

00346



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

10

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**"EFECTO DE LA TRANSFECCIÓN DEL GEN H-RAS
SOBRE EL CRECIMIENTO CON INDEPENDENCIA DE
ANCLAJE Y LA TUMORIGENICIDAD DE CÉLULAS HELA"**

287928

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGÍA CELULAR)**

P R E S E N T A

BIOL. DESIDERIO SALOMON HERNANDEZ GUTIERREZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALEJANDRO MANUEL GARCIA CARRANCA

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el **Departamento de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM** bajo la dirección del Dr. Alejandro García Carrancá y con el apoyo del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** a través del programa de becas de postgrado.

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco al Dr. Alejandro García Carrancá la oportunidad de ser su estudiante y de trabajar en su laboratorio.

A los doctores Enrique Miranda y Andrés Gutiérrez que formaron parte del comité tutorial por su apoyo, críticas y aportaciones siempre bien acertadas

Al Dr. Emilio Rojas del Castillo por su abierto y total apoyo desinteresado.

A mis compañeros de Laboratorio por su apoyo incondicional (Miriam, Lupita, Laura, Ana Laura, Emilio, Cecilia, Jorge, Benito Manuel y especialmente a Carla).

Agradezco infinitamente a mis padres y mis hermanos por su comprensión y apoyo.

"EFECTO DE LA TRANSFECCION DEL GEN H-RAS SOBRE EL CRECIMIENTO CON INDEPENDENCIA DE ANCLAJE Y LA TUMORIGENICIDAD DE CÉLULAS HELA"

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION:	
Los genes <i>ras</i>	2
Algunas vias activadas por <i>ras</i>	5
Ras causa transformación.....	9
La capacidad de transformación de los genes <i>ras</i> es tejido especifica.....	10
Oncogenes en la proliferación con independencia de anclaje y la tumorigenicidad:	
El caso Ras.....	11
Como llevar a cabo la supresión de la tumorigenicidad.....	15
¿Podría <i>ras</i> funcionar como supresor?.....	19
JUSTIFICACION.....	21
OBJETIVO.....	22
MATERIALES Y METODOS.....	22
RESULTADOS.....	24
DISCUSION.....	34
CONCLUSION.....	41
BIBLIOGRAFIA.....	42

RESUMEN

"EFECTO DE LA TRANSFECCION DEL GEN H-RAS SOBRE EL CRECIMIENTO CON INDEPENDENCIA DE ANCLAJE Y LA TUMORIGENICIDAD DE CÉLULAS HELA"

El cáncer a nivel mundial es considerado como un problema de salud pública y una de las principales causas de muerte, en nuestro país ocupa el segundo lugar de fallecimientos por enfermedad.

Dos características importantes del cáncer son su marcada desregulación del ciclo celular y su proliferación constante, que da como resultado el crecimiento de tumores. El cáncer es causado en gran medida por el funcionamiento inadecuado de algunos genes debido a mutaciones de algunos de ellos, principalmente proto-oncogenes y los genes supresores de tumores. La importancia de estos genes radica en el hecho que es suficiente una mutación puntual para que se conviertan en oncogenes y participen activamente en un proceso carcinogénico.

En el 30% de todos los cánceres se han encontrado mutaciones en los genes de la familia *ras*. Estos genes codifican para proteínas conocidas como GTPasas las cuales se encuentran ancladas en la membrana interna de las células desde donde transmiten señales de crecimiento, proliferación y diferenciación cuando son activadas por la unión específica a un factor de crecimiento. Esta señal desencadena una cascada que después de ser transmitida por varias proteínas llega al núcleo para activar factores de transcripción que ponen en marcha la activación de otros genes.

Existen diferentes estrategias para hacerle frente al problema del cáncer, a través de métodos físicos, químicos, biológicos y genéticos. De estos últimos se sabe que transfiriendo cromosomas completos a células tumorales, partes de cromosomas o algunos genes se pueden generar células incapaces de formar tumores, cuando esto se logra se dice que se ha dado una "supresión de la tumorigenicidad" que podría ser llevado a la práctica en algún tratamiento contra el cáncer.

Una de las características de las células tumorales que se cultivan *in vitro* que mejor correlaciona con otra muy importante como lo es el crecimiento de tumores en animales experimentales es el crecimiento con independencia de anclaje. En este trabajo de tesis hemos evaluado ambas características en células tumorales HeLa (células procedentes de un carcinoma cervico-uterino). Para ello partimos de la premisa de que el gen *h-ras* puede participar activamente en la supresión de tumores y que puede tener efectos sobre estos dos parámetros.

Para lograr nuestros objetivos, trabajamos con cuatro clonas de células HeLa, células HeLa transfectadas con un plasmido que contiene el gen de resistencia a la neomicina, otra clona que contiene además del gen de resistencia a la neomicina el gen *h-ras* silvestre, una clona más que contiene el gen de resistencia a la neomicina y el gen *h-ras* mutado y células HeLa sin transfectar. De las cuatro clonas celulares la clona transfectada con *h-ras* silvestre mostró una disminución en el crecimiento con independencia de anclaje y una supresión parcial del crecimiento tumoral en ratones atímicos en comparación con las otras tres. Se sacrificaron los ratones y de los tumores generado se restablecieron cultivos, se analizó y comparó morfología y ciclo celular de todas las células antes y después de haber pasado por los ratones.

La conclusión a la que llegamos es que la sobreexpresión del gen *h-ras* silvestre suprime parcialmente el crecimiento con independencia de anclaje y la tumorigenicidad en células HeLa.

LOS GENES RAS

Los genes *ras* forman parte de una familia altamente conservada en eucariontes, desde levaduras hasta el hombre (Barbicid, 1987). En los mamíferos la familia *ras* esta constituida por tres proto-oncogenes, *H-ras*, *K-ras* y *N-ras* (Der, et al., 1982) cada uno de los cuales puede adquirir propiedades oncogénicas, con tan solo tener una mutación puntual, comúnmente esta se produce en el codon 12 o en el codon 61.(Shimizu, et al., 1983). Las formas mutadas son prevalentes en muchos tumores tanto humanos como de roedores, también han sido implicados en la transformación in vitro, así como en la generación de tumores (Slomon, et al.,1982).

H y *K-ras* originalmente fueron aislados de sarcomas murinos de Harvey y Kirsten respectivamente (DeFeo, et al., 1981; Chang, et al.,1982). *N-ras* primero fue identificado en una línea celular humana de neuroblastoma (Shimizu, et al., 1983) y subsecuentemente en otras líneas celulares de diversos tumores humanos (Hall, et al., 1994; Brown, et al. 1984).

Hoy en día todavía no hay evidencias biológicas o bioquímicas claras, que hayan demostrado diferencias entre las tres isoformas, por el contrario estas proteínas comparten muchas propiedades estructurales, bioquímicas y funcionales muy similares (Barbicid, 1987).

Los primeros 85 aminoácidos de la secuencia de los tres genes *ras* son idénticos y los siguientes 80 exhiben una homología del 85%, el resto de la secuencia C-terminal (el dominio hipervariable) es altamente divergente, así como también lo son los últimos cuatro aminoácidos (la secuencia CAAX) la cual es requerida para la modificación post-traducciona (Grand and Owen,1991).

