células fueron colocadas en 0.2 ml de medio sin suero e inyectadas en forma subcutánea en la región dorsal de los ratones atímicos. Al principio, el

crecimiento de los tumores a través del tiempo se evaluó mediante la medida de su largo. Posteriormente se consideró el largo y el ancho del tumor, con lo que fue posible determinar el volumen tumoral mediante el empleo de la fórmula:

$$\text{Volumen tumoral} = \frac{L \cdot A^2}{2}$$

donde L representa el largo del tumor y A el ancho. En algunos casos fue posible evaluar el peso en gramos del tumor así como el obtener fotografías tanto del tumor como de los ratones.

Ensayo de incorporación de timidina marcada radioactivamente. Las células se cultivaron en presencia de timidina marcada con ^3H ($0.5 \mu\text{Ci/ml}$) durante diferentes tiempos. Entonces las células fueron tripsinizadas y contadas. Se colocó una gota que contenía 1×10^6 células sobre papel filtro y se lavó cinco veces con ácido tricloroacético (TCA) al 5% y dos veces con etanol al 96% a 4°C . Finalmente la radioactividad se cuantificó mediante el uso de líquido de centelleo y un equipo detector de cuentas por minuto (c.p.m.) para emisiones tipo β .

Ensayo de incorporación de bromodeoxiuridina. Las células se cultivaron en presencia de $5\mu\text{g/ml}$ de bromodeoxiuridina (BrdU) durante diferentes tiempos. Entonces se adicionó $0.1 \mu\text{g/ml}$ de colcemid durante dos hrs y las células se colocaron en solución hipotónica (0.075 M KCl) durante 20 min a 37°C . Los núcleos se fijaron con metanol : ácido acético (3:1) y se prepararon laminillas mediante el goteo sobre portaobjetos. Los cromosomas se visualizaron al microscopio.

previa tinción (Perry y Wolf, 1974). Se analizaron 100 metafases clasificándose como de primera, segunda, tercera y subsecuente generación.

Obtención del DNA. Las células (20×10^6) se colocaron en solución de lisis (20 mM Tris-HCl pH 7.5; 0.3 M $\text{CH}_3\text{-COO-Na}$; 1 mM EDTA pH 8.0; Proteínasa K 400 $\mu\text{g/ml}$; 0.2 % SDS) durante toda la noche a 37°C en agitación. Entonces se realizaron dos extracciones con un volumen de fenol saturado con Tris HCl pH 8.0. Se realizó una tercera extracción con 0.5 volúmenes de Fenol y 0.5 volúmenes de Cloroformo-Alcohol Isoamilico (24:1); después se realizó una última extracción con un volumen de Cloroformo-Alcohol Isoamilico, y el DNA se precipitó mediante la adición de un volumen de $4\text{M CH}_3\text{-COO-NH}_4$ y 2.5 volúmenes de Etanol absoluto frío (-20°C), y centrifugación durante 30 min a $12,000 \times g$ y 4°C . El DNA se cuantificó mediante la lectura de la absorbancia de luz UV a 260 nm.

Southern Blot. El DNA genómico (10 μg) se cortó con la enzima BamHI y los fragmentos fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.9%. Posteriormente el DNA se transfirió a un filtro de Nylon, mediante el uso de 20X SSC, y se hibridó con dos sondas radioactivas que contienen secuencias de los genes *c-H-ras* y *neo*. Finalmente se obtuvo una autorradiografía (Sambrook y Cols., 1989).

Resultados.

Formación de tumores por diversas líneas celulares en los ratones atímicos desnudos. Para establecer las condiciones del sistema de tumorigenicidad, se cultivaron las siguientes líneas celulares: HeLa, CaSky, MRI-H-186 (establecidas a partir de tumores de cervix humano), A204 (establecida a partir de un rabiomiosarcoma), y Molt (establecida a partir de una leucemia aguda linfoblástica).

Tabla 1. Desarrollo de tumores de células humanas en ratones atímicos desnudos.

<i>Células</i>	<i>Cantidad inoculada</i>	<i>No. de ratones con tumor</i>
<i>Medio de cultivo</i>	0.5 ml	0/2
<i>Fibroblastos normales</i>	3 x 10 ⁶	0/4
	18 x 10 ⁶	0/2
<i>HeLa</i>	1 x 10 ⁵	6/6
	3 x 10 ⁶	8/8
<i>CaSki</i>	1 x 10 ⁶	0/2
	3 x 10 ⁶	0/2
	5 x 10 ⁶	0/2
	10 x 10 ⁶	2/2
<i>MRI-H-186</i>	1 x 10 ⁶	0/2
	5 x 10 ⁶	2/2
<i>A-204</i>	1 x 10 ⁶	2/2
	3 x 10 ⁶	2/2
<i>Molt</i>	1 x 10 ⁶	0/2
	10 x 10 ⁶	0/2

Como células no tumorigénicas se utilizaron células procedentes de un fibroma humano, generosamente donadas por la Biol. Guadalupe Cervantes del INCan. El número de ratones que presentó tumor para cada una de las líneas se muestra en la Tabla 1. Como puede observarse, las células procedentes de fibroma humano no fueron capaces de formar tumor (al menos hasta 60 días post-inyección), al ser inyectadas incluso a un inóculo muy grande (18×10^6 células) en los ratones atímicos desnudos. Las células HeLa resultaron tumorigénicas con un inóculo desde 1×10^6 células y la mayoría de las otras líneas también generaron tumores, aunque en algunas fue necesario un inóculo mayor. Las células Molt tampoco formaron tumores probablemente porque esta línea al ser de leucemia, prolifera en la sangre periférica dificultándose la detección de tumoraciones al tiempo de la evaluación. Todo lo anterior demuestra que el sistema es adecuado para evaluar la presencia de tumorigenicidad en las células HeLa así como su posible supresión.

Supresión de la tumorigenicidad por el gen c-H-ras normal. Inicialmente las células HeLa se transfectaron con los plásmidos pEC (que contiene al gen c-H-ras normal, c-H-ras^{gly12}) y pSV2-neo (ver Figura II) en forma simultánea, generándose una población heterogénea (con respecto al contenido del gen c-H-ras normal) de células resistentes a neo. Parte de éstas células se inyectaron en los ratones atímicos y otras se usaron para generar clonas. Algunas de estas clonas fueron incapaces de proliferar, muriéndose antes de lograr su expansión. Sin embargo algunas clonas se lograron expandir, con lo que una parte de cada clona se congeló y con la otra parte fue posible realizar el ensayo de tumorigenicidad. Como puede verse en la figura III, existe una diferencia significativa ($p < 0.005$, t de student) entre la longitud promedio de los tumores generados por las células HeLa transfectadas con el gen c-H-ras normal, ya sea de la población

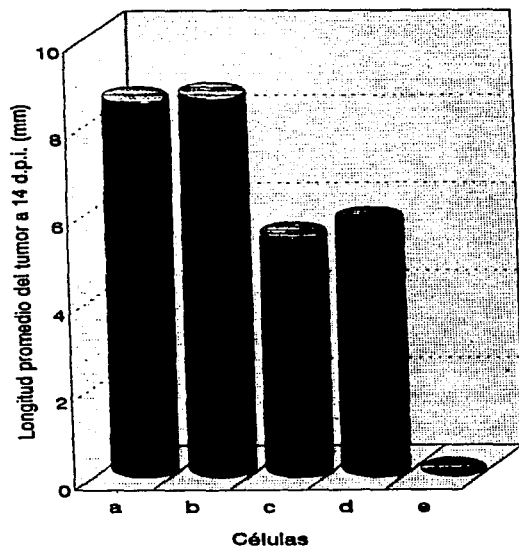


Figura III. Tamaño promedio de los tumores de células HeLa y de HeLa transfectadas con el gen *c-H-ras*. Los ratones atímicos fueron inoculados con 1×10^6 células y se determinó el promedio del tamaño de los tumores (largo en mm) a los 14 días post-inyección (d.p.i.). a, HeLa; b, HeLa transfectadas con pSV2-neo; c, población heterogénea de células HeLa transfectadas con los plásmidos pEC y pSV2-neo; d, clonas de células HeLa transfectadas con los plásmidos pEC y pSV2-neo; e, una clona de células HeLa transfectadas con los plásmidos pEC y pSV2-neo que no presentó crecimiento tumoral.

heterogénea (*columna c*) o bien del promedio de las clonas (*columna d*), y la longitud promedio de los tumores generados por las células HeLa y por HeLa transfectadas con el control pSV2-neo (*columnas a y b*). Como algo de particular importancia, también en esta figura se representa una de las clonas que no presentó crecimiento tumoral hasta los 14 días post-inyección (*columna e*). Sin embargo, esta clona generó un tumor de crecimiento muy lento un tiempo después, pero en otro sitio, lejos del punto de inyección. De esta clona se aisló el DNA y se analizó la presencia del

gen *c-H-ras* normal encontrándose (mediante un análisis densitométrico) que existen aproximadamente seis copias de este gen en cada célula (Figura IV, *carril c*), lo cual (al inducir una mayor expresión del gen) podría explicar la supresión transitoria de la tumorigenicidad que se observó. El tamaño de las bandas diferente que se observa en los linfocitos normales (Figura IV, *carril a*) es debido al polimorfismo en este gen ocasionado por un distinto número de secuencias repetidas en la región 3'. Por su parte el hecho de que en las células HeLa se detecte una baja cantidad de *c-H-ras* (Figura IV, *carril b*) podría ser debido a la ausencia de uno de los

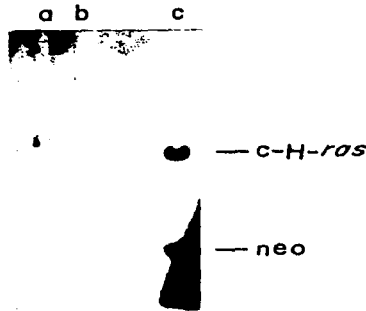


Figura IV. Existencia de varias copias del gen *c-H-ras* normal en las células HeLa transfectadas con los plásmidos pEC y pSV2-neo. El DNA genómico (10 µg) se cortó con la enzima BamHI y los fragmentos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Después de la transferencia el filtro se hibridó con dos sondas conteniendo secuencias de los genes *c-H-ras* normal y *neo*. a, linfocitos de sangre periférica de individuos normales; b, HeLa; c, HeLa transfectadas con los plásmidos pEC y pSV2-neo.

cromosomas 11, lo cual ya está descrito en estas células. Adicionalmente las secuencias del gen *neo* únicamente fueron detectadas en el DNA de las células de la clona (Figura IV, carril c).

Cuando las células se transfectaron con los plásmidos RAS^{wt}/neo (conteniendo al gen *c-H-ras* normal, *c-H-ras*^{wt12}) o RAS^{mut}/neo (conteniendo al gen *c-H-ras* mutado, *c-H-ras*^{mut12}) se obtuvieron algunas clonas que no lograron sobrevivir, pero también se obtuvieron algunas clonas que mantuvieron una proliferación suficiente para expandirlas e inyectarlas en los ratones atímicos. Lo que se observó es que las células tratadas con el gen *c-H-ras* normal presentaron un

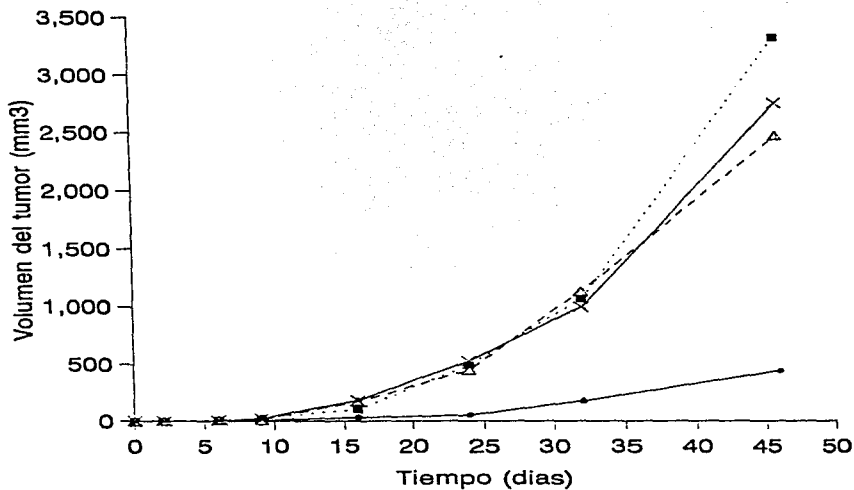


Figura V. Crecimiento tumoral a través del tiempo. Los ratones atímicos desnudos se inyectaron con las células tumorales (1×10^6) y se evaluó el crecimiento del tumor a través del tiempo. El volumen de los tumores se calculó como está descrito en Material y Métodos. (X — X), HeLa; (Δ --- Δ), HeLa transfectadas con pSV2-neo; (● — ●), HeLa transfectadas con RAS^{wt}/neo; (■ --- ■), HeLa transfectadas con RAS^{mut}/neo.

crecimiento menor del tumor con respecto al de las células HeLa, y de HeLa tratadas con el plásmido control pSV2-neo (Figura V). Adicionalmente, esta vez fue posible evaluar a las células HeLa transfectadas con el gen *c-H-ras* mutado y se observó que el crecimiento del tumor era todavía mayor que el de los controles, lo cual indica que la transfección de este gen, en su versión mutada, induce un aumento en la tumorigenicidad de las células HeLa.