Los genes *ras* codifican para proteínas homologas de 21-kD, después de haber pasado por una compleja reacción post-traducciona se unen internamente a la membrana celular (Grand and Owen, 1991), desde aquí funcionan como transductores de señales de crecimiento y diferenciación celular acoplándose a otras proteínas através de una cascada de fosforilación que involucra una red compleja con capacidad para unir nucleótidos de guanina e hidrolizar GTP (Eccelston, et al. 1993). Estas proteínas pueden encontrarse en dos estados gracias a su actividad intrínseca de GTPasa, estar activas cuando se

encuentran unidas a GTP e inactivas cuando quedan unidas a GDP una vez que se lleva a cabo la hidrólisis del GTP (Bogusky and McCormick, 1993; Zarbl, et al.1985)

Mutaciones en el gen *ras* (normalmente en el codón 12) producen una proteína que se encuentra en un estado constitutivamente unido a GTP. Esta forma alterada se encuentra en el 40% de los cánceres humanos (Bos, 1989),

La mutación de glicina a valina en el codon 12 de los genes *ras*. resulta en un decremento de la actividad intrínseca de GTPasa para hidrolizar a GTP, manteniendo la forma activa. Así éstas son consideradas como productos de mutantes dominantes positivas que aseguran el mantenimiento de la forma activa y se presume que interactúan continuamente con sus moléculas efectoras . También existen mutantes dominantes negativas que resultan de una conformación en la cual el GDP es bastante más favorecido que al GTP manteniéndose así la forma inactiva de Ras provocando al mismo tiempo una reducción en la activación del GDP-Ras silvestre para enviar señal (Lim, et al., 1996). Similares mutaciones se pueden encontrar en otros miembros de la subfamilia de Ras como: Rho, Rac y Cdc42. Ambos tipos de mutaciones han sido muy socorridas para el estudio de la superfamilia de los genes *ras* en diversos procesos que caracterizan a una célula transformada (Lim, et al., 1996).

Aunque los genes *ras* parecen expresarse ubicuamente en las células humanas hay evidencias que indican que las proteínas p21 N, H, y K Ras, pueden mediar diferentes funciones celulares (Leon, et al.,1987; Fiorucci y Hall, 1988) ya que entre tejidos hay variación significativa en los niveles relativos de expresión de los tres genes durante el desarrollo (Leon, et al., 1987) y la diferenciación (Delgado et al., 1992). En muchos cánceres humanos de diferentes orígenes celulares se ve que hay un favorecimiento por mutar alguno de los tres genes, por ejemplo en leucemia aguda mieloide más del 70% de las mutaciones detectadas involucran a *N-ras* (Toksoz, et al., 1989; Bos, 1989), *H-ras* parece estar mas involucrado en carcinoma de vejiga (Sandberg y Berger, 1994) mientras que *K-ras* en adenocarcinomas pancreáticos (Bos, 1989) además las tres proteínas muestran diferencias en sus modificaciones post-traduccionales (Grand y Owen 1991). Con estos descubrimientos cabe la posibilidad de que las tres tengan distintas funciones

Como ya se ha dicho las proteínas *ras* son modificados a nivel postraducciona l y estas modificaciones son esenciales para su localización en la membrana y poner en marcha su actividad biológica (Willumsen et al, 1984). Las modificaciones postraduccionales de estas proteínas involucran el corte de tres aminoácidos de la parte carboxilo terminal, farnesilación de la cisteína en la nueva terminación carboxilo, palmitolación de otra cisteína localizada cerca del segmento carboxilo terminal y fosforilación (Hancock et al., 1989)

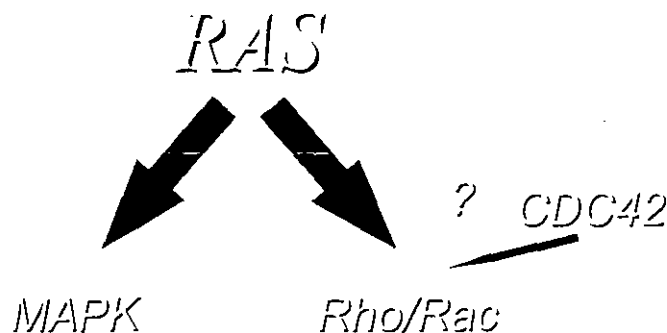
Aunque la localización de H-Ras en la membrana es fundamental se ha visto que hay diferencias a nivel postraducciona l entre las proteínas normal y mutada ya que esta última es más eficientemente modificada y se transporta más rápidamente a la membrana que la normal, lo cual podría corresponder directamente al aumento de la actividad biológica de Ras mutada (Yamada, et al., 1996).

ALGUNAS VIAS ACTIVADAS POR RAS

Las proteínas codificadas por los genes *ras* forman una superfamilia que incluyen a más de 50 miembros (Bokoch y Der, 1993; Barbicid, 1987). Con base en las secuencias nucleotídicas, la superfamilia ha sido subdividida en tres grandes grupos cuyos miembros tienen características funcionales semejantes: 1) La familia Ras que incluye a las verdaderas proteína Ras, participan en la transducción de señales 2) La familia Rho/Rac/Cdc42 involucradas en la organización del citoesqueleto y 3) Las proteínas Rab, proteínas que regulan el tráfico membranal, es decir el transporte de vesículas entre diferentes compartimentos intracelulares (Bogusky y McCormick, 1993).

Desde la membrana interna de la célula las proteínas Ras pueden activar varias vías y tener un efecto pleiotrópico en la respuesta celular, sin embargo dos de ellas son las más estudiadas y más importantes la de las MAPK cinasas a través de Raf que tiene que ver con la activación de factores de transcripción y la vía de las proteínas Rho que tienen que ver con la remodelación del citoesqueleto.

2 vías activadas por Ras



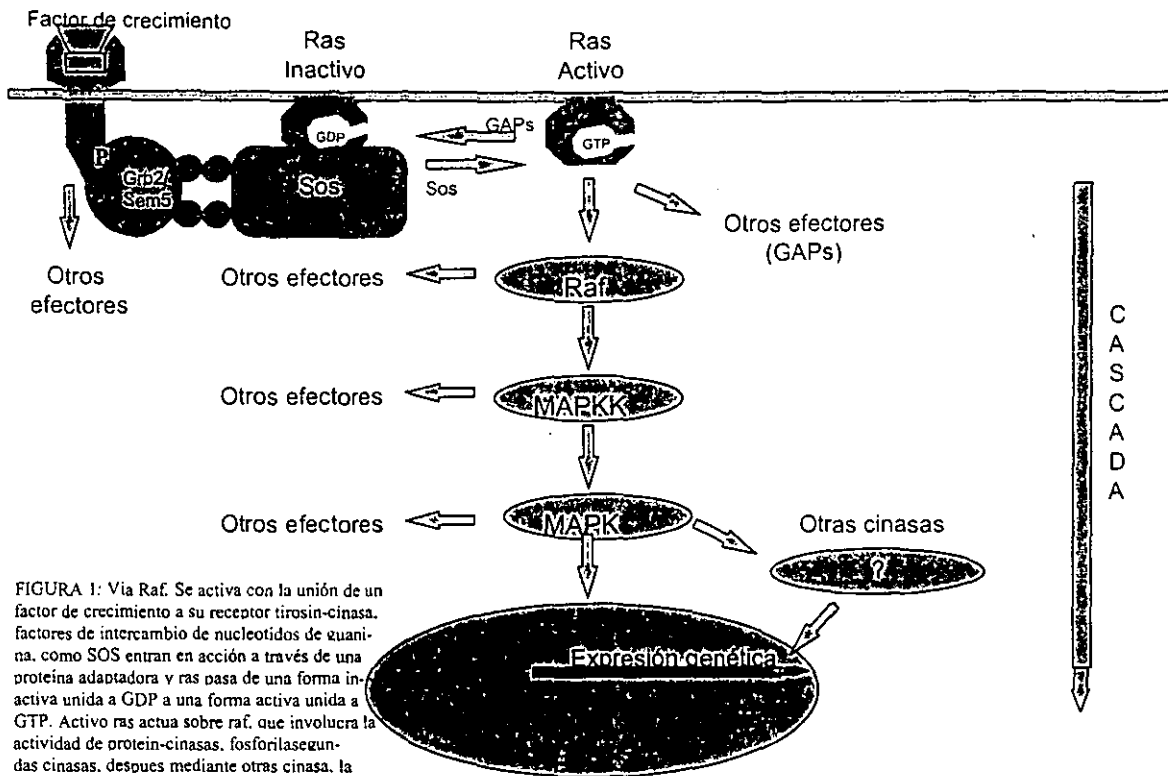


FIGURA 1: Via Raf. Se activa con la unión de un factor de crecimiento a su receptor tirosin-cinasa. factores de intercambio de nucleótidos de guanina, como SOS entran en acción a través de una proteína adaptadora y ras pasa de una forma inactiva unida a GDP a una forma activa unida a GTP. Activo ras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