Al final del experimento anterior (46 días post-inyección), a los ratones se les tomó una fotografía (Figura VI) en la cual es posible apreciar el tamaño reducido de los tumores generados por las células transfectadas con el gen *c-H-ras* normal (Figura VI, *lado izquierdo* de los ratones



Figura VI. Tumores de células HeLa en ratones atímicos desnudos. Los animales fueron inoculados en forma subcutánea con 1×10^6 células y se les tomó una fotografía a los 46 días post-inyección. Los tumores proceden de: HeLa (lado derecho de los ratones e y d); HeLa transfectadas con pSV2-neo (ratones a lado izquierdo y b lado derecho); HeLa transfectadas con RAS^{mut}/neo (ratones a lado derecho y c lado izquierdo); HeLa transfectadas con RAS^{wt}/neo (lado izquierdo de los ratones b y d).

b y *d*), en contraste con el gran tamaño de los tumores generados por las células transfectadas con el gen *H-ras* mutado (Figura VI, *lado derecho* del ratón *a* y *lado izquierdo* del ratón *c*). Estos resultados se corroboraron al evaluar el promedio del peso de los tumores extirpados el cual fue de 0.4 g para el tumor generado por las células transfectadas con el gen normal (ver fotografía representativa en la Figura VII, *tumor c*), y de 3.12 g para el tumor generado por las células transfectadas con el gen mutado (Figura VII, *tumor d*). El promedio del peso de los tumores generados por las células HeLa, y por HeLa transfectadas con el control pSV2-neo fue de 1.78 g

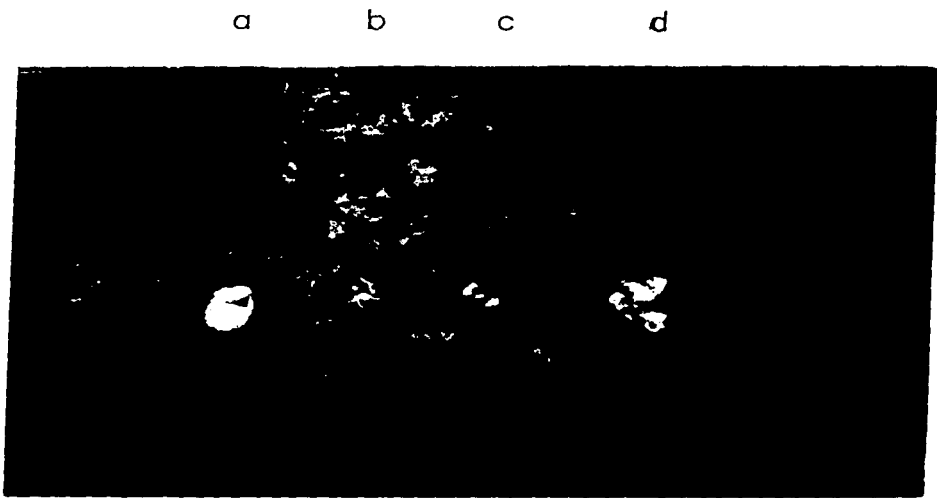


Figura VII. Tumores de células HeLa extirpados de los ratones atímicos desnudos. Los tumores fueron obtenidos de los ratones atímicos desnudos a los 46 días post-inyección y se les tomó una fotografía. a, HeLa; b, HeLa transfectadas con pSV2-neo; c, HeLa transfectadas con RAS^{wt}/neo; d, HeLa transfectadas con RAS^{mut}/neo.

y 0.83 g respectivamente, que también es un peso grande en comparación con el tumor generado por las células transfectadas con el gen normal, pero inferior al generado por las células transfectadas con el gen mutado.

Las células transfectadas con el gen H-ras normal presentan una proliferación disminuida.

Desde los experimentos iniciales, cuando se transfectó a las células HeLa con la combinación de los plásmidos pEC y pSV2-neo, se observó que estas células proliferaban en forma muy lenta. Para corroborar esto se estudió la cinética de proliferación de estas células mediante ensayos de incorporación de timidina marcada con ^3H . Encontramos que las células transfectadas con el gen *c-H-ras* normal presentan un comportamiento de incorporación diferente al de las células transfectadas con el control pSV2-neo (Figura VIII). La disminución de la incorporación entre las 20 y 30 hrs, sin una recuperación como lo hace el control es indicativa de la existencia de alteraciones en la duración de las fases del ciclo celular, en particular de las que siguen a la fase S.

Para conocer la duración del tiempo de duplicación celular, las células se incubaron en presencia de bromodeoxiuridina y se analizaron los cromosomas que se encuentran en primera, segunda, tercera y subsecuente generación a través del tiempo. El resultado de este análisis es el de que las células HeLa transfectadas con el gen *c-H-ras* normal ciclan cada 42 hrs mientras que las células HeLa o bien las HeLa transfectadas con el control pSV2-neo ciclan cada 23 hrs. Estos resultados fueron corroborados posteriormente mediante un análisis de citometría de flujo, de las células HeLa transfectadas con los plásmidos $\text{RAS}^{\text{wt}}/\text{neo}$ o $\text{RAS}^{\text{mut}}/\text{neo}$, encontrándose además

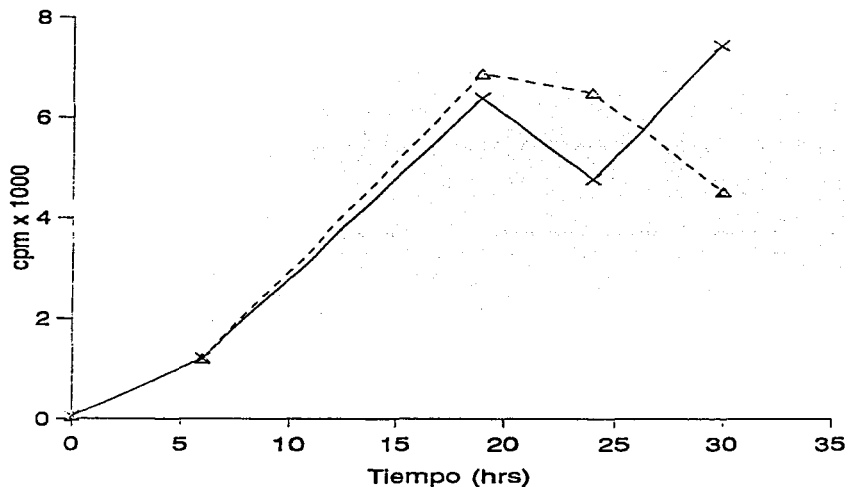


Figura VIII. Incorporación diferencial de ^3H -timidina por las células HeLa transfectadas con el gen *c-H-ras* normal. Las células fueron cultivadas en presencia de timidina marcada con ^3H y se evaluó su incorporación al DNA mediante la lectura de cuentas TCA-precipitables a diferentes tiempos. (X — X), HeLa transfectadas con pSV2-neo; (Δ --- Δ), HeLa transfectadas con pEC y pSV2-neo.

que la detención parece estar entre las fases S y G_2/M del ciclo celular (ver la Figura 4 del *Artículo* que se presenta más adelante).

Otra observación que se generó del estudio de los cromosomas de estas células es que las células transfectadas, ya sea con el gen *c-H-ras* normal o bien con el mutado, tienden a acumular una gran cantidad de cromosomas. En la figura IX se muestra una fotografía de una de estas metafases en la cual puede verse la excesiva cantidad de cromosomas contenidos en una de estas

células. La cuantificación de estas metafases (ver la Figura 5 del *Artículo*) indicó que las células, o bien algunos núcleos de algunas de estas células (ver mas adelante), contienen un elevado

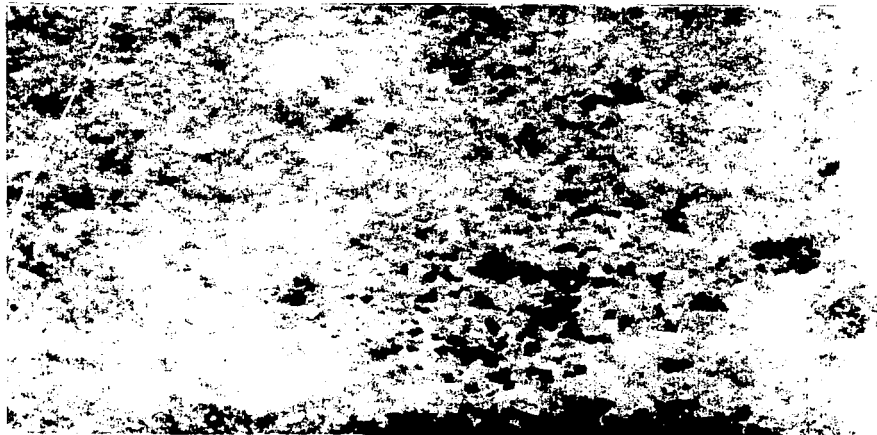


Figura IX. Gran cantidad de cromosomas en las células HeLa transfectadas con el gen *c-H-ras*. Se muestra una fotografía de los cromosomas en metafase obtenidos de las células HeLa transfectadas con el plásmido RAS^W/neo.

número (>200) de cromosomas (las células HeLa son heteroploides con un número de cromosomas de 38 a 106) (Lewin, 1980). Adicionalmente, se observó que las células transfectadas con el gen *c-H-ras* normal o mutado son extremadamente sensibles a la toxicidad provocada por la bromodeoxiuridina ya que se observó la presencia de una gran cantidad de células muertas en estos cultivos, en comparación con los de las células HeLa y de HeLa transfectadas con el control pSV2-neo.

La expresión anormal del gen c-H-ras induce la muerte mitótica de las células HeLa. Desde los experimentos iniciales, donde se transfectó la combinación de plásmidos pEC y pSV2-neo, se observó la aparición de células gigantes que presentaban una gran cantidad de núcleos. La presencia de estas células también fue observada posteriormente cuando se obtuvieron clonas a partir de células transfectadas con los plásmidos RAS^{wt}/neo como RAS^{mut}/neo (ver Figuras 1 y 6 del *Artículo*). La morfología de estas células es característica de aquellas células que presentan el proceso descrito como muerte mitótica, o catástrofe mitótica. En él las células alcanzan un gran tamaño y presentan varios núcleos antes de morir. Estas células anormales se generan en mayor proporción en la clona de células transfectadas con el gen mutado (Figura 2 del *Artículo*) que en las del gen normal. El análisis de la expresión del gen c-H-ras reveló la existencia de una cantidad aumentada de sus transcritos en las células transfectadas con el gen normal (Figura 3 del *Artículo*). Estos resultados, junto con los anteriores indican que la elevada expresión del gen c-H-ras normal induce la muerte mitótica de las células HeLa, lo cual está en concordancia con la baja proliferación observada en estas clonas (dado que las células se mueren) y con el tamaño menor de los tumores que éstas generan. En el caso de las células transfectadas con el gen mutado al parecer se generan dos tipos de poblaciones: una que se muere por catástrofe mitótica y otra que es capaz de generar tumores incluso mas grandes que los controles.

Artículo: Induced mitotic death of HeLa cells by abnormal expression of c-H-ras.

Resumen:

El análisis morfológico de las clonas de células HeLa transfectadas con el gen c-H-ras, normal o mutado, reveló la presencia de células gigantes multinucleadas. Tales alteraciones morfológicas

culminan en la muerte de las células, como una consecuencia de lo que se conoce como catástrofe mitótica (o muerte mitótica). Las clonas que expresan al gen mutado producen un mayor número de células gigantes en comparación con las clonas que expresan al gen normal. El análisis de Northern blot reveló que existe una sobreexpresión del mRNA de *H-ras* normal en estas últimas. El estudio de la cromatina reveló la presencia de núcleos heteroploides y micronúcleos en las células gigantes. En varias células se observó un número impar de núcleos. Adicionalmente, se detectaron alteraciones en el ciclo celular así como la aparición de una subpoblación de células con un contenido anormal de DNA (probablemente las células que se mueren). Los datos sugieren que la expresión anormal de *c-H-ras* promueve la catástrofe mitótica y muerte de una subpoblación de células HeLa.

Reprinted from

MUTATION RESEARCH

Fundamental and Molecular
Mechanisms of Mutagenesis

Mutation Research 349 (1996) 173-182

Induced mitotic death of HeLa cells by abnormal expression of *c-H-ras*

Enrique I. Miranda ^{a,1}, Carla Santana ^a, Emilio Rojas ^b, Salomón Hernández ^b,
Patricia Ostrosky-Wegman ^b, Alejandro García-Carrancá ^{a,c,*}

^a *Department of Molecular Biology, Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM, Ciudad Universitaria, 04510 Mexico City, Mexico*

^b *Environmental Genetics and Toxicology, Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM, Mexico City, Mexico*

^c *Division of Basic Research, Instituto Nacional de Cancerología, Mexico City, Mexico*

Received 15 July 1995; accepted 14 August 1995



Induced mitotic death of HeLa cells by abnormal expression of *c-H-ras*

Enrique I. Miranda ^{a,1}, Carla Santana ^a, Emilio Rojas ^b, Salomón Hernández ^b,
Patricia Ostrosky-Wegman ^b, Alejandro García-Carrancá ^{a,c,*}

^a Department of Molecular Biology, Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM, Ciudad Universitaria, 04510 Mexico City, Mexico

^b Environmental Genetics and Toxicology, Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM, Mexico City, Mexico

^c Division of Basic Research, Instituto Nacional de Cancerología, Mexico City, Mexico

Received 15 July 1995; accepted 14 August 1995

Abstract

When HeLa cells were selected for stable expression of a neo gene, linked either to mutated or wt *c-H-ras* genes, morphological examination of selected clones from several experiments revealed formation of giant multinucleated cells. These morphological alterations culminate in cell death, as a consequence of mitotic catastrophe (or mitotic death). Although clones expressing the mutated gene produced significantly larger numbers of these giant cells, those transfected with the normal allele were also found to produce significantly more giant multinucleated cells than non-transfected HeLa cells. Northern blot analysis of mRNA revealed overexpression of the normal *H-ras* gene in these clones. Chromatin structure analysis of these clones showed gross alterations, including the presence of micronuclei and heteroploid nuclei. Interestingly, odd numbers of nuclei were found in colonies of these giant cells. In addition, alterations in cell cycle parameters were observed, including the appearance of a subpopulation of cells with an abnormal content of DNA, probably representing dying cells. Our data support the notion that abnormal expression of *H-ras* contributes to mitotic catastrophe and death of a subpopulation of HeLa cells.