La familia de las GTPasas de Rho incluye varias isoformas: Rac, Rho y Cdc42, las cuales también son miembros de la superfamilia de Ras (Barbicid, 1987). Las proteínas de la familia de Rho juegan un papel importante en la transducción de señales que intervienen en organización de los filamentos de actina en el citoesqueleto y adhesión celular. En fibroblastos Rho regula la adhesión focal y las fibras de estrés, Rac regula la formación de lamelopodios (Ridley y Hall, 1992; Ridley, et al., 1992) y Cdc42 regula la formación de filopodios (Kozma, et al., 1995). Rac y Cdc42 también regulan la formación de complejos focales (Nobes y Hall, 1995)

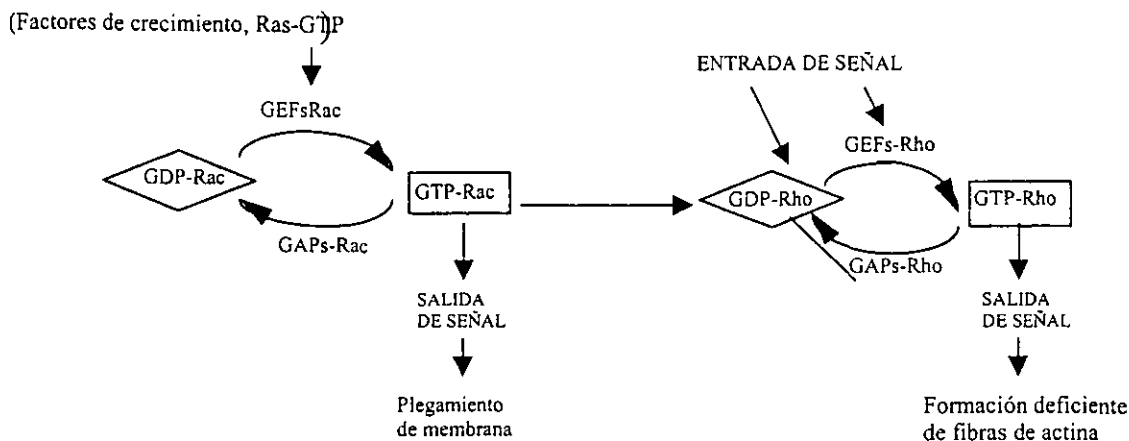


FIGURA 2: VIA Rho-Rac Se refiere al control de la organización del citoesqueleto. Ras activo, actúa sobre factores intercambiadores de nucleótidos activando a Rac al unirlo a GTP, Rac activo puede actuar sobre factores de intercambio de nucleótidos de Rho para unirlo a GTP y activarlo

La microinyección de fibroblastos 3T3 con Cdc42, puede activar Rac y promover la formación de lamelopodios a manera dependiente de Rac, además Rac puede inducir la formación de fibras de estrés de manera Rho dependiente. Estas observaciones indican que Rac puede activar a Rho y sugiere la existencia de una cascada Cdc42-Rac-Rho (Chant y Stowers, 1995). En otro estudio sin embargo, Cdc42 mostró inhibir las fibras de estrés Kozma, et al., 1995. Además la relación precisa entre Cdc42 y Rho aun falta ser establecida.

Se ha demostrado que la expresión de formas activadas de Rac y Rho pueden transformar fibroblastos (Perona, et al., 1993; Qiu, et al., 1995) y versiones dominantes negativos de ambas inhiben la transformación oncogénica por Ras (Prendergast et al., 1995; Qiu, et al., 1995) este hecho indica que Rac y Rho son esenciales para la transformación por Ras y por lo tanto se encuentran abajo de Ras en la cascada de señalización en el control de la proliferación celular.

Fibroblastos de ratón que constitutivamente expresan la proteína Cdc42 mutada, revelan una fuerte inducción en la formación de filopodios y también despliegan un incremento en la formación de lamelopodios, sugiriendo un incremento en la actividad de Rac. En líneas que expresan independientemente Cdc42 o Rac mutadas se induce la

aparición de un número elevado de células multinucleadas. Esta generación de células multinucleadas causada por Cdc 42 es fuertemente inhibida por una mutante negativa N17-Rac1(Qiu, et al.,1995).

Qui et al. en 1997 demostraron que la transfección de varias líneas celulares con *cdc 42* mutado presentan un crecimiento significativo en agar suave. Todas las líneas que expresan Cdc 42 mutada muestran tumorigenicidad, mientras que las líneas control no causa tumores, estos datos nos indican que la expresión constitutiva de *cdc42* activo es suficiente para inducir estos cambios.

De manera independiente fibroblastos que coexpresan *V12-H-ras cdc42* o fibroblastos que expresan *ras* mutado y *rac1* activado, presentan crecimiento con independencia de anclaje, alta frecuencia de células multinucleadas y tumorigenicidad. Cuando se transfecta *N17-cdc42* a los fibroblastos que coexpresan las mutantes *V12-cdc42*, se logra suprimir la formación de focos al mismo tiempo que se inhibe el crecimiento con independencia de anclaje además se da una reversión de la morfología transformada, lo cual indica que Cdc42 es necesaria para la transformación por *ras*. Cuando se transfecta *N17-rac1* a fibroblastos de mutantes *V12/Rac1* se logra bloquear la aparición células multinucleadas pero no la independencia de anclaje ni el fenotipo transformado.

RAS CAUSA TRANSFORMACION

Se ha visto que las proteínas Ras en cualquiera de sus dos formas normal y principalmente la mutada puede causar transformación y participar activamente en la inestabilidad genómica (Gilbert y Harris, 1988), en el incremento de mitosis anormales (Hagag et al., 1990), y en rearrreglos cromosómicos (Stenman, et al 1987) etc.

La microinyección de pequeñas cantidades de la proteína Ras mutada, también llamada oncoproteína, puede inducir síntesis de DNA en células quiescentes, maduración de oocytos, diferenciación celular y transformación. Estos mismos efectos se pueden lograr con la proteína normal pero, se necesitan cantidades mucho más grandes (Lowy y Willumsen, 1993), por ejemplo en células de rata que expresaron niveles elevados de H-Ras silvestre Ricketts y Levinson en 1988 mostraron una morfología completamente transformada. Esto llama la atención si pensamos que el alelo silvestre no tendría porque causar los mismos efectos que el oncogen, pues este último presenta alteraciones únicas y no compartidas con el alelo silvestre, al analizar con detalle sus secuencias, que finalmente son estos cambios en la secuencia los que le dan su carácter oncogénico. De esta forma podemos hablar de genes que por su sobreexpresión tienen una ganancia de función. Transladando esto al modelo de transformación por *ras*, significa que hay más moléculas presentes en el citoplasma, que constantemente están pasando la señal y con ello están activando las diferentes vías.

LA CAPACIDAD DE TRANSFORMACION DE LOS ONCOGENES RAS ES TEJIDO ESPECIFICA

Se ha observado en ensayos diseñados para comparar y medir actividad biológica de los genes *ras* con la misma mutación (codon 12gly-asp), que *H-ras* presenta una mayor capacidad de transformación en fibroblastos con respecto a *N-ras* y *K-ras*.