Keywords: *c-H-ras*; Mitotic death; HeLa cell; Abnormal expression

1. Introduction

Ras proteins are GTPases that belong to the Ras superfamily of proteins, now including more than 50 members (Bokoch and Der, 1993). They participate

in the transduction of several extracellular signals involved in different processes, such as proliferation, transformation and terminal differentiation (Egan and Weinberg, 1993; Lowy and Willumsen, 1993). It has been suggested that Ras function is required for cell cycle progression in epithelial cells, and at least 3 different cell-cycle-specific requirements have been proposed: first, upon exit of G0 and entry into G1; second as cells enter the S phase; and third, for cell cycle exit and terminal differentiation (Howe et al., 1993; Moodie and Wolfman, 1994). Ki-Ras protein

* Corresponding author. Tel.: +52 (5) 6223891 and 6161602; Fax: +52 (5) 6223891 and 5500048; E-mail: carranca@servidor.unam.mx.

¹ Present address: Servicio de Hematología, Hospital General de México, 06720 Mexico City, Mexico.

has been shown to be required for NRK cells to enter mitosis from G2 (Durkin and Whitfield, 1987).

Several agents, such as epipodophyllotoxin (etoposide), ionizing radiation and the radiomimetic agent bleomycin, induce DNA damage and cytotoxicity in mammalian cells. Such events appear to culminate in two different manifestations of cell death: (1) mitotic death; or (2) apoptosis. The factors which control mitotic catastrophe (or mitotic death) remain to be defined. It appears to be a slow process, characterized by the appearance of polyploidy, fragmented nuclei and cell enlargement (Lock and Ross, 1990; Chang and Little, 1991; Zucker et al., 1991; Rodilla, 1993; Tounekti et al., 1993).

Methylxanthines, including caffeine and pentoxifylline, enhance cytotoxicity when applied following exposure of mammalian cell lines to DNA damaging agents (Busse et al., 1977; Fingert et al., 1986; Schiano et al., 1991). Brief exposures of G₂-arrested HeLa cells to low concentrations of caffeine potentiate etoposide cytotoxicity via mitotic catastrophe rather than apoptosis (Lock et al., 1994).

HeLa cells, originally derived from an adenocarcinoma of the uterine cervix, have been shown to harbor transcriptionally active sequences from the human papillomavirus type 18 (HPV18), including E6 and E7 oncogenes (Schwarz et al., 1985), which leads HeLa cells to progress uninterruptedly through the cell cycle.

In this context, we have analyzed the effect of introducing normal or mutated *c-H-ras* genes on the morphology, cell cycle parameters, and gross chromatin structure of HeLa cells. The experiments indicate that abnormal expression of *c-H-ras*, either normal or mutated, induces gross morphological alterations of HeLa cells, including nuclear and chromatin changes, that eventually culminate in mitotic catastrophe (or mitotic death) of a subpopulation of these cells.

2. Materials and methods

2.1. Recombinant plasmids containing *neo* and *c-H-ras* genes

Plasmids pEJ (*c-H-ras*^{val12}) or pEC (*c-H-ras*^{gly12}), both the generous gift of Dr. Esther Chang, were

digested with BamHI, and the 6.6-kb *c-H-ras*-containing DNA inserted into the BamHI restriction site of pSV2-*neo*. The resulting plasmids, containing either the normal gene (*RAS*^{wt}/*neo*) or the mutated (*RAS*^{mut}/*neo*) were linearized with EcoRI and then used to transfect HeLa cells.

2.2. Preparation of stable clones

HeLa cells were plated at a density of 5×10^5 cells per dish (10-cm diameter) in DMEM containing 10% newborn calf serum. Semiconfluent cells were electroporated with linearized DNA as previously described (Guido et al., 1992). Two days after transfection, 800 mg/ml of the antibiotic G418 (Gibco) was added to the medium, and individual clones were selected and either used directly for analysis or stored in liquid N₂.

2.3. Cell analysis

Cells were seeded over glass coverslips, fixed (80% ethanol, 10% sucrose), and stained with hematoxylin–eosin. For chromatin structure, cells were fixed as above, stained with 2,4-diamidino-2-phenylindole (DAPI), and visualized on a fluorescence microscope. Percentage of giant multinucleated cells was determined by first plating 5×10^2 cells (50-mm Petri dishes) and allowing colonies to form during 72 h. Colonies with giant multinucleated cells were then counted (normally 100 colonies per dish) at different times. For cell-cycle analysis, cells were plated at a density of 5×10^3 cells per dish (100-mm diameter) and allowed to adhere. At different times cells were trypsinized, fixed in 70% ethanol, and treated with the High Resolution DNA Kit (Partec, GmbH, Germany). Flow cytometry analysis was performed on a Partec CA-II flow cytometer (GmbH, Germany).

2.4. Northern hybridization

mRNA was extracted from semiconfluent cultures and analyzed essentially as described Sambrook et al., 1989). DNA hybridization probes (the 6.6-kb human *c-H-ras* fragment from pEJ, and a human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase fragment) were random-primed labeled using [α -³²P]dCTP (Amersham International plc). The RNA

blot was hybridized overnight, washed at low stringency ($2 \times$ SSC, 0.1% SDS) at 55°C, and autoradiographed. The probe was stripped-off, and the filter then hybridized with a labeled human GAPDH-specific probe at high stringency.

2.5. Cytogenetic analysis

Cell cultures were incubated for 42 h at 37°C, and 2 h before harvesting, 0.2 ml of Colcemid (Gibco) was added to each plate. The cells were then incubated for 2 h at 37°C, and washed twice in PBS, to remove dead cells. Adherent cells were collected after treatment with trypsin, and centrifuged at $300 \times g$ for 10 min. Supernatant was removed, and cells placed in hypotonic solution (0.075 M KCl) at 37°C for 20 min. Cells were then fixed and washed with

chilled methanol–acetic acid (3:1). Slides were prepared specially for aneuploidy scoring, by dropping the cells gently on microscope slides, air drying at room temperature and staining with Giemsa (3%) for 3 min. Chromosome number was determined by analyzing 100 metaphases (Vega et al., 1995).

3. Results

3.1. Induction of mitotic cell death by normal and mutated Ras

HeLa cells were transfected with normal (Gly12) or mutated (Val12) human *c-H-ras* genes linked to a neo-resistance marker. After selection with G-418, morphological examination of transfected clones re-

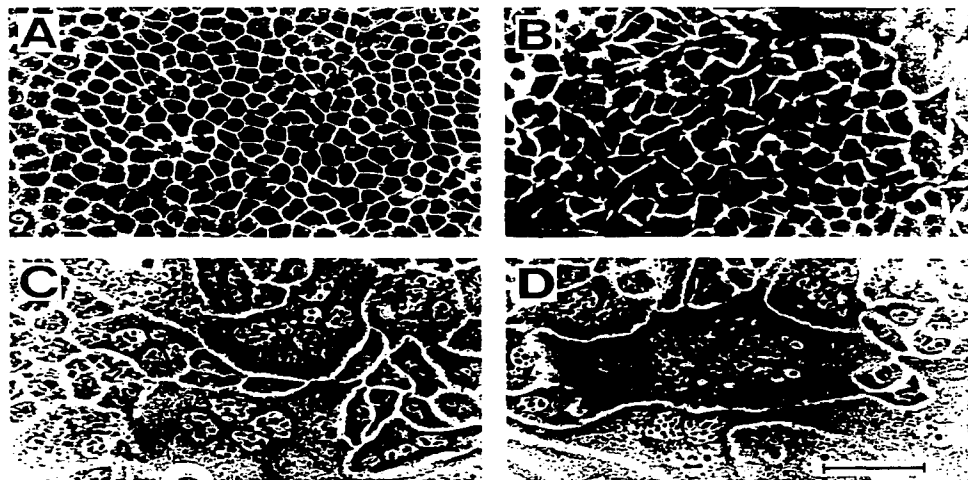


Fig. 1. Morphological changes induced by *H-ras* in HeLa cells. HeLa cells were stably transfected with different plasmids containing either the neo gene alone or the neo gene linked to normal or mutated versions of the human *H-ras* gene. Selected clones were grown for 72 h and photographed. HeLa cells were transfected with: A, none; B, pSV2-neo; C, *RAS*^{wt}/neo; and D, *RAS*^{mut}/neo plasmids, respectively. Bar = 70 μ m.

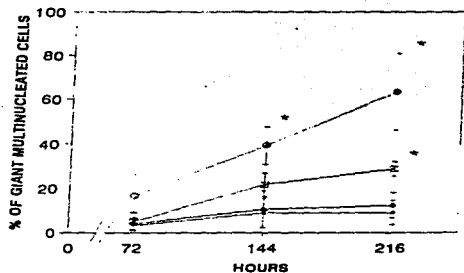


Fig. 2. Time course appearance of giant multinucleated cells. Cells were seeded at low density and grown for 72 h to allow colonies to form. The percentage of colonies with giant multinucleated cells was calculated by counting at least 100 colonies/plate at the indicated times. The graph shows the mean of 3 independent experiments \pm S.E.M. The cells were transfected with: \times , none; \blacklozenge , pSV2-neo; \blacksquare , RAS^{wt}/neo; shaded circles, RAS^{mut}/neo. $p < 0.05$ (ANOVA test).

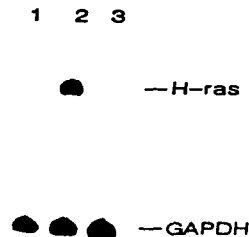


Fig. 3. Northern blot analysis of c-H-ras transcript. Two μ g mRNA from each cell type were electrophoresed and transferred to nylon membranes and hybridized to a 6.6-kb BamHI probe containing the human c-H-ras gene (upper panel). As a control, the blot was washed and hybridized with a probe containing human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) sequences (lower panel). Lanes: 1, pSV2-neo transfected cells; 2, RAS^{wt}/neo transfected cells; 3, RAS^{mut}/neo transfected cells.

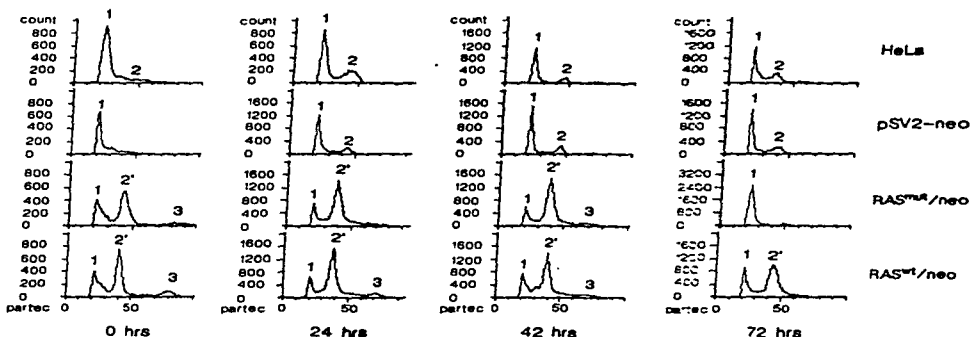


Fig. 4. DNA content of transfected and non-transfected cells. Cells were grown and harvested at the indicated times after seeding, and flow cytometry analysis was performed. Number of nuclei as a function of DNA content are shown. DNA content corresponding to G1 phase is indicated as peak 1, and those corresponding to G2 + M as peak 2. DNA contents recorded between peaks 1 and 2 correspond to nuclei in the S phase. Also indicated are nuclei with a DNA content between S and G2 + M phases (peak 2'), and nuclei with a larger amount of DNA (peak 3).

vealed the presence of aberrant cells (Fig. 1). Large cells that contained several nuclei were observed (Fig. 1C, D).

The morphology of these giant cells, with several evenly stained giant nuclei and micronuclei, has been identified previously as cells that are undergoing 'mitotic death' (Lock et al., 1994). This phenomenon was observed in clones obtained from several independent transfections. Likewise, similar observations were obtained when a neuroblastoma cell line was used instead of HeLa cells (manuscript in preparation). All of the obtained clones showed the property of constantly generating giant multinucleated cells, keeping a population of small cells. In an attempt to separate the giant multinucleated cells, from the small ones, we observed that these giant cells grew poorly and were unable to reach confluence. In fact, these cells died before any possible cell transfer.