La expresión de los tres genes *ras* oncogénicos también promueve el crecimiento con independencia de anclaje (capacidad para formar colonias en agar) en poblaciones celulares de las líneas RAT2 y NIH3T3 infectadas con retrovirus que portan este gen. En este mismo tipo de experimentos se encontró que la acción transformante de *H-ras* fue por lo menos cuatro veces más grande con respecto a *N-ras* y *K-ras* y el potencial para la formación de colonias en agar también fue significativamente mayor. Por otro lado en experimentos de delección se ha visto que la elevada actividad transformante de *H-ras* en fibroblastos depende de una única secuencia entre los aminoácidos 84 y 143, no se debe al dominio hipervariable C-AAX, como se pensaba, ni tampoco es el resultado de diferentes niveles de expresión (Maher, et al., 1995)

Las diferentes actividades relativas de los tres oncogenes en fibroblastos y células hematopoyéticas en ensayos de transformación indican que hay una diferencia tejido específica debida en parte al potencial biológico de cada uno de ellos. (Maher et al., 1995)

ONCOGENES EN LA PROLIFERACION CON INDEPENDENCIA DE ANCLAJE Y LA TUMORIGENICIDAD: EL CASO DE RAS

La proliferación celular con independencia de anclaje es una característica distintiva de células transformadas pero poco se sabe de los mecanismos por los cuales los oncogenes inducen este fenómeno (Feinleb y Krauss, 1996). Sin embargo es una característica de crecimiento *in vitro* muy socorrida para ser extrapolada y en principio explorar el potencial que puede tener una línea celular para generar tumores. Esta característica es un buen parámetro para hacer una primera evaluación del papel que pueden jugar los genes en la tumorigenicidad cuando son transfectados a líneas celulares tumorigénicas. Aunque suelen existir casos en los que no siempre se da esta correlación. Por ejemplo hay células que han sido transfectadas con genes supresores y continúan mostrando independencia de anclaje cuando se crecen en agar semi-sólido; pero dejan de ser tumorigénicas (Pershouse et al. 1993). Tal es el caso de células U251 procedentes de un glioblastoma que tienen alterado el gen *Rsu1* cuyo producto es un inhibidor de *ras*, cuando se transfiere el segmento del cromosoma 10 que contiene este gen se logra suprimir la tumorigenicidad pero no la propiedad de proliferar con independencia de anclaje (Tsuda et al., 1995). Esto quiere decir que esta propiedad *in vitro* no siempre correlaciona con su contraparte *in vivo*. No obstante, para el caso del gen *ras* esta correlación crecimiento con independencia de anclaje-tumorigenicidad suele darse. Por ejemplo Kang y Krauss han visto que fibroblastos de embrión de rata PKC-F4 que presentan dependencia de anclaje, cuando son transfectados con el gen *v-H-ras* exhiben dramáticas alteraciones morfológicas y forman colonias de gran tamaño en agar semisólido.

En el caso de *ras* es muy evidente su participación en el crecimiento con independencia de anclaje y la correlación con su propia capacidad para formar tumores. Se ha visto que fibroblastos transformados con *ras* proliferan en agar semisólido y son tumorigénicas, dejan de serlo cuando se fusionan con células normales (Griegel et al., 1987). Otros trabajos, también han tenido los mismos hallazgos. Células no tumorigénicas de rata,

208 F co-transfectadas con el oncogen *H-ras* y con el gen de resistencia a la neomicina como marcador de selección, presentan un patrón transformado y forma grandes colonias en agar semisolido al mismo tiempo que generan tumores en ratones (Schafer et al., 1991). El oncogen *H-ras* producen crecimiento con independencia de anclaje y proporciona ventajas de proliferación y crecimiento tumoral, propiedades que son revertidas cuando se elimina la actividad del oncogen.

La expresión de un gen *ras* activado en líneas celulares procedentes de fibroblastos murinos induce una serie de respuestas pleiotropicas que incluyen alteraciones morfológicas, pérdida de inhibición por contacto, cambios en expresión de genes, decremento en dependencia de suero ó factores de crecimiento y capacidad para proliferar en ausencia de adhesión a un sustrato (crecimiento con independencia de anclaje) (Qiu et al., 1995; Hofer et al., 1994). Esta última propiedad *in vitro* que tiene que ver con el crecimiento con independencia de anclaje, es la que mejor correlaciona con la tumorigenicidad y es una herramienta que pone punto final al análisis *in vitro* para caracterizar las propiedades agresivas del crecimiento de células transformadas (Feinleib y Krauss, 1996). Es probable, además, que los mecanismos que median esta facultad estén relacionados a los mecanismos básicos que involucra las propiedades agresivas de las células (Colburn et al., 1978)

El gen *ras* participa activamente y en gran medida determina la independencia de anclaje de diferentes líneas celulares, es así que, el crecimiento y la formación de colonias en agar semisolido la línea celular HT1080 procedente de un fibrosarcoma dependen de la proteína N-Ras mutada (Tolsma et al., 1993)

En dos líneas celulares derivadas de las células HT1080, cuya característica es tener un alelo normal y uno mutado del gen *N-ras*, se analizó su capacidad para crecer en agar semisólido. Las células HT1080 6TG, crecen formando grandes colonias en este medio, mientras que la línea MCH603c8 que carece del alelo *N-ras* mutado, no forma colonias bajo las mismas condiciones, lo cual indica que este oncogen controla la capacidad de independencia de anclaje en agar. Sin embargo, el oncogen *N-ras* no parece controlar la capacidad para formar tumores en ratones desnudos, aunque crecen de manera

mucha más lenta y eventualmente alcanzan el tamaño de aquellos generados con las células HT1080 6TG. Haciendo estudios más detallados de la línea celular que carece del alelo mutado, al secunciar los codones 12, 13, 59 y 61 de los genes *ras* H, N y K de los tumores generados con las células MCH603c8 mostraron solo la presencia de los alelos silvestres, lo que indica que su capacidad para formar tumores no puede ser explicada por una mutación de novo en algunos de los genes de *ras*. También se observó que células transfectadas con *N-ras* mutado presentan un crecimiento tumoral más agresivo que las de sus líneas control HT10806 TG (Plattner et al., 1996).

En cuanto a la participación de los otros genes *ras* en procesos tumorigénicos, hay datos controvertidos. Para el caso del gen *K-ras* en la formación de tumores, Shirasawa et al. (1993) han reportado que la disrupción del alelo mutado de líneas celulares de colon trae como consecuencia la pérdida de capacidad para formar tumores, es decir, se elimina la actividad del oncogen en las células y al inyectarlas en ratones no forman tumores. Por el contrario, Plattner et al (1996) trabajando con dos líneas celulares parecidas a las reportadas por Shirasawa con el mismo oncogen alterado, vieron la formación de tumores más pequeños aun alterando y anulando por completo el funcionamiento de *K-ras*, el análisis de los tumores generados previamente con el inoculo celular no mostró mutaciones en ninguno de los tres alelos de *ras*.

Por lo dicho anteriormente *ras* juega un papel muy importante en este fenómeno, pero podrían existir mas factores asociados a él, por ejemplo las ciclinas que intervienen en diferentes etapas del ciclo celular también juegan un papel importante en la proliferación con independencia de anclaje, caso concreto es el de la ciclina A. La expresión ectópica de ciclina A en células NRK (fibroblastos) induce independencia de anclaje cuando las células se cultivan en presencia de suero y factor de crecimiento epidermal (Guadano et al., 1993), sin embargo, esto no significa que las células puedan crecer independientes a factores de crecimiento y funcionalmente se comporten como células transformadas. La capacidad que puede tener *ras* para dirigir la expresión de ciclina A en ausencia de sustrato puede ser crítica para inducir el crecimiento con independencia de anclaje (Kang y Krauss, 1996). Las vías de señalización utilizadas por *ras* par inducir la expresión de ciclina A y

provocar la proliferación independiente de anclaje son desconocidas (Kang y Krauss, 1996)

Los mecanismos específicos por los cuales Ras efectúa estos cambios celulares no son completamente entendidos, pero se cree que por lo menos algunos de estos cambios ocurren como resultado de alteraciones estables en la expresión de genes (Borthers et al., 1993). Así que la identificación de genes cuya expresión desregulada causa el fenotipo transformado es esencial para elucidar molecularmente las propiedades agresivas del crecimiento de tumores.

COMO LLEVAR A CABO LA SUPRESION DE TUMORIGENICIDAD

La supresión del crecimiento tumoral se puede llevar a cabo por diferentes métodos que incluye los genéticos, biológicos y farmacológicos. A continuación se muestran algunos ejemplos de cada uno de ellos.

SUPRESION GENETICA

- * Fusión con células normales
 - * Transferencia de DNA genómico de células normales
 - * cDNA de células normales
 - * Transferencia de genes normales
 - * Mutagénesis dirigida
- * Polímeros sintéticos
- * Mutagénos
 - * RNA antisentido

SUPRESION BIOLOGICA

- * Interferones
- * Factores inhibitorios
- * Anticuerpos
- * Acido araquidónico

SUPRESION FARMACOLOGICA

- * Tomoxifen
- * Benzamida
- * Cumarina
- * Burirato de Sodio
- * Etc.