The effect of Ras on the proportion of cells

undergoing these morphological changes was quantified (Fig. 2). Cloned cells were seeded at very low density and allowed to grow during 72 h. In the cells transfected with *H-ras*^{G12} gene, the percentage of colonies with giant multinucleated cells increased significantly through the time. Indeed, 216 h after seeding, 70% of the colonies contained giant multinucleated cells. In cells transfected with the normal gene (*H-ras*^{G12}) the percent of colonies with cells exhibiting this morphology was less (30%) than that observed with the mutated gene, but increased significantly as compared with the untransfected HeLa cells, or cells transfected with the pSV2-neo vector alone (10 and 15%, respectively).

3.2. Expression of *c-H-ras* in the transfected cells

To ascertain whether the effects observed after transfecting HeLa cells with RAS^{G12}/neo, and

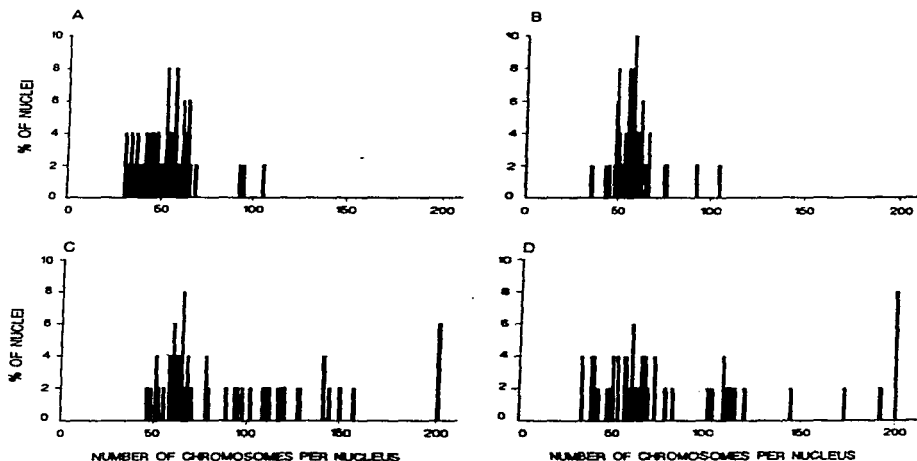


Fig. 5. Abnormal expression of *H-ras* alters chromosome number distribution. Cells were grown for 42 h and then exposed to colcemid for 2 h. Cytogenetic analysis was performed counting 100 metaphases. A: non-transfected HeLa cells. B: pSV2-neo transfected clone. C: RAS^{G12}/neo transfected clone. D: RAS^{G12}/neo clone.

RAS^{mut}/neo are due to abnormal expression of the *c-H-ras* genes, mRNA was extracted from cloned cells, and analyzed by Northern blotting. A 6.6-kb BamHI fragment containing human *c-H-ras* se-

quences was used as probe. An overexpressed *c-H-ras* transcript (1.2 kb) was detected in cells transfected with RAS^{mut}/neo (Fig. 3, upper panel, lane 2), and perhaps is responsible for the observed alter-

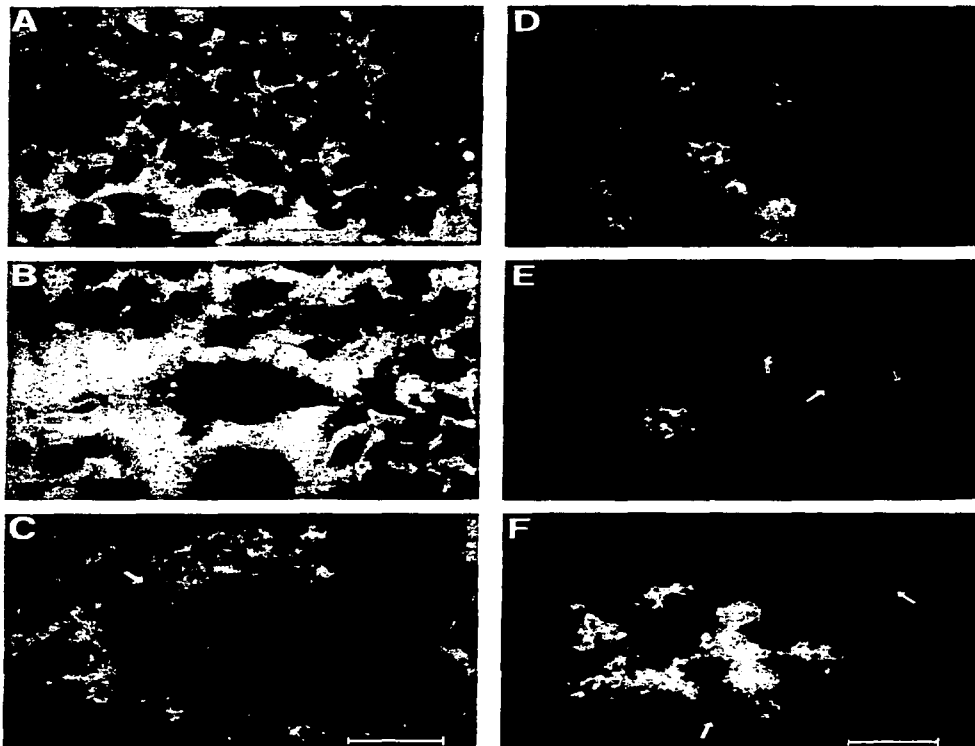


Fig. 6. Nuclear abnormalities induced by *H-ras*. Left panel: hematoxylin-eosin staining of giant cells with an abnormal number of nuclei. A, pSV2-neo transfected clone; B, RAS^{mut}/neo transfected clone; C, RAS^{mut}/neo transfected clone. Bar = 40 μ m. Right panel: Chromatin structure was visualized by staining with DAPI, 72 h after seeding. D, pSV2-neo transfected clone; E, RAS^{mut}/neo transfected clone; F, RAS^{mut}/neo transfected clone. Bar = 25 μ m. Arrows indicate micronuclei.

ations induced by the normal *Ras* gene. In contrast, we observed only basal expression in the RAS^{mut}/neo transfected clone. The very low detectable c-H-*ras* transcripts in these cells (RAS^{mut}/neo), or in the pSV2-neo clone were not due to loading or transfer discrepancies, because the same amount of RNA was detected using a GAPDH probe (lower panel).

3.3. Changes in cell cycle distribution associated with abnormal expression of *Ras*

The distribution of cells over different phases of the cell cycle in the clones that contained giant, multinucleated cells and small ones was analyzed. Selected clones were cultured and analyzed using standard flow cytometry: cells were lysed and their nuclei stained with DAPI, to label double-stranded DNA. Transfection of HeLa cells, with either RAS^{wt}/neo, or RAS^{mut}/neo resulted in altered cell cycle parameters. Fig. 4 shows typical histograms of DNA content obtained at several times after seeding. Peak 1 corresponds to nuclei from cells in G1 phase of the cell cycle. Peak 2 corresponds to nuclei with double content of DNA, typically obtained from cells in G2/M. The nuclei from cells in the S phase are recorded between these two peaks. The quantity of nuclei in a peak (2') that is shifted to the left, relative to peak 2, was significantly increased in both clones containing either normal, or mutated genes. We also observed a third peak (3), corresponding to nuclei with a large amount of DNA. These results indicate that the introduction of normal, or mutated c-H-*ras* gene, induces alterations in the cell cycle of HeLa cells.

In addition, we observed in the RAS^{mut}/neo clones, that 72 h after seeding cultures at high density peak 2' disappears, probably reflecting the destruction of a subpopulation of these cells (Fig. 4). This phenomenon was not observed in the RAS^{wt}/neo clones. The additional peak (3), located to right of the peak 2' corresponds to nuclei with an abnormal content of DNA, probably giant nuclei with an increased number of chromosomes.

3.4. Increased number of chromosomes in giant multinucleated cells

HeLa cells are heteroploid, with a chromosome number per cell ranging from 38 to 106 (Lewin,

1980). HeLa cells used in the present study showed a chromosome number per cell ranging from 30 to 105. Ras-containing clones showed an increased number of chromosomes per cell, as shown in Fig. 5. While nuclei from the RAS^{wt}/neo clone exhibited between 45 and 200 chromosome per cell, in the RAS^{mut}/neo clone, nuclei were found to contain between 33 and 200 chromosomes per cell (Fig. 5C, D). Nuclei from the pSV2-neo clone did not exhibit any differences with respect to the non-transfected cultures (35–104 chromosomes per cell). These results indicate that abnormal expression of *ras* affects the integrity of the mechanisms that maintain the correct number of chromosomes per cell.

We also observed that Ras induces formation of micronuclei, and gross failure in the mechanisms that controls cytokinesis, because cells with two, three or more nuclei were observed (Fig. 6). We interpret these results as indicative of a connection between Ras and the mechanisms that control cytokinesis.

4. Discussion

In this work we have analyzed the effect of an abnormal c-H-*ras* expression, on morphological, cell-cycle and growth characteristics of HeLa cells. Permanent expression of c-H-*ras* genes, either normal or mutated, linked to a neo selection marker, was found to induce gross morphological alterations in these cells. One dramatic and readily detected effect was the appearance of giant cells with multiple nuclei. These giant cells were found to undergo a limited number of divisions, and finally die as a consequence of what is called 'mitotic catastrophe'.

Several antineoplastic agents have been reported to induce the formation of cells with two or more nuclei both in vivo and in vitro (Barni et al., 1985a, Barni et al., 1985b; Pellicer et al., 1987; Redilla, 1993). Aggarwal (1974) and Sodhi (1977) reported that cisplatin induced binucleated and multinucleated giant cells in Sarcoma-180 cultures, by inhibiting cytokinesis. Tounekti et al. (1993) described that bleomycin induces formation of giant polynucleated cells that die from mitotic death. Likewise, Lock et al. (1994) described the formation of giant HeLa cells, with several evenly stained nuclei and micronuclei that undergo mitotic death after treatment with etoposide.

The molecular mechanisms by which the induction of multinucleated cells with micronuclei are produced are far from understood. Possibilities, such as malpositioning of the centrosomes (Searle and Bloom, 1979), disruption of tubuline polymerization, or microfilaments and microtubules (Aggarwal et al., 1980; Peyrot et al., 1986), and even on actin/myosin polymerization (responsible for the formation of the contractile ring) during mitosis, and/or cytokinesis, could be directly involved in the formation of multinucleated cells.

When we analyzed the expression of the transfected *c-H-ras* genes by Northern blotting, we observed that the wt allele was overexpressed as compared to the endogenous allele and to the mutant form. These results indicated to us that inappropriate expression of *c-H-ras*, either by overexpression of a wt allele or, by the presence of a mutant form, lead to almost similar phenotypic changes in HeLa cells. The effect of mutant or normal *c-H-ras* inappropriate expression in HeLa cells, although leading to similar changes, were distinct. Although normal Ras overexpression eventually leads to the formation of giant cells, it did it in a less dramatic way than the expression of a mutant form (Val12). When the appearance of these giant cells was analyzed as a function of time, significant differences were observed between the clones containing the normal or the mutant forms of this gene.

When we analyzed cell-cycle parameters of cells, from clones expressing the normal or the mutant allele, we found they produced a population of cells that contained an increased content of DNA as shown by the presence of a peak that does not behave as a population of cells arrested in G2/M. We believe that these clones give rise to a subset of cells with an increased content of DNA, that undergo mitotic catastrophe and finally die.

We observed giant nuclei in multinucleated cells, that contained a higher amount of chromosomes. Cultured fibroblasts from p53 deficient mouse embryos, exposed to spindle inhibitors underwent multiple rounds of DNA synthesis without completing chromosome segregation, thus forming tetraploid and octaploid cells (Cross et al., 1995)

Similar mechanisms have been described in human cells treated with staurosporine, a microbial alkaloid. Human lymphocytic MOLT-4 cells were

arrested initially in G2 by staurosporine; then these cells initiated additional rounds of DNA replication without cell division. Staurosporine also induced severe changes in the morphology of these cells, manifested as cell enlargement, nuclear elongation and extensive fragmentation, and micronucleation (Bruno et al., 1992; Usui et al., 1992). It is known that staurosporine is a potent inhibitor of a variety of protein kinases and Usui et al. (1992) have reported that in rat diploid fibroblasts the full activation of p34^{cdc2} kinase during G2/M was blocked in vivo by an analogue of staurosporine.

In mammalian cells, *cdc2* and *cdk2* are among genes that are induced in quiescent cells by mitogen or serum stimulation (Müller et al., 1993). Several extracellular signals involving mitogen or serum stimulation pass through Ras. Recently, it has been suggested that Ras may regulate at least two downstream signal transduction pathways, one controlling translation, transcription and the cell cycle, and the other controlling cytoskeletal organization. The first pathway, referred to as the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway includes a set of cytoplasmic growth factor-regulated serine/threonine kinases that act on both ribosomal and nuclear factors. The second pathway, referred to as the Rho/Rac pathway includes a set of Ras-related GTP-binding proteins that control the spatial pattern of actin polymerization in the cell (Prendergast and Gibbs, 1993). Some MAPKs (or ERKs) show both genetic complexity and a structural relationship to the *cdc2* family of kinases that are involved in cell cycle regulation (Prendergast and Gibbs, 1993). A possibility is that the introduction of *c-H-ras* alters the regulation of cell-cycle through proteins such as *cdc2*, *cdk2* and cyclins.

The suggested model is that Ras could interfere with the regulation of cellular morphology and cell cycle at two levels: (1) extranuclear, affecting the cytoskeleton through Rho and Rac, and altering mechanisms such as the correct separation of sister chromatids and cytokinesis during mitosis; and (2) nuclear, interfering with the regulation of proteins such as *cdc2*, *cdk2* and cyclins, and affecting several mechanisms such as the cellular memory of the actual cell-cycle position and the regulation of the correct number of chromosomes per nucleus and cell size.

Our results are in agreement with the suggested model, because inappropriate expression of *H-ras* induces alterations in cell morphology, cell cycle, cytokinesis and karyokinesis. Further studies are required to elucidate the exact mechanisms by which *Ras* participates in the regulation of these events.

Acknowledgements

We acknowledge Dr. Chang for her generous gift of plasmids pEC and pEJ, Dr. López Revilla for pSV2-neo, and Dr. Melendez for the GAPDH probe. We thank C. Sánchez for obtaining pEC-neo, and M. Guido for excellent technical assistance. B. Arcangioli, D. DeMarini and F. Salamanca are gratefully acknowledge for stimulating discussions, and helpful suggestions. This research was partially supported by grants from CONACYT (1705M9209), PAPIIT (IN21394), PADEP (3320 and 3334), and GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit. E.I.M. was the recipient of a fellowship from PUIS-UNAM.

References

- Aggarwal, S.K. (1974) Inhibition of cytokinesis in mammalian cells by *cis*-dichloro-diammine-platinum (II). *Cytobiologie*, **8**, 395-452.
- Aggarwal, S.K., M.W. Whitehouse and C. Ramchandrai (1980) Ultrastructural effects of cisplatin, in: A.W. Prestayko, S.T. Crooke and S.K. Carter (Eds.), *Cisplatin, Current Status and New Developments*, Academic Press, New York, pp. 79-111.
- Barni, S., G. Bernocchi, E. Scherini and V. Mares (1985a) Growth and polyploidization of the liver of early postnatal rats treated with bleomycin. *Cell. Biol. Int. Rep.*, **9**, 933-1002.
- Barni, S., E. Scherini, M. Biggiogera and V. Mares (1985b) Fine structure of rat hepatocytes after treatment with *cis*-dichlorodiammineplatinum II (*cis*-DDP) during postnatal development. *Med. Biol. Environ.*, **13**, 307-315.
- Bokoch, G.M. and C.J. Der (1993) Emerging concepts in the *Ras* superfamily of GTP-binding proteins. *FASEB J.*, **7**, 750-759.
- Bruno, S., B. Ardelit, J.S. Skierski, F. Traganos, and Z. Darzynkiewicz (1992) Different effects of Staurosporine, an inhibitor of protein kinases, on the cell cycle and chromatin structure of normal and leukemic lymphocytes. *Cancer Res.*, **51**, 470-473.
- Busse, P.M., S.K. Bose, R.W. Jones and L.J. Tolmarch (1977) The action of caffeine on X-irradiated HeLa cells. II. Synergistic lethality. *Radiat. Res.*, **71**, 666-677.
- Chang, W.P. and J.B. Little (1991) Delayed reproductive death in X-irradiated chinese hamster ovary cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, **60**, 483-496.
- Cross, S.M., C.A. Sanchez, C.A. Morgan, M.K. Schimke, S. Ramel, R.L. Idzerda, W.H. Raskind and B.J. Reid (1995) A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science*, **267**, 1353-1356.
- Durkin, J.P. and J.F. Whitfield (1987) The viral *Ki-ras* gene must be expressed in the G2 phase if its Kirsten Sarcoma Virus-infected NRK cells are to proliferate in serum-free medium. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 444-449.
- Egan, S.E. and R.A. Weinberg (1993) The pathway to signal achievement. *Nature*, **365**, 781-783.
- Fingert, H.J., J.D. Chang and A.B. Pardee (1986) Cytotoxic cell cycle, and chromosomal effects of methylxanthines in human tumor cells treated with alkylating agents. *Cancer Res.*, **46**, 2463-2467.
- Guido, M.C., R. Zamorano, E. Garrido-Guerrero, P. Gariglio and A. García-Carrancá (1992) Early promoters of genital and cutaneous human papillomaviruses are differentially regulated by the bovine papillomavirus type 1 E2 gene product. *J. Gen. Virol.*, **73**, 1395-1400.
- Howe, P.H., S.F. Dobrowolski, K.B. Reddy and D.W. Stacey (1993) Release from G1 growth arrest by transforming growth factor β 1 requires cellular *ras* activity. *J. Biol. Chem.*, **268**, 21448-21452.
- Lewin, B. (1980) *Gene Expression*, Vol. 2, Eucaryotic Chromosomes. Wiley and Sons, New York, pp. 144-145.
- Lock, R.B. and W.E. Ross (1990) Possible role for p34^{cdc2} kinase in etoposide-induced cell death of Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.*, **50**, 3767-3771.
- Lock, R.B., O.V. Galperina, R.C. Feldhoff and L.J. Rhodes (1994) Concentration-dependent differences in the mechanisms by which caffeine potentiates etoposide cytotoxicity in HeLa cells. *Cancer Res.*, **54**, 4933-4939.
- Lowy, D.R. and B.M. Willumsen (1993) Function and regulation of *ras*. *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 851-891.
- Moodie, S.A. and A. Wolfman (1994) The 3Rs of life: *Ras*, Raf and growth regulation. *TIG*, **10**, 44-48.
- Müller, R., D. Mumberg and F.C. Lucibello (1993) Signals and genes in the control of cell-cycle progression. *Biochim. Biophys. Acta*, **1155**, 151-179.
- Pellicer, J.A., J. Pertusa and V. Alcocer (1987) Binucleated cells in the Ehrlich ascites tumor. *Action of 5-Fluorouracil*. *Biol. Cell.*, **60**, 255-258.
- Peyrot, V., C. Briand, R. Momburg and J.C. Sari (1986) In vitro mechanism study of microtubule assembly inhibition by *cis*-dichlorodiammine-platinum (II). *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 371-375.
- Prendergast, G.C. and J.B. Gibbs (1993) Pathways of *ras* function: connections to the actin cytoskeleton. *Adv. Cancer Res.*, **62**, 19-64.
- Rodilla, V. (1993) Origin and evolution of binucleated cells and binucleated cells with micronuclei in cisplatin-treated CHO cultures. *Mutation Res.*, **300**, 281-291.
- Sarnbrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis (1989) *Molecular Cloning*, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York, pp. 7.6-7.52.
- Schiano, M.A., B.U. Sevin, J. Ferrus, R. Ramos, E.H. Wolloch and H.E. Averetta (1991) In vitro enhancement of *cis*-platinum

- antitumor activity by caffeine and pentoxifylline in a human ovarian cell line. *Gynecol. Oncol.*, 43, 37-45.
- Schwarz, E., U.K. Freese, L. Gissmann, W. Mayer, B. Roggenbuck, A. Stremlau and H. zur Hausen (1985) Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*, 314, 111-114.
- Searle, B.M. and S.E. Bloom (1979) Influence of the *hm* gene on mitosis of immature red blood cells in turkey. *J. Heredity*, 70, 155-160.
- Sodhi, A. (1977) Origin of giant cells in regressing sarcoma-180 after *cis*-dichlorodiammineplatinum (II) treatment, a fine structural study. *J. Clin. Hematol. Oncol.*, 7, 569-579.
- Tounkitt, O., G. Pron, J. Behrdrak Jr. and L.M. Mir (1993) Bleomycin, an apoptosis-mimetic drug that induces two types of cell death depending on the number of molecules internalized. *Cancer Res.*, 53, 5462-5469.
- Usui, T., M. Yoshida, K. Abe, H. Osada, K. Isono, and T. Beppu (1992) Uncoupled cell cycle without mitosis induced by a protein kinase inhibitor, K-252a. *J. Cell Biol.*, 115, 1275-1282.
- Vega, L., M.E. Gonsebatt, and P. Ostrosky-Wegman (1995) Aneugenic effect of sodium arsenite on human lymphocytes in vitro: an individual susceptibility effect detected. *Mutation Res.*, 334, 365-373.
- Zucker, R.M., D.J. Adams, K.W. Bair and K.H. Elstein (1991) Polyploidy induction as a consequence of topoisomerase inhibition. *Biochem. Pharmacol.*, 42, 2199-2208.

Discusión.

Los resultados de este trabajo muestran que la transfección de las células HeLa con el gen *c-H-ras* normal provoca la generación de diferentes tipos de células: algunas de ellas incapaces de proliferar (que se mueren por catástrofe mitótica), otras que proliferan muy lentamente y que no desarrollan tumores (al menos por algún tiempo), y otras que retienen la capacidad de formar tumores, aunque de menor tamaño que los controles. La posible explicación a esto podría ser la falta de un control en cuanto al número de copias del gen *c-H-ras* que entran a la célula, así como en cuanto a la inserción en diferentes sitios del genoma, activos o no para la transcripción; el consenso es que el DNA transfectado *in vitro* a las células de mamífero se integra al azar. Esto indica que debe existir una expresión heterogénea del gen en las diferentes células, dando por resultado los diferentes efectos observados. De hecho se logró comprobar que una de las clonas, en la que se observó una marcada supresión de la tumorigenicidad, presenta varias copias del gen normal. Muschel (1990) ha reportado que durante la transfección del gen *H-ras* a células de ratón, al menos cinco copias del gen se integran en un sitio específico del cromosoma 3 del ratón, posiblemente mediante recombinación homóloga. El que se haya detectado la presencia de varias copias del gen *c-H-ras* en una de nuestras clonas está en concordancia con lo observado en otra de ellas, que presentó una muerte mitótica acusada, y en la cual se encontró que tenía niveles aumentados de expresión del gen *c-H-ras* normal. Chang y cols. (1982) reportaron que la elevada expresión del gen *c-H-ras* normal es capaz de transformar células normales, cosa que estaría en contra de nuestros datos. Sin embargo Paterson y cols. (1987) lograron aislar revertantes no tumorigénicas a partir de células de un fibrosarcoma humano HT1080 (heterocigotas para *N-ras* es decir, tienen un alelo normal y un alelo mutado). Tales revertantes poseen copias adicionales

del alelo normal (generadas mediante un incremento en la ploidia cromosómica), lo cual se traduce en un aumento del mRNA, y de la proteína p21 Ras normal, manteniendo niveles inferiores de expresión del alelo mutado. Así mismo Spandidos y Wilkie (1988) reportaron que es posible suprimir el fenotipo tumorigénico de fibroblastos de rata 208F (transformados con el gen *c-H-ras* mutado), mediante la transfección con el gen *c-H-ras* normal, siempre y cuando la proteína Ras normal se exprese a niveles elevados con respecto a la proteína mutada. Estos dos trabajos están en concordancia con lo encontrado por nosotros. En algunas de nuestras clonas fue imposible evaluar la tumorigenicidad, ya que las células se murieron antes de poder expandirlas en número suficiente para su inyección en los ratones atímicos desnudos. Sin embargo, se puede concluir que en las células transfectadas con el gen *c-H-ras* normal que generaron tumores, el tamaño de estos fue menor que el obtenido con los controles, lo que indica que este gen en su versión normal induce una inhibición del crecimiento del tumor.

En el caso de las células que fueron incapaces de proliferar y se murieron, la muerte mitótica fue comprobada por la observación de las serias alteraciones morfológicas presentes en estas células como son el aumento exagerado del tamaño celular y la presencia de varios núcleos. Además, la existencia de una gran cantidad de cromosomas (>200), así como la detención del ciclo celular entre las fases S y G₂/M son evidencias que apoyan la afirmación anterior. O'Brien y cols. (1986) reportaron que fibroblastos normales de humano transfectados con el gen *v-K-ras*, generan microtumores (al ser inyectados en ratones atímicos desnudos) para enseguida envejecer y morir. Esto apoyaría la idea de que el envejecimiento con la subsecuente muerte podría ser un mecanismo de protección antitumoral. Igualmente Hicks y cols. (1991) reportaron que la transfección y concomitante expresión aumentada del gen *H-ras* mutado en fibroblastos

embrionales de rata REF52 induce una detención del ciclo celular en las fases G_1/S y G_2/M , ocasionando finalmente la muerte de las células. Los anteriores trabajos están en concordancia con lo encontrado por nosotros ya que la transfección con el gen *c-H-ras* mutado indujo una detención entre las fases $S/G_2/M$ del ciclo celular así como la muerte de una subpoblación de células HeLa. Koi y cols. (1993) reportaron que un fragmento subcromosómico conteniendo DNA del cromosoma 11, es capaz de inducir una detención del ciclo celular, y que tal fragmento se localiza entre el gen de la β -globina y el de la insulina (lugar donde se localiza el gen *c-H-ras*). En base a lo que nosotros encontramos en el presente trabajo se puede sugerir que es el gen *c-H-ras* el responsable de esa detención del ciclo celular, ya que como se mencionó, tanto el gen silvestre como el mutado indujeron una detención del ciclo entre las fases $S/G_2/M$ así como la muerte de una subpoblación de células HeLa. La muerte mitótica no fue un efecto del antibiótico G-418 o de la expresión del gen *neo*, ya que en las células HeLa transfectadas únicamente con el plásmido pSV2-*neo* no se observó tal fenómeno; además se sabe que la expresión de este gen (que confiere resistencia a la neomicina en células de mamífero) en algunos casos induce cambios en la expresión y el metabolismo celular, pero nunca la muerte de las células transfectadas (Valera y cols., 1994).