Hoy en día existen diferentes metodologías que permiten estudiar la tumorigenicidad, uno de los más socorridos es uso de ratones atímicos. Cuando se inyectan estos ratones con células Hela basta un inoculo de 1×10^5 células para producir tumores en el 100% de los ratones inyectados, mientras que un inoculo de 1×10^7 células de fibroblastos normales es incapaz de generar el crecimiento de tumores. La fusión de células HeLa con fibroblastos normales producen un híbrido, este híbrido retiene las características transformadas de las células HeLa, pero algo bastante curioso es que suprime completamente el fenotipo tumorigénico, dejan de ser malignas, si definimos el termino maligno como la capacidad que tienen las células para proliferar y producir tumores en hospederos apropiados (Stanbridge, 1976).

El fenotipo de células FE-8 (fibroblastos de rata) transformados con *H-ras* activo puede ser suprimido por transfección de DNA extraído de células humanas normales, sin necesidad de hacer fusiones celulares. Esta supresión se da, aunque todos los revertantes continúen expresando el oncogen *ras* en niveles altos. Así que el mecanismo de supresión involucra un proceso río abajo de la interacción inicial del producto del gen *ras* con sus moléculas blanco (Schafer et al., 1991).

Células HeLa e híbridos tumorigénicos formados por fusiones celulares entre este mismo tipo de células y fibroblastos normales, pueden convertirse en híbridos no tumorigénicos después de introducir una copia del cromosoma 11 (Saxon et al., 1986). Lo que significa que aquí ya no se requiere de las fusiones ni tampoco de la transferencia de DNA total proveniente de células normales, basta con un solo cromosoma para lograr la supresión. Hoy en día el camino para lograr tal supresión ya no es tan largo y simplemente con transferir un gen a líneas celulares neoplásicas y hacer ensayos de tumorigenicidad podemos sabemos si éste puede estar funcionando como gen supresor, ejemplos hay muchos, p53, RB etc.

Ahora el tratar de decir con certeza que un gen puede estar funcionando como supresor resulta muy complicado por que se debe ser contundente, por ejemplo un gen que puede estar actuando como supresor en líneas celulares transformadas con el oncogen *ras* lo tenemos y es caso del gen *K-rev1*. Este gen codifica para una proteína

homóloga con una similitud del 50% a la proteína p21 codificada por el gen *ras*, al igual que *ras*, tiene actividad de GTPasa (Kitayama et al 1989, Su et al., 1993). *K-rev1* puede revertir el fenotipo transformado de las células NIH3T3 transfectadas con el virus del sarcoma de Kirstein, sin alterar la expresión del oncogen *ras*. Estudios donde emplean genes quiméricos apoyan la idea que *K-rev1* suprime la transformación inducida por *ras* al competir por las moléculas blanco involucradas en la transformación celular (Kitayama et al., 1990; Zhang et al., 1990). En otro modelo celular la transformación de células CREF (fibroblastos de embrión de rata) con el oncogen *H-ras* esta asociada con un programa de cambios en la expresión de genes y con la conjunta adquisición de un potencial tumorigénico y metastásico (Boylan et al., 1992). La reversión del fenotipo transformado *in vitro* por la expresión de *K-rev* en estas células, correlaciona con el retorno a la expresión de muchos genes que originalmente se observan en células CREF no transformadas. Sin embargo, la completa supresión del fenotipo transformado *in vitro*, la supresión de la tumorigenicidad y el fenotipo metastasico es incompleto en células CREF transfectadas con *K-rev1* (Su et al., 1993), pero por otro lado, *K-Rev-1* es capaz de suprimir parcialmente el fenotipo neoplásico en clonas de carcinomas procedentes de células no pequeñas de pulmón.

Siguiendo hablando del gen *Krev-1* y haciendo un análisis más detallados se han encontrado cosas muy interesantes que tienen que ver con las características celulares tumorigenic. Por ejemplo células Calu (procedentes de un cáncer de pulmón) transfectadas con un plásmido que contiene dicho gen y además el gen de resistencia a neomicina, que sirve como gen reportero, muestran la aparición de células gigantes con núcleos grandes (Caamano et al., 1992). Estos mismos autores también hicieron experimentos para evaluar su tumorigenicidad inyectadas en ratones atímicos en los cuales observaron una reducción del 40 al 60% en la formación de tumores, además el tamaño de los tumores fue de 3 a 10 veces más pequeños que aquellos formados por los controles (Caamano et al., 1992) desafortunadamente no se evito el crecimiento tumoral.

No solo con las fusiones celulares, ni la transferencia de genes se han visto resultados favorables en cuestiones de tumorigenicidad, ya que también se han encontrado algunas revertantes de células 3T3 transformadas con el virus del sarcoma de

Kirstein cuando estas han sido transfectadas con cDNA de fibroblastos humanos, estas células presentan una tumorigenicidad reducida *in vivo* y una tasa de expresión alta de *v-Ki-ras* y (Noda et al., 1989)

Geiser *et al.* demostraron en 1989 que la supresión de la tumorigenicidad también es posible en híbridos de líneas celulares humanas transformadas que expresan diferentes genes *ras* activados. Al obtener el producto de la fusión de células, cada una portaba un oncogen diferente de *ras* (cualquiera de los tres H, K ó N), los oncogenes así como también sus proteínas estaban presentes en las células híbridas, lo que significa que hay otros factores responsables de la supresión tumorigénica y no solo basta la presencia de la proteína mutada. Sus resultados muestran evidencias que la activación de los oncogenes *ras* puede ser necesaria pero insuficiente para la conversión tumorigénica. Sin embargo se ha visto que cuando se mezclan células normales con células transformadas con *H-ras* la tumorigenicidad se retrasa pero no se suprime, lo que significa, probablemente que la supresión dependa del intercambio intracelular de factores inhibitorios específicos (Kakkanas y Spandidos, 1990)

Con todo lo mencionado anteriormente podemos concluir que la tumorigenicidad, entre otras cosas esta regulada en principio por los productos de genes supresores, pero esto no quiere decir que necesariamente estos tengan que estar interactuando por interferencia con la transcripción o traducción de oncogenes, no obstante pueden interactuar con moduladores o competir con el producto del oncogen o puedan estar actuando en algún punto diferente dentro de una cadena de eventos que conlleva a la transformación y la tumorigenicidad (Craig y Sager, 1985)

Aun así, contando con todos estos antecedentes todavía no queda claro por que al inactivar la función intencionalmente ocasionada, del oncogen *ras* no se logra suprimir la tumorigenicidad, ni tampoco se logra la supresión de líneas celulares que expresan el oncogen sin encontrar indicios de la presencia de la proteína oncogénica una vez que está ha sido neutralizada. Entonces ¿Cual es el papel del oncogen *ras* en la tumorigenicidad?

¿PODRÍA RAS FUNCIONAR COMO SUPRESOR?

Se ha visto que algunos fragmentos subcromosómicos del cromosoma 11 normal, tienen actividad supresora que ha sido mapeada entre los genes de la β -globina y de la insulina (Koi et al., 1993), justo donde se localiza el *H-ras* (Fearon et al., 1984). El gen *H-ras* mide aproximadamente 6.6 kb, en el humano se localiza en el cromosoma 11p15.5 (O'Brien et al., 1983; Fearon et al., 1984). Este gen está constituido por 4 exones, los cuales dan origen a un transcrito de 1.4 kb, que codifica para una proteína de 21 kDa (Barbicid, M. 1987; Lowy, y Willumsen, 1993)

Kashani-Sabet et al. en 1994 demostraron que una ribozima anti-*ras* podía suprimir el fenotipo neoplásico *in vivo* y sugirieron que la ribozima puede actuar como un supresor del crecimiento neoplásico. Feng, M. et al. en 1995 introdujeron un adenovirus recombinante con el gen *ras* a líneas celulares derivadas de tumores y mostraron la reversión del fenotipo neoplásico, siempre y cuando las células, presentaran mutaciones en estos genes.

Como hemos visto el papel de *ras* en la tumorigenicidad es muy relevante, tanto que algunos autores le atribuyen el concepto de ser un gen oncosupresor (Spandidos), un gen bivalente, que se puede comportar como supresor o como oncogen, según el modelo donde se analice.

Células 3T3 transformadas con el oncogen *H-ras* pierden su capacidad para formar colonias en agar en el 90% cuando se transfectan con una ribozima contra *H-Ras* (Meng et al., 1997), ellos mismos también demostraron que puede haber una reversión tumoral al inyectar directamente en tumores generados con células 3T3 transformadas con el oncogen *H-ras*.

Paterson et al. en 1987 trabajaron con una línea celular derivada de un fibrosarcoma, que contiene un gen *N-ras* activado. Obtuvieron algunas revertantes que a pesar de mostrar capacidad de supresión de la tumorigenicidad, retuvieron el gen *N-ras* mutado. Al transfectar el gen *N-ras* silvestre en estas células o hacer microinyecciones de

proteína normal de 2 a 20 veces mayores a los niveles basales no encuentran signos de reversión morfológica y el crecimiento en agar es muy similar entre las células transfectadas y las células sin transfectar, pero sus resultados son incompletos, pues no realizaron ensayos de tumorigenicidad, para determinar que se trataba de un supresor, aunque su objetivo no haya sido este.

Existe contradicción en cuanto a que el gen *ras* puede funcionar como un gen supresor ya que hay trabajos que apoyan esta idea y otros no tanto. En 1988 Spandidos y Wilkie trabajan con células 208F (fibroblastos de rata), que es una línea celular inmortal con morfología normal, crece con dependencia de anclaje y no forma tumores en ratones desnudos. Cuando se transfectan con el oncogen *H-ras* ocurren alteraciones morfológicas, crecimiento con independencia de anclaje y tumorigenicidad, mientras que la transfección del gen *H-ras* normal no tiene efectos aparentes. Cuando el mismo proto-oncogen se transfecta en células T24 procedentes de un carcinoma de vejiga que solamente expresa la forma oncogénica de *H-ras*, se observa una marcada supresión del fenotipo tumorigénico (Spandidos y Wilkie 1988). En estos mismos experimentos hicieron análisis de la expresión de proteína y demuestran que las células no tumorigénicas ó suprimidas expresan más el gen normal que el mutado, mientras que en las variantes tumorigénicas muestran niveles reducidos de la proteína normal y una predominancia de la mutada (Spandidos y Wilkie, 1988). Sin embargo resultan contradictorios los resultados encontrados con células 208F que sobre-expresan el gen *H-ras* silvestre ya que presentan características muy similares de transformación, a aquellas que expresan el oncogen. Del mismo modo también se sabe que células NIH3T3 que sobre-expresan el proto-oncogen *H-ras* forman colonias en agar (Ogiso et al., 1994) y obviamente son tumorigénicas.

En 1989 Geiser et al trabajan con fusiones de diferentes líneas que expresan cualquiera de los tres genes *ras* activados. Las combinaciones derivadas de las fusiones celulares entre HT1080 (*H-ras* activado) y HT1080 (*K-ras* activado) suprimen la tumorigenicidad, no siendo así cuando estas líneas celulares se inyectan de forma independiente en ratones atímicos. Como resultado el híbrido da una complementariedad genética, es decir que cada una de las células que forman el híbrido, aporta los genes

supresores de los que carece la otra y viceversa, lo que conlleva a la supresión tumoral con fusiones entre líneas transformadas por dos formas distintas de *ras*.

JUSTIFICACION:

Hasta aquí con los datos que anteriormente hemos citado, tenemos un amplio panorama que nos deja ver un buen número de aportaciones en el estudio y la participación de los genes *ras*, en la tumorigenicidad, sin embargo, sobresalen muchas interrogantes y contradicciones, todas ellas de una u otra forma son justificadas y avaladas por diferentes trabajos. A pesar de contar con todas las evidencias señaladas en párrafos anteriores, sigue prevaleciendo la duda sobre el posible papel que *ras* pueda desempeñar en procesos implicados en la supresión del crecimiento tumoral y si en verdad su versión normal o silvestre pudiese funcionar como un supresor de tumores, de ser así este gen tendría que ser capaz de inhibir el crecimiento tumoral de líneas celulares transformadas.

Ya sabemos que el gen *H-ras* ésta directamente involucrado en una característica muy importante de las células tumorales, el crecimiento independiente de anclaje, la característica que mejor correlaciona con la misma capacidad celular que tiene para formar tumores. Por lo tanto si transfectamos el alelo silvestre del gen *ras* o el gen mutado en líneas celulares tumorigénicas como HeLa, es posible que se encuentren diferencias de crecimiento en cultivos de agar semisólido y probablemente estas mismas diferencias puedan correlacionar con el crecimiento tumoral en ratones atómicos, es decir que *ras*, funcione como supresor al inhibir la aparición de tumores. Para ello en este estudio hemos utilizamos líneas celulares previamente tranfectadas con los genes *H-ras* silvestre o mutado, para determinar si esta involucrado en la supresión del crecimiento con independencia de anclaje y por ende en la tumorigenicidad de células HeLa.

supresores de los que carece la otra y viceversa, lo que conlleva a la supresión tumoral con fusiones entre líneas transformadas por dos formas distintas de *ras*.

JUSTIFICACION:

Hasta aquí con los datos que anteriormente hemos citado, tenemos un amplio panorama que nos deja ver un buen número de aportaciones en el estudio y la participación de los genes *ras*, en la tumorigenicidad, sin embargo, sobresalen muchas interrogantes y contradicciones, todas ellas de una u otra forma son justificadas y avaladas por diferentes trabajos. A pesar de contar con todas las evidencias señaladas en párrafos anteriores, sigue prevaleciendo la duda sobre el posible papel que *ras* pueda desempeñar en procesos implicados en la supresión del crecimiento tumoral y si en verdad su versión normal o silvestre pudiese funcionar como un supresor de tumores, de ser así este gen tendría que ser capaz de inhibir el crecimiento tumoral de líneas celulares transformadas.

Ya sabemos que el gen *H-ras* ésta directamente involucrado en una característica muy importante de las células tumorales, el crecimiento independiente de anclaje, la característica que mejor correlaciona con la misma capacidad celular que tiene para formar tumores. Por lo tanto si transfectamos el alelo silvestre del gen *ras* o el gen mutado en líneas celulares tumorigénicas como HeLa, es posible que se encuentren diferencias de crecimiento en cultivos de agar semisólido y probablemente estas mismas diferencias puedan correlacionar con el crecimiento tumoral en ratones atómicos, es decir que *ras*, funcione como supresor al inhibir la aparición de tumores. Para ello en este estudio hemos utilizamos líneas celulares previamente tranfectadas con los genes *H-ras* silvestre o mutado, para determinar si esta involucrado en la supresión del crecimiento con independencia de anclaje y por ende en la tumorigenicidad de células HeLa.

OBJETIVO:

El objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto de la expresión de un alelo silvestre del gen *h-ras* en células HeLa, sobre el crecimiento con independencia de anclaje y su correlación con el crecimiento tumoral.

MATERIALES Y METODOS:

CULTIVO CELULAR: Se utilizaron células HeLa cultivadas en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 10% de suero neonato y antibióticos (estreptomina 10µg/ml-penicilina 100µg/ml). Se generaron clones de células HeLa transfectadas establemente con el gen *ras* silvestre contenido en el plásmido pECneo, clones con el gen *ras* mutado pEJneo y clones transfectadas con el vector vacío pSV2neo, como ha sido previamente descrito en Miranda et al. 1996. Los tres plásmidos expresan el gen de resistencia a la neomicina, que sirve como marcador de selección.

ANALISIS CELULAR: Los porcentajes de células gigantes multinucleadas fueron determinados a partir de la siembra de cultivos a baja densidad celular. Se sembraron aproximadamente 5×10^3 células en cajas petri de 60 mm se permitió su adhesión y la formación de colonias durante 72 h., luego se contaron las células multinucleadas de 100 colonias por caja a diferentes tiempos.