Durante la muerte mitótica la célula pierde el control del ciclo celular y de los mecanismos que controlan la existencia de un solo núcleo por célula. Además, pierde el control del número de cromosomas por núcleo y el control del tamaño celular. Se ha reportado que algunos agentes como el cis-platino, la bleomicina, el etopósido y la staurosporina son capaces de inducir la muerte mitótica (Lock y Ross, 1990; Bruno y cols., 1992; Usui y cols., 1992; Rodilla, 1993; Tounekti y cols., 1993). El mecanismo de acción de estos agentes es poco conocido

en la actualidad, sin embargo se piensa que de algún modo interfieren con la polimerización de los microfilamentos y los microtúbulos, alterando la formación del huso acromático y de los centriolos. Lo anterior ocasiona que la célula sea incapaz de llevar a cabo en forma adecuada procesos como la mitosis, la cariocinesis y la citocinesis. Así mismo algunos de estos agentes, como la staurosporina, podrían interactuar con las cinasas (CDC, CDK) inhibiéndolas y afectando finalmente a los controles del ciclo celular (Bruno y cols., 1992; Usui y cols., 1992).

Lo interesante de esto sería el encontrar una explicación acerca del porque la expresión aumentada de *c-H-ras* normal (generada ya sea por la inserción de varias copias o por la integración del gen en algún sitio muy activo) o bien la transfección del gen mutado inducen alteraciones similares a las de las drogas mencionadas. Al parecer la alteración de la cascada de señales que pasa a través de Ras induce anormalidades en el funcionamiento de las cinasas, la traducción, la transcripción y la organización del citoesqueleto, lo cual conduce finalmente a la pérdida del control del ciclo celular y del ciclo metabólico de la célula. Se sabe que Ras está conectado directamente con la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos, y que esta ruta actúa sobre factores ribosomales y nucleares que controlan la traducción y la transcripción (Prendergast y Gibbs, 1993). También se sabe que Ras está conectado con la ruta denominada Rho/Rac que incluye un grupo de proteínas relacionadas a Ras que controlan la polimerización de la actina y el citoesqueleto en la célula (Prendergast y Gibbs, 1993).

Considerando todo lo anterior es posible proponer un modelo, en el que Ras interfiere con la regulación de la morfología celular y el ciclo celular a dos niveles: (1) fuera del núcleo, afectando al citoesqueleto a través de Rho y Rac, alterando mecanismos que controlan la correcta separación de las cromátidas hermanas y la citocinesis al final de la mitosis, (2) dentro del núcleo,

interfiriendo con la regulación de proteínas tales como *cdc2*, *cdk2* y las ciclinas, y afectando mecanismos que controlan la memoria celular de la posición actual dentro del ciclo celular y el tamaño de la célula.

Dependiendo del grado de alteración causada (por la expresión aumentada del gen normal) a estos dos niveles, la célula podría morir por catástrofe mitótica o simplemente disminuir su proliferación, con lo que se generan los tumores de menor tamaño observados.

Una alternativa para mejorar el método y asegurarse de que todas las células bien sea que sufran muerte mitótica o bien proliferen sin formar tumores podría ser el uso de un vector de expresión conteniendo al gen *c-H-ras* normal, con lo que se podría regular la expresión del gen e inducir los efectos observados en forma controlada.

Por lo pronto podemos concluir que la elevada expresión del gen *c-H-ras* normal transfectado en las células HeLa detiene la proliferación en algunas de ellas y les induce la muerte mitótica, lo cual podría representar un avance en la búsqueda de estrategias para detener el crecimiento de las células de cáncer.

Referencias.

- Alexander WS, Adams JM, Cory S: Oncogene cooperation in lymphocyte transformation: malignant conversion of E μ -*myc* transgenic Pre-B cells in vitro is enhanced by v-H-*ras* or v-*raf* but not v-*abl*. Mol Cell Biol 9:67-73, 1989.
- Ali IU, Lindereau R, Theillet C, Callahan R: Reduction to homozygosity of genes on chromosome 11 in human breast neoplasia. Science 238:185-188, 1987.
- Ames BN: Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. Science 204:587-593, 1979.
- Anderson MJ, Stanbridge EJ: Tumor suppressor genes studied by cell hybridization and chromosome transfer. The FASEBJ 7:826-833, 1993.
- Balmain A, Ramsden M, Bowden GT, Smith J: Activation of the mouse cellular Harvey-*ras* gene in chemically induced benign skin papillomas. Nature 307:658-660, 1984.
- Baltensperger K, Kozma LM, Cherniack AD, Klarlund JK, Chawla A, Banerjee U, Czech MP: Binding of the Ras activator Son of Sevenless to insulin receptor substrate-1 signaling complexes. Science 260:1950-1955, 1993.
- Barbacid M: *ras* genes. Ann Rev Biochem 56:779-827, 1987.
- Barroso E, Rendon J, Medina R, De la Mora S: Registro Nacional del Cáncer, estado actual y perspectivas. Rev INCan 32:190, 1986.
- Bar-Sagi D, Feramisco JR: Microinjection of the Ras oncogene protein into PC12 cells induces morphological differentiation. Cell 42:841-848, 1985.

- Bell DA, Thompson CL, Taylor J, Miller CR, Perera F, Hsieh LL, Lucier GW: Genetic monitoring of human polymorphic cancer susceptibility genes by polymerase chain reaction: application to glutathione transferase mu. *Environ Health Perspec* 98:113-117, 1992.
- Bishop JM: Viral oncogenes. *Cell* 42:23-38, 1985.
- Bishop JG, Corces VG: Expression of an activated *ras* gene causes developmental abnormalities in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev* 2:567-577, 1988.
- Bock T, Marsh Y: Proto-oncogenes in cell development. *Ciba Foundation Symposium* 150. Wiley y Sons. Chichester, 1990.
- Bokoch GM, Der CJ: Emerging concepts in the Ras superfamily of GTP-binding proteins. *The FASEB Journal* 7:750-759, 1993.
- Bookstein R, Shew JY, Chen PL, Scully P, Lee WH: Suppression of tumorigenicity of human prostate carcinoma cells by replacing a mutated Rb gene. *Science* 247:712-715, 1990.
- Bos JL, Toksoz D, Marshall CJ, Verlaan-deVries M, Veeneman GH, van der Eb AJ, van Boom JH, Janssen JWG, Steenvoorden ACM: Amino-acids substitutions at codon 13 of the *N-ras* oncogene in human acute myeloid leukaemia. *Nature* 315:726-730, 1985.
- Boulikas T: Control of DNA replication by protein phosphorylation. *Anticancer Res* 14:2465-2472, 1994.
- Brock HW: Sequence and genomic structure of *ras* homologues *dmpas85d* and *dmpas64b* of *Drosophila melanogaster*. *Gene* 51:129-138, 1987.
- Brugge JS, Erikson RL: Identification of a transformation-specific antigen induced by an avian sarcoma virus. *Nature* 269:346-348, 1977.

- Bruno S, Ardel B, Skierski JS, Traganos F, Darzynkiewicz Z: Different effects of Staurosporine, an inhibitor of protein kinases, on the cell cycle and chromatin structure of normal and leukemic lymphocytes. *Cancer Res* 51:470-473, 1992.
- Campo MS, McCaffery RE, Doherty I, Kennedy IM, Jarret WFH: The Harvey *ras* 1 gene is activated in papillomavirus-associated carcinomas of the upper alimentary canal in cattle. *Oncogene* 5:303-308, 1990.
- Capon DJ, Chen EY, Levinson AD, Seeburg PH, Goeddel DV: Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. *Nature* 302:33-37, 1983a.
- Capon DJ, Seeburg PH, McGrath JP, Hayflick JS, Edman U, Levinson AD, Goeddel DV: Activation of Ki-*ras*2 gene in human colon and lung carcinomas by two different point mutations. *Nature* 304:507-511, 1983b.
- Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphree AL, Strong LC, White RL: Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 305:779-784, 1983.
- Cavenee WK, Hansen MF, Nordenskjold M, Kock E, Maumenee Y: Genetic origin of mutations predisposing to retinoblastoma. *Science* 228:501-503, 1985.
- Chang EH, Furth ME, Scolnick EM, Lowy DR: Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. *Nature* 297:479-483, 1982.
- Chang WP, Little JB: Delayed reproductive death in X-irradiated chinese hamster ovary cells. *Int J Radiat Biol* 60:483-496, 1991.

- Chardin P, Camonnois JH, Gale NW, Aelst LV, Schlessinger J, Wigler MH, Bar-Sagi D: Human Sos1: A guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science* 260:1338-1343, 1993.
- Charles DR, Luce-Clausen EM: The kinetics of papilloma formation in benzpyrene-treated mice. *Cancer Res* 2:261, 1942.
- Collet MS, Erikson RL: Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus *src* gene product. *PNAS(USA)* 75:2021-2024, 1978.
- Cooper GM: Oncogenes as markers for early detection of cancer. *J Cell Biochem Suppl* 16G:131-136, 1992.
- Cooper JA, Howell B: The when and how of Src regulation. *Cell* 73:1051-1054, 1993.
- Cowley G: The hunt for a breast cancer gene. *Newsweek* Dec. 6:40-45, 1993.
- Craig RW, Sager R: Suppression of tumorigenicity in hybrids of normal and oncogene-transformed CHEF cells. *PNAS(USA)* 82:2062-2066, 1985.
- Crawford LV, Pim DC, Gurney EG, Goodfellow P, Taylor-Papadimitriou J: Detection of a common feature in several human tumor cell lines - a 53,000-Dalton protein. *PNAS(USA)* 78:41-45, 1981.
- Cuadrado A, Bruder JT, Herdaran MA, App H, Rapp UR, Aaronson SA: H-*ras* and *raf-1* cooperate in transformation of NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* 8:2443-2448, 1993.
- Debruyne FMJ, Schalken JA: *Biología Clínica del cáncer. Triángulo. Biología del Cáncer.* 31:1-8, 1993.
- DeCaprio JA, Ludlow JW, Lynch D, Furukawa Y, Giffin J: The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. *Cell* 58:1085-1095, 1989.

- DeFeo D, Gonda MA, Young HA, Chang EH, Lowy DR: Analysis of two divergent rat genomic clones homologous to the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus. PNAS(USA) 78:3328-3332, 1981.
- DeFeo-Jones DE, Scolnick EM, Koller R, Dhar R: *ras*-related gene sequences identified and isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. Nature 306:707-709, 1983.
- Dent P, Haser W, Haystead TAJ, Vincent LA, Roberts TM, Sturgill TW: Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and in vitro. Science 257:1404-1407, 1992.
- Der CJ, Krontiris TG, Cooper GM: Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the *ras* genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. PNAS(USA) 79:3637-3640, 1982.
- Dhar R, Nieto A, Koller R, Defeo-Jones D, Scolnick EM: Nucleotide sequence of two *ras*^H-related genes isolated from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res. 12:3611-3618, 1984.
- Duhem C, Ries F, Dicato M: Apoptosis and cancer. Bull Soc Sci Med Grand Duche Luxemb 131:39-48, 1994.
- Durkin JP, Whitfield JF: The viral Ki-*ras* gene must be expressed in the G2 phase if *ts* Kirsten Sarcoma Virus-infected NRK cells are to proliferate in serum free medium. Mol Cell Biol 7:444-449, 1987.
- Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E: The human papillomavirus 16 - E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. Science 243:934-937, 1989.
- Egan SE, Weinberg RA: The pathway to signal achievement. Nature 365:781-783, 1993.

- Eliyahu D, Michalovitz D, Eliyahu J, Pinhasi-Kimhi O, Oren M: Wild-type p53 can inhibit oncogene mediated focus formation. PNAS(USA) 86:8763-8767, 1989.
- Fearon ER, Antonarakis SE, Meyers DH, Levine MA: C-Ha-ras-1 oncogene lies between β -globin and Insulin loci on human chromosome 11p. Am J Hum Genet 36:329-337, 1984.
- Fearon ER, Feinberg AP, Hamilton SH, Vogelstein B: Loss of genes on the short arm of chromosome 11 in bladder cancer. Nature 318:377-380, 1985.
- Feig LA: Strategies for suppressing the function of oncogenic Ras protein in tumors. JNCI 85:1266-1268, 1993.
- Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ: The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. Cell 57:1083-1093, 1989.
- Finney RE, Bishop JM: Predisposition to neoplastic transformation caused by gene replacement of H-ras1. Science 260:1524-1427, 1993.
- Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg R, Rapaport J, Albert D, Dryja T: A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. Nature 323:643-646, 1986.
- Fujiyama A, Tamanoi F: Processing and fatty acid acylation of RAS1 and RAS2 proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. PNAS(USA) 83:1266-1270, 1986.
- Fukui Y, Kaziro Y: Molecular cloning and sequence analysis of a *ras* gene from *Schizosaccharomyces pombe*. EMBOJ 4:687-692, 1985.
- Fukui Y, Kozasa T, Kaziro Y, Takeda T, Yamamoto M: Role of a *ras* homolog in the life cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. Cell 44:329-336, 1986.