ANALISIS DE CICLO CELULAR: Se sembraron 1×10^6 células en cajas petri de 100 mm permitiendo su adherencia, después de 42 h. fueron tripsinizadas, fijadas en etanol al 70% y tratadas con el kit High DNA Resolution (Partec, GmbH, Germany). El análisis de citofluorometría se llevo a cabo en un citofluorometro Partec CA-II (GmbH, Germany). La calibración del aparato se llevó a cabo con linfocitos de ternera arrestados en la fase G1 del ciclo celular

CRECIMIENTO EN AGAR SUAVE: Para determinar la propiedad de crecimiento con independencia de anclaje de las cuatro clones se sembraron 2×10^4 células en una capa superior de bacto-agar al 0.3% en medio DMEM más 10% de suero fetal bovino, sobre una

OBJETIVO:

El objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto de la expresión de un alelo silvestre del gen *h-ras* en células HeLa, sobre el crecimiento con independencia de anclaje y su correlación con el crecimiento tumoral.

MATERIALES Y METODOS:

CULTIVO CELULAR: Se utilizaron células HeLa cultivadas en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 10% de suero neonato y antibióticos (estreptomina 10µg/ml-penicilina 100µg/ml). Se generaron clones de células HeLa transfectadas establemente con el gen *ras* silvestre contenido en el plásmido pECneo, clones con el gen *ras* mutado pEJneo y clones transfectadas con el vector vacío pSV2neo, como ha sido previamente descrito en Miranda et al. 1996. Los tres plásmidos expresan el gen de resistencia a la neomicina, que sirve como marcador de selección.

ANALISIS CELULAR: Los porcentajes de células gigantes multinucleadas fueron determinados a partir de la siembra de cultivos a baja densidad celular. Se sembraron aproximadamente 5×10^3 células en cajas petri de 60 mm se permitió su adhesión y la formación de colonias durante 72 h., luego se contaron las células multinucleadas de 100 colonias por caja a diferentes tiempos.

ANALISIS DE CICLO CELULAR: Se sembraron 1×10^6 células en cajas petri de 100 mm permitiendo su adherencia, después de 42 h. fueron tripsinizadas, fijadas en etanol al 70% y tratadas con el kit High DNA Resolution (Partec, GmbH, Germany). El análisis de citofluorometría se llevo a cabo en un citofluorometro Partec CA-II (GmbH, Germany). La calibración del aparato se llevó a cabo con linfocitos de ternera arrestados en la fase G1 del ciclo celular

CRECIMIENTO EN AGAR SUAVE: Para determinar la propiedad de crecimiento con independencia de anclaje de las cuatro clones se sembraron 2×10^4 células en una capa superior de bacto-agar al 0.3% en medio DMEM más 10% de suero fetal bovino, sobre una

capa inferior de bacto-agar al 0.6%; en cajas petrí de 6 pozos o cajas de 35 mm. Las colonias resultantes fueron contadas y fotografiadas tres semanas después de haber sido sembradas. Contamos un total de 100 colonias separadas en tres grupos; el primero con menos de 10 células por colonia, el segundo de 11-30 células por colonia y el tercero con más de treinta células por colonia

ENSAYO DE TUMORIGENICIDAD: La tumorigenicidad de las clonas celulares fue individualmente determinada a través de una inyección subcutánea de 1×10^6 células, resuspendidas en un volumen total de 0.2 ml de DMEM e inyectadas en los costados de ratones atímicos de 4-6 semanas de edad (cuatro ratones por clona; dos sitios de inoculación por cada línea celular). Los sitios inyectados fueron observados a intervalos regulares de tiempo para detectar la aparición y formación de tumores. El volumen tumoral fue medido de acuerdo a la fórmula $(a \times b^2 / 2)$, donde a = al diámetro superficial más largo y b = al diámetro superficial más corto (Carlsson et.al, 1983).

OBTENCION DE CELULAS DERIVADAS DE TUMORES: Los tumores generados en los ratones atímicos fueron removidos una vez que estos fueron sacrificados, se lavaron con PBS y cuidadosamente se cortaron en pequeños fragmentos que a su vez fueron enzimáticamente disgregados con varios tratamientos de tripsina. Las células aisladas fueron cultivadas en DMEM suplementado con 10% de suero bovino neonato y antibióticos.

RESULTADOS

CRECIMIENTO CON INDEPENDENCIA DE ANCLAJE Y CARACTERISTICAS IN VITRO DE CELULAS HeLa TRANSFECTADAS.

En estudios previos en nuestro laboratorio, demostramos que la transfección del gen *H-ras* silvestre (pEcneo) o *H-ras* (pEjneo) vía electroporación en células HeLa induce la aparición de células gigantes multinucleadas, las cuales sufren una serie de alteraciones en el ciclo celular, un número limitado de divisiones y finalmente mueren por un fenómeno conocido como "catástrofe mitótica" (Miranda et al., 1996).

En este trabajo analizamos la capacidad que tienen estas clonas para crecer y formar colonias en agar semisólido. Un total de 2×10^4 células, aproximadamente, de cada clona se cultivaron durante tres semanas, después se contaron los porcentajes de colonias separadas en tres diferentes grupos (fig. 1 A,B y C).

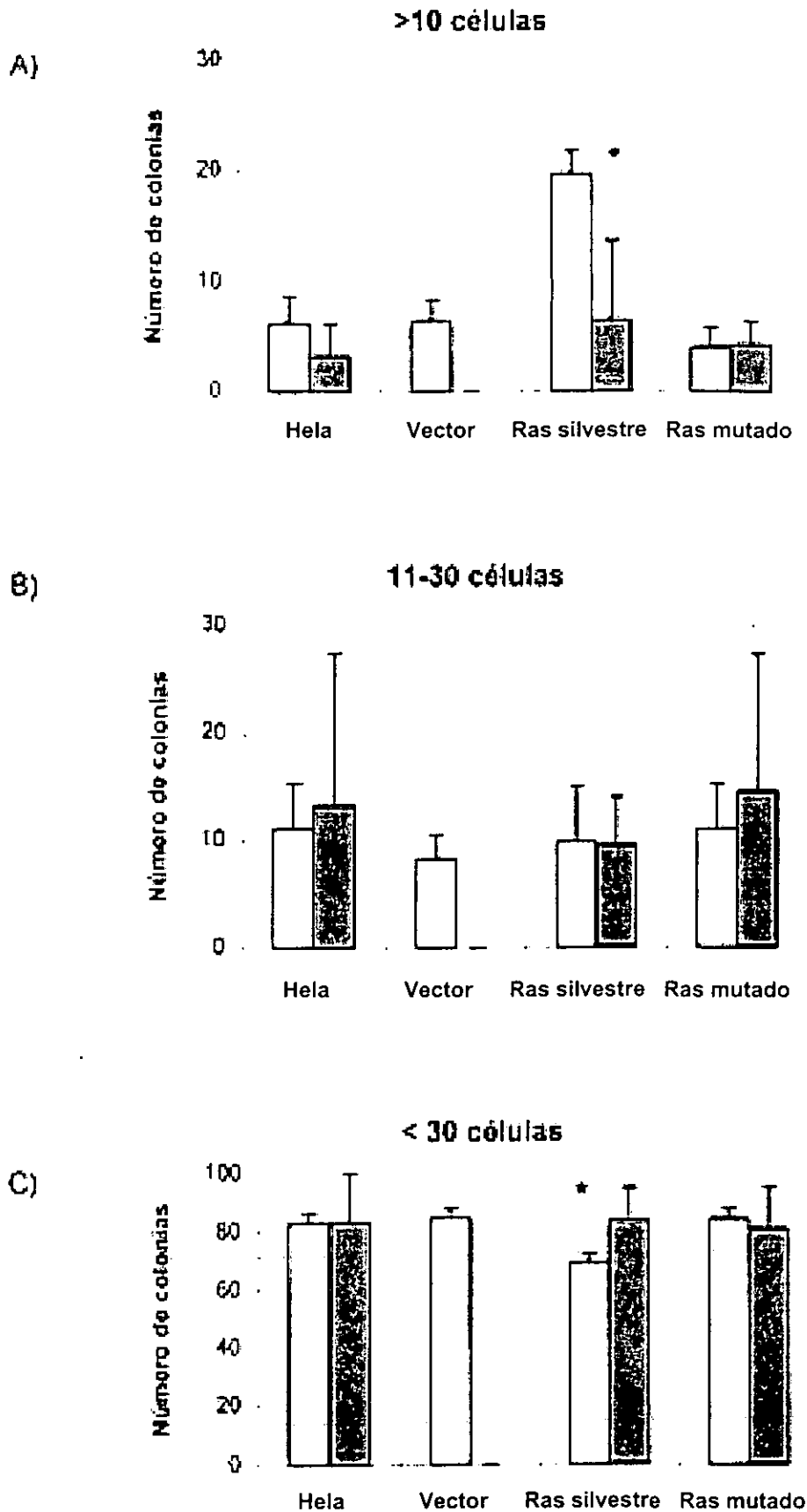


Figura 1: Crecimiento con independencia de anclaje de células HeLa transfectadas con *h-ras* silvestre, antes (barras blancas) y después (barras oscuras) de haber sido recuperadas de tumores inducidos en ratones atímicos. Porcentaje de colonias con A) menos de 10 células/colonia B) entre 10-30 células/colonia y C) más de 30 células/colonia.