- Gallo RC, Wong-Staal F: Retroviruses as etiologic agents of some animal and human leukemias and lymphomas and as tools for elucidating the molecular mechanism of leukemogenesis. *Blood* 60:545-557, 1982.
- Gallo RC: The virus-cancer story. *Hospital Practice* 18:79-89, 1983.
- Gambke C, Signer E, Moroni C: Activation of N-*ras* gene in bone marrow cells from a patient with acute myeloblastic leukaemia. *Nature* 307:476-478, 1984.
- Geiser AG, Der CJ, Marshall CJ, Stanbridge EJ: Suppression of tumorigenicity with continued expression of the c-H-*ras* oncogene in EJ bladder carcinoma-human fibroblast hybrid cells. *PNAS(USA)* 83:5209-5213, 1986.
- Gey GO, Coffman WD, Kubicek MT: Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res* 12:264-265, 1952
- Gibbs JB, Sigal IS, Poe M, Scolnick EM: Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic Ras p21 molecules. *PNAS(USA)* 81:5704-5708, 1984.
- Gibbs JB, Marshall MS: The *ras* oncogene - an important regulatory element in lower eucaryotic organisms. *Microbiol Reviews* 53:171-185, 1989.
- Goldfarb M, Shimizu K, Perucho M, Wigler M: Isolation and preliminary characterization of a human transforming gene from T24 bladder carcinoma cells. *Nature* 296:404-409, 1982.
- Greenhalgh DA, Welty DJ, Player A, Yuspa SH: Two oncogenes, *v-fox* and *v-ras*, cooperate to convert normal keratinocytes to squamous cell carcinoma. *PNAS(USA)*87:643-647, 1990.
- Hall A: A biochemical function for Ras - At last. *Science* 264:1413-1414, 1994.
- Hansen MF, Cavence WK: Genetics of cancer predisposition. *Cancer Res* 47:5518-5527, 1987.

- Harris H, Miller OJ, Klein G, Worst P, Tachibana T: Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature* 223:363-368, 1969.
- Harvey JJ: An unidentified virus which causes the rapid reproduction of tumors in mice. *Nature* 204:1104-1105, 1964.
- Hass R: Retrodifferentiation and cell death. *Crit Rev Oncog* 5:359-371, 1994.
- Hicks GG, Egan SE, Greenberg AH, Mowat M: Mutant p53 tumor suppressor alleles release *ras*-induced cell cycle growth arrest. *Mol Cell Biol* 11:1344-1352, 1991.
- Hofmann M, Rudy W, Güntherth U, Zimmer SG, Zawadzki V, Zöller M, Lichtner RB, Herrlich P, Ponta H: A link between *ras* and metastatic behavior of tumor cells: *ras* induces CD44 promoter activity and leads to low-level expression of metastasis-specific variants of CD44 in CREB cells. *Cancer Res* 53:1516-1521, 1993.
- Hoffman B, Lieberman DA: Molecular controls of apoptosis: differentiation/growth arrest primary response genes, proto-oncogenes, and tumor suppressor genes as positive & negative modulators. *Oncogene* 9:1807-1812, 1994.
- Howe PH, Dobrowolski SF, Reddy KB, Stacey DW: Release from G1 growth arrest by transforming growth factor β 1 requires cellular Ras activity. *J Biol Chem* 268:21448-21452, 1993.
- Howe LR, Marshall CJ: Identification of amino acids in p21ras involved in exchange factor interaction. *Oncogene* 8:2583-2590, 1993.
- Huang HJ, Yee JK, Shew JY, Chen PL, Bookstein R, Friedman T, Lee YHP, Lee WH: Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the Rb gene in human cancer cells. *Science* 242:1563-1566, 1988.

- Hunter T, Sefton BM: Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. PNAS(USA) 77:1311-1315, 1980.
- Hunter T, Vande-Woude GF, Sherr CJ, Verma IM: Abstracts of papers presented at the Tenth Annual Meeting on Oncogenes. June 21-25, 1994, Hood College, Frederick, Md. USA. Foundation for Advanced Cancer Studies, Inc., 1994.
- Isom H, Kitchingman G, Roy-Burman P: The role of chromosome rearrangements, deletions, and point mutations in cancer. A pathology B study section workshop. Cancer Res 51:5440-5444, 1991.
- Jacks T, Fazeli A, Schmitt E, Bronson R, Goodell M, Weinberg R: Effects of an Rb mutation in the mouse. Nature 359:295-300, 1992.
- Jenkins JR, Rudge K, Currie GA: Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. Nature 312:651-654, 1984.
- Kasid A, Lipman ME, Papageorge AG, Lowy DR, Gelmann EP: Transfection of $v\text{-ras}^{\text{H}}$ DNA into MCF-7 human breast cancer cells bypasses dependence on estrogen for tumorigenicity. Science 228:725-728, 1985.
- Kataoka T, Powers S, McGill C, Fasano O, Strathern J: Genetic analysis of yeast *Saccharomyces cerevisiae* RAS1 and RAS2 genes. Cell 37:437-446, 1984.
- Klein G: Genes that can antagonize tumor development. The FASEBJ 7:821-825, 1993a.
- Klein G: Mecanismos de activación de oncogenes. Triángulo. Biología del Cáncer. 31:9-16, 1993b.
- Knudson AG Jr: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. PNAS(USA) 68:820-823, 1971.

- Knudson AG: Antioncogenes and human cancer. PNAS(USA) 90:10914-10921, 1993.
- Koeffler HP, Miller C, Nicolson MA, Ranyard J, Bosselman RA: Increased expression of p53 protein in human leukemia cells. PNAS(USA) 83:4035-4039, 1986.
- Koi M, Johnson LA, Kalikin LM, Little PFR, Nakamura Y, Feinberg AP: Tumor cell growth arrest caused by subchromosomal transferable DNA fragments from chromosome 11. Science 260: 361-364, 1993.
- Krontiris TG, Cooper GM: Transforming activity of human tumor DNAs. PNAS(USA) 78:1181-1184, 1981.
- Laderoute MP: A new perspective on the nature of the cancer problem: anti-cellular senescence. Mol Carcinog 10:125-133, 1994.
- Lange-Carter CA, Pleiman CM, Gardner AM, Blumer KJ, Johnson GL: A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf. Science 260:315-319, 1993.
- Lewin B: Gene Expression. Vol. 2, Eukaryotic Chromosomes. Wiley and Sons, New York. pp 144-145, 1980
- Li FP, Fraumeni JFJr: Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasias: a familial syndrome? Ann Intern Med 71:747-752, 1969.
- Lock RB, Ross WE: Possible role for p34^{cdc2} kinase in etoposide-induced cell death of Chinese hamster ovary cells. Cancer Res 50:3767-3771, 1990.
- Lock RB, Galperina OV, Feldhoff RC, Rhodes LJ: Concentration-dependent differences in the mechanisms by which caffeine potentiates etoposide cytotoxicity in HeLa cells. Cancer Res 54:4933-4939, 1994.

- Looijenga LHJ, Abraham M, Gillis AJM, Saunders GF, Oosterhuis JW: Testicular germ cell tumors of adults show deletions of chromosomal bands 11p13 and 11p15.5, but not abnormalities within the Zinc-finger regions and exons 2 and 6 of the Wilm's tumor 1 gene. *Genes Chromosomes & Cancer* 9:153-160, 1994.
- Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, Li W, Margolis B, Lammers R, Ullrich A, Schlessinger J: The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 70:431-442, 1992.
- Lowy DR, Willumsen BM: Function and Regulation of Ras. *Annu Rev Biochem* 62:851-891, 1993.
- Malsin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, Friend SH: Germline p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250:1233-1238, 1990.
- Maness PF, Matten WT: Tyrosine phosphorylation of membrane associated tubulin in nerve growth cones enriched in pp60^{c-src}. In Bock T, Marsh Eds. *Proto-oncogenes in cell development*. Ciba Foundation Symposium 150. Wiley y Sons. Chichester, 1990, pp 57-78.
- Manne V, Bekesi E, Kung HF: Ha-Ras proteins exhibit GTPase activity: point mutations that activate Ha-*ras* gene products result in decreased GTPase activity. *PNAS(USA)* 82:376-380, 1985.
- Marshall CJ: Tumor suppressor genes. *Cell* 64:313-326, 1991.
- Marshall CJ: Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80:179-185, 1995.

- Matlashewski G, Schneider J, Banks L, Jones N, Murray A, Crawford L: Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated *ras* in transforming primary cells. *EMBOJ* 6:1741-1746, 1987.
- McCormick F: *ras* GTPase activating protein: signal transmitter and signal terminator. *Cell* 56:5-8, 1989.
- McGrath JP, Capon DJ, Goeddel DV, Levinson AD: Comparative biochemical properties of normal and activated human Ras protein. *Nature* 310:644-649, 1984.
- Milburn MV, Tong L, deVos AM, Brünger A, Yamaizumi Z, Nishimura S, Kim SH: Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic *ras* proteins. *Science* 247:939-945, 1990.
- Miller AD: Progress toward human gene therapy. *Blood* 76:271-278, 1990.
- Mitchell CD: Tumor suppressor genes. *Cancer Topics* 8:52-54, 1991.
- Miwa T, Sudo K, Nakamura Y, Imai T: Fifty sequenced-tagged sites on human chromosome 11. *Genomics* 17:211-214, 1993.
- Miyagi M, Inazawa J, Takita K, Nakamura Y: Cloning and characterization of an interstitial deletion at chromosome 11p15 in a sporadic breast cancer. *Human Molecular Genetics* 1:705-708, 1992.
- Moodie SA, Willumsen BM, Weber MJ, Wolfman A: Complexes of Ras-GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science* 260:1658-1661, 1993.
- Moodie SA, Wolfman A: The 3Rs of life: Ras, Raf and growth regulation. *TIG* 10:44-48, 1994.

- Møzer B, Marlor R, Parkhurst S, Corces V: Characterization and developmental expression of a *Drosophila melanogaster ras* oncogene. *Mol Cell Biol* 5:885-889, 1985.
- Mulcahy LS, Smith MR, Stacey DW: Requirement for *ras* proto-oncogene function during serum stimulated growth of NIH 3T3 cells. *Nature* 313:241-243, 1985.
- Müller R, Mumberg D, Lucibello FC: Signals and genes in the control of cell-cycle progression. *Biochim Biophys Acta* 1155:151-179, 1993.
- Murphree AL, Benedict WF: Retinoblastoma: Clues to human oncogenesis. *Science* 223:1028-1033, 1984.
- Muschel RJ, Khoury G, Lebowitz P, Koller R, Dhar R: The human c-ras^H oncogene: a mutation in normal and neoplastic tissue from the same patient. *Science* 219:853-856, 1983.
- Muschel R: Oncogenes, tumor formation, and tumor progression. *Advances in Oncology* 6:3-6, 1990.
- Nadin-Davis SA, Nasim A, Beach D: Involvement of *ras* in sexual differentiation but not in growth control in fission yeast. *EMBOJ* 5:2963-2971, 1986a.
- Nadin-Davis SA, Yang RCA, Narang SA, Nasim A: The cloning and characterization of a *ras* gene from *Schizosaccharomyces pombe*. *J Mol Evol* 23:41-52, 1986b.
- Neuman-Silberberg FS, Schejter E, Hoffmann FM, Shilo BZ: The *Drosophila melanogaster ras* oncogene: structure and nucleotide sequence. *Cell* 37:1027-1034, 1984.
- Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, Glover T, Collins FS, Weston A, Modali R, Harris CC, Vogelstein B: Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature* 342:705-708, 1989.

- Noda M, Ko M, Ogura A, Liu DG, Amano T: Sarcoma viruses carrying *ras* oncogenes induce differentiation-associated properties in a neuronal cell line. *Nature* 318:73-75, 1985.
- Noda M, Kitayama H, Sugimoto Y, Okayama H, Bassin RH, Ikawa Y: Detection of genes with a potential for suppressing the transformed phenotype associated with activated *ras* genes. *PNAS(USA)* 86:162-166, 1989.
- Noda M: Mechanisms of reversion. *FASEBJ* 7:834-846, 1993.
- Nowell PC, Hungerford DA: A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science* 132:1497, 1960.
- O'Brien SJ, Nash WG, Goodwin JL, Lowy DR, Chang EH: Dispersion of the *ras* family of transforming genes to four different chromosomes in man. *Nature* 302:839-842, 1983.
- O'Brien W, Stenman G, Sager R: Suppression of tumor growth by senescence in virally transformed human fibroblasts. *PNAS(USA)* 83:8659-8663, 1986.
- Oshimura M, Kugoh H, Koi M, Shimizu M, Yamada H, Satoh H, Barret JC: Transfer of a normal human chromosome 11 suppress tumorigenicity of some but not all tumor cell lines. *J Cell Biochem* 42:135-142, 1990.
- Parada LF, Land H, Weinberg RA, Wolf D, Rotter V: Cooperation between gene encoding p53 tumor antigen and *ras* in cellular transformation. *Nature* 312:649-651, 1984.
- Parsons JT: Closing the GAP in a signal transduction pathway. *TIG* 6:169-171, 1990.
- Paterson H, Reeves B, Brown R, Hall A, Furth M, Bos J, Jones P, Marshall C: Activated N-*ras* controls the transformed phenotype of HT1080 human fibrosarcoma cells. *Cell* 51:803-812, 1987.

- Pawson T, Ainiel T, Hinze E, Auersperg N, Neave N, Sobolewski A, Weeks G: regulation of a Ras-related protein during development of *Dictyostelium discoideum*. Mol Cell Biol 5:33-39, 1985.
- Perry P, Wolf S: Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. Nature 251:156-8, 1974.
- Perucho M, Goldfarb M, Shimizu K, Lama C, Fogh J, Wigler M: Human tumor-derived cell lines contain common and different transforming genes. Cell 27:467-476, 1981.
- Ponder BAJ: Inherited predisposition to cancer. TIG 6:213-218, 1990.
- Powers S, Kataoka T, Fasano O, Goldfarb M, Strathern J, Broach J, Wigler M: Genes in *Saccharomyces cerevisiae* encoding proteins with domains homologous to the mammalian Ras proteins. Cell 36:607-612, 1984.
- Prendergast GC, Gibbs JB: Pathways of Ras function: Connections to the actin cytoskeleton. Adv Cancer Res 62:19-64, 1993.
- Pulciani S, Santos E, Lauver AV, Long LK, Robbins KC, Barbacid M: Oncogenes in human tumor cell lines: Molecular cloning of a transforming gene from human bladder carcinoma cells. PNAS(USA) 79:2845-2849, 1982.
- Quintanilla M, Brown K, Ramsden M, Balmain A: Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. Nature 322:78-80, 1986.
- Radich JP, Kopecky KJ, Willman CL, Weick J, Head D, Appelbaum F, Collins SJ: N-ras mutations in adult de novo acute myelogenous leukemia: prevalence and clinical significance. Blood 76:801-807, 1990.

- Reddy EP, Reynolds RK, Santos E, Barbacid M: A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 300:149-152, 1982.
- Raymond CD, Gomer RH, Mehdy MC, Firtel RA: Developmental regulation of a *Dictyostelium* gene encoding a protein homologous to mammalian Ras protein. *Cell* 39:141-148, 1984.
- Raymond CD, Nellen W, Firtel RA: Regulated expression of *ras* gene constructs in *Dictyostelium* transformants. *PNAS(USA)* 82:7005-7009, 1985.
- Rodenhuis S, Slebos RJC: Clinical significance of *ras* oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Res (suppl)* 52:2665-2669, 1992.
- Rodilla V: Origin and evolution of binucleated cells and binucleated cells with micronuclei in cisplatin-treated CHO cultures. *Mutat Res* 300:281-291, 1993.
- Sager R: Tumor suppressor genes: The puzzle and the promise. *Science* 246:1406-1412, 1989.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York, pp 7.6-7.52, 1989.
- Saxon PJ, Srivatsan ES, Stanbridge EJ: Introduction of human chromosome 11 via microcell transfer controls human tumorigenic expression of HeLa cells. *EMBOJ* 5:3461-3466, 1986.
- Scolnick EM, Papageorge AG, Shih TY: Guanine nucleotide-binding activity as an assay for the Src protein of rat derived murine sarcoma viruses. *PNAS(USA)* 76:5355-5359, 1979.
- Serrano M, Gómez-Lahoz E, DePinho RA, Beach D, Bar-Sagi D: Inhibition of Ras-induced proliferation and cellular transformation by p16^{INK4}. *Science* 267:249-252, 1995.

- Shimizu K, Birnbaum D, Ruley M, Fasano O, Suard Y, Edlund L, Taparowsky E, Goldfarb M, Wigler M: Structure of the *Ki-ras* gene of the human lung carcinoma cell line Calu-1. *Nature* 304:497-500, 1983.
- Shih TY, Papageorge AG, Stokes PE, Weeks MO, Scolnick EM: Guanine nucleotide-binding and autophosphorylation activities associated with p21 Src protein of Harvey murine sarcoma virus. *Nature* 287:686-691, 1980.
- Shih C, Padhy LC, Murray M, Weinberg RA: Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 290:261-264, 1981.
- Shih C, Weinberg RA: Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. *Cell* 29:161-169, 1982.
- Sikora K: Los genes, los sueños y el cáncer. *BMJ* 2:221-225, 1994.
- Spandidos A, Wilkie NM: The normal human *H-ras1* gene can act as an onco-suppressor. *Br J Cancer* 58:67-71, 1988.
- Sparkes ES: Cancer and the human chromosome. *Cancer Cells* 1(4), 1989.
- Sparkes ES: Cancer and the human chromosome. *Cancer Cells* 2(2), 1990.
- Spector DH, Varmus HE, Bishop JM: Nucleotide sequences related to the transforming gene of avian sarcoma virus are present in DNA of uninfected vertebrates. *PNAS(USA)* 75:4102-4106, 1978.
- Srivatsan ES, Benedict WF, Stanbridge EJ: Implication of chromosome 11 in the suppression of neoplastic expression in human cell hybrids. *Cancer Res* 46:6174-6179, 1986.
- Stanbridge EJ: Suppression of malignancy in human cells. *Nature* 260:17-20, 1976.

- Stanbridge EJ, Flandermeyer RR, Daniels DW, Nelson-Rees WA: Specific chromosome loss associated with the expression of tumorigenicity in human cell hybrids. *Somat Cell Mol Genet* 7:699-712, 1981.
- Stanbridge EJ, Der CJ, Doersen CJ, Nishimi RY, Peehl DM, Weissman BE, Wilkinson JE: Human cell hybrids: analysis of transformation and tumorigenicity. *Science* 215:252-259, 1982.
- Stanbridge EJ: Human tumor suppressor genes. *Annu Rev Genet* 24:615-657, 1990.
- Stehelin D, Guntaka RV, Varmus HE, Bishop JM: Purification of DNA complementary to nucleotide sequences required for neoplastic transformation of fibroblasts by avian sarcoma viruses. *J Mol Biol* 101:349-365, 1976a.
- Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, Vogt PK: DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260:170-173, 1976b.
- Strickland JJ, Greenhalgh DA, Kocova-Chyla A, Hennings H, Restrepo C, Balaschak M, Yuspa SH: Development of murine epidermal cell lines which contain an activated *ras*^{Hu} oncogene and form papillomas in skin grafts on athymic nude mouse hosts. *Cancer Res* 48:165-169, 1988.
- Swanson ME, Elste AM, Greenberg SM, Schwartz JH, Aldrich TH, Furth ME: Abundant expression of Ras proteins in *Aplysia* neurons. *J Cell Biol* 103:485-492, 1986.
- Sweet RW, Yokoyama S, Kamata T, Feramisco JR, Rosenberg M, Gross M: The product of *ras* is a GTPase and the T24 oncogenic mutant is deficient in this activity. *Nature* 311:273-275, 1984.

- Tabin CJ, Bradley SM, Bargmann CI, Weinberg RA, Papageorge AG, Scolnick EM, Dhar R, Lowry DR, Chang EJ: Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 300:143-149, 1982.
- Tamanoi F, Walsh M, Kataoka T, Wigler M: A product of yeast RAS2 gene is a guanine nucleotide binding protein. *PNAS(USA)* 81:6924-6928, 1984.
- Tanaka T, Slamon DJ, Battifora H, Cline MJ: Expression of p21ras oncoproteins in human cancers. *Cancer Res* 46:1465-1470, 1986.
- Taparowsky E, Suard Y, Fasano O, Shimizu K, Goldfarb M, Wigler M: Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change. *Nature* 300:762-765, 1982.
- Tatchell K, Chaleff DT, DeFeo-Jones D, Scolnick EM: Requirement of either of a pair of ras related genes of *Saccharomyces cerevisiae* for spore viability. *Nature* 309:523-527, 1984.
- Temeles GL, Gibbs JB, D'Alonzo JS, Sigal IS, Scolnick EM: Yeast and mammalian Ras proteins have conserved biochemical properties. *Nature* 313:700-703, 1985.
- Thiery R, Robbins S, Khosla M, Spiegelman GB, Weeks G: The effects of expression of an activated rasG mutation on the differentiation of *Dictyostelium*. *Biochem Cell Biol* 70:1193-1199, 1992.
- Thor A, Hand P, Wunderlich D, Caruso A, Muraro R, Schlom J: Monoclonal antibodies define differential ras gene expression in malignant and benign colonic diseases. *Nature* 311:562-564, 1984.
- Thor A, Ohuchi N, Horan-Hand P, Callahan R, Weeks MO, Theillet C, Lidereau R, Escot C, Page DL, Vilasi V, Schlom J: ras gene alterations and enhanced levels of ras p21 expression

in a spectrum of benign and malignant human mammary tissues. *Laboratory Investigation* 55:603-614, 1986.

- Toledo M: Detección de mutaciones puntuales en los genes *ras* y *p53*, en líneas celulares derivadas de cáncer humano. Tesis de Maestría. IIB, UACPP-CCH, UNAM. México, 1994.
- Tomei LD, Cope FO: Apoptosis: the molecular basis of cell death. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York., pp 1-47, 1991.
- Tounekti O, Pron G, Belehradek JJ, Mir LM: Bleomycin, an apoptosis-mimetic drug that induces two types of cell death depending on the number of molecules internalized. *Cancer Res* 53:5462-5469, 1993.
- Trahey M, Milley RJ, Cole GE, Innis M, Paterson H, Marshall CJ, Hall A, McCormick F: Biochemical and biological properties of the human N-*ras* p21 protein. *Mol Cell Biol* 7:541-544, 1987.
- Usui T, Yoshida M, Abe K, Osada H, Isono K, Beppu T: Uncoupled cell cycle without mitosis induced by a protein kinase inhibitor, K252a. *J Cell Biol* 115:1275-1282, 1992.
- Valera A, Perales JC, Hatzoglou M, Bosch F: Expression of the neomycin-resistance (*neo*) gene induces alterations in gene expression and metabolism. *Hum Gene Ther* 5:449-456, 1994.
- Vaux DL, Haecker G, Strasser A: An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 76:777-779, 1994.
- Velázquez O, Ramírez G, Rodríguez F, Tapia R: Información epidemiológica de mortalidad en México, 1990. *Boletín Mensual de Epidemiología, Sistema Nacional de Salud*. 7(12):217, 1992.

- Viola MV, Fromowitz F, Oravez S, Deb S, Finkel G, Lundy J, Hand P, Thor A, Schlom J: Expression of *ras* oncogene p21 in prostate cancer. *New England J of Medicine* 314:133-137, 1986.
- Warne PH, Rodriguez P, Downward J: Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 *in vitro*. *Nature* 364:352-355, 1993.
- Watanabe T, Sariban E, Mitchell T, Kufe D: Human *c-myc* and *N-ras* expression during induction of HL-60 cellular differentiation. *Biochem Biophys Res Com* 126:999-1005, 1985.
- Watson JD, Hopkins NH, Roberts JW, Steitz JA, Weiner AM: *Molecular Biology of the gene*. Fourth Edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Menlo Park, pp 962-968, 1987.
- Weeks G, Pawson T: The synthesis and degradation of *ras*-related gene products during growth and differentiation in *Dictyostelium discoideum*. *Differentiation* 33:207-213, 1987.
- Weinberg RA: Tumor suppressor genes. *Science* 254:1138-1146, 1991.
- Weinberg RA: Genes supresores tumorales y patogénesis del cáncer. *Triángulo. Biología del Cáncer*. 31:17-24, 1993.
- Weissman BE, Saxon PJ, Pasquale SR, Jones GR, Geiser AG: Introduction of a normal human chromosome 11 into a Wilms' tumor cell line controls its tumorigenic expression. *Science* 236:175-180, 1987.
- Williams GT: Programed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell* 65:1097-1098, 1991.
- Williams GT, Smith CA: Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell* 74:777-779, 1993.

- Willingham MC, Jay G, Pastan I: Localization of the ASV *src* gene product to the plasma membrane of transformed cells by electron microscopic immunocytochemistry. *Cell* 18:125-134, 1979.
- Willingham MC, Pastan Y, Shih TY, Scolnick EM: Localization of the *src* gene product of the Harvey strain of MSV to the plasma membrane of transformed cells by electron microscopic immunocytochemistry. *Cell* 19:1005-1014, 1980.
- Willumsen BM, Christensen A, Hubbert NL, Papageorge AG, Lowy DR: The p21 Ras c-terminus is required for transformation and membrane association. *Nature* 310:583-586, 1984.
- Wiman KG: The retinoblastoma gene: role in cell cycle control and cell differentiation. *FASEBJ* 7:841-845, 1993.
- Witkowski JA: The inherited character of cancer. An historical survey. *Cancer Cells* 2:229-227, 1990.
- Wolf B: Vehiculización de los principios citotóxicos a las células tumorales. *Triángulo. Biología del Cáncer*. 31:51-57, 1993.
- Yamada H, Omata-Yamada T, Lengyel P: Characterization of recessive (mediator⁻) revertants from NIH3T3 cells transformed with a c-H-*ras* oncogene. *J Biol Chem* 266:4002-4009, 1991.
- Yunis JJ, Ramsay N: Ratinoblastoma and subband deletion of chromosome 13. *Am J Dis Child* 132:161-163, 1978.
- Yunis JJ, Hoffman WR: Fragile sites as a mechanism in carcinogenesis. *The Cancer Bulletin* 41:283-291, 1989.

- Zhang X, Settleman J, Kyriakis JM, Takeuchi-Suzuki E, Elledge SJ, Marshall MS, Bruder JT, Rapp UR, Avruch J: Normal and oncogenic p21^{ras} proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature* 364:308-313, 1993.
- Zucker RM, Adams DJ, Bair KW, Elstein KH: Polyploidy induction as a consequence of topoisomerase inhibition. *Biochem Pharmacol* 42:2199-2208, 1991.

*"Como hombre de ciencia me dedico
a observar tu obra de Dios"*