* Presentan diferencias significativas con una $p < 0.05$ de tres experimentos.

El crecimiento con independencia de anclaje de las células HeLa transfectadas con el gen *ras* silvestre fue afectado. La capacidad para formar colonias de todas las líneas fue similar en los tres grupos, excepto para la células HeLa transfectadas con el *ras* silvestre, las cuales forman más colonias con menos de 10 células por colonia (ver fig 1A, barras blancas) con una $p < 0.05\%$. Estos datos muestran que *ras* silvestre hace que las células HeLa reduzcan su capacidad para crecer con independencia de anclaje ya que el número de colonias pequeñas (con menos de 10 células) es significativamente mayor al comparar con el resto de las clonas, y a su vez el porcentaje de colonias con más de 30 células por colonia es menor (fig 1C barras blancas). Sin embargo, esta diferencia ya no es tan clara al analizar la fig 1B (barras blancas) donde se aprecia que el número de colonias de tamaño medio, prácticamente es el mismo, de hecho, no se encontraron diferencias significativas entre ellas. Si solo tomamos en cuenta la figura 1A (barras blancas) podemos la presencia de *ras* silvestre produce colonias de menor tamaño (fig A), pero esta reducción solo se presentó en el 20% de las colonias.

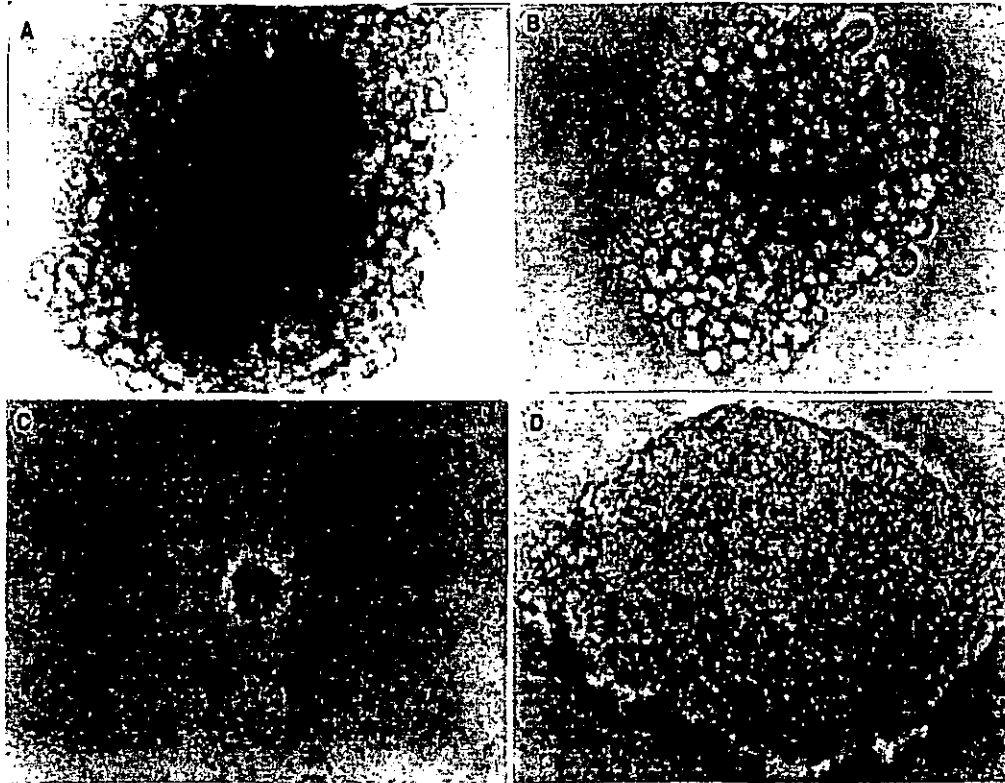


Figura 2: Crecimiento con independencia de anclaje en agar semisólido. Las células HeLa transfectadas con el gen *h-ras* silvestre forman colonias más pequeñas. A) células HeLa sin transfectar, B) células HeLa-vector, C) células HeLa *-ras* silvestre, D) células HeLa-*ras* mutado

CAPACIDAD DE LAS CÉLULAS HeLa TRANSFECTADAS PARA FORMAR TUMORES

Para determinar el potencial tumorigénico, aproximadamente 1×10^6 células de las cuatro clonas se inyectaron subcutáneamente en ratones atímicos. Los animales fueron examinados y palpados regularmente para buscar la aparición de masas tumorales. Los resultados aparecen en la figura 3.

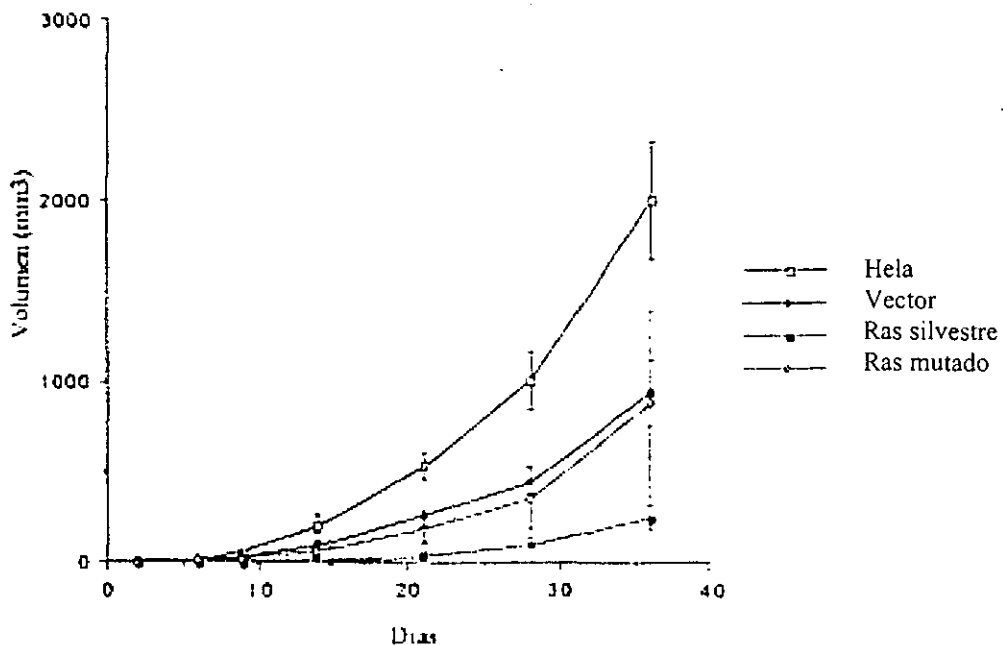


Figura 3: Efecto de la transfección del gen *ras* silvestre sobre la tumorigenicidad de células HeLa en ratones atímicos. Se muestra el volumen promedio de los tumores a través del tiempo para las líneas celulares transfectadas.

Los tumores generados por las células HeLa transfectadas con *ras* silvestre mostraron un crecimiento más reducido al compáralas con el resto de las clonas, con una $P < 0.05$. Esto se comprobó al realizar una ANOVA de medidas repetidas (Sokal y Rohlf, 1995), comparando clona por clona (tabla 1)

Comparación entre clonas	F	P
HeLa/HeLa-Vector	1.69	$p = 0.25$
HeLa/HeLa-Ras silvestre	39.63	$p < 0.0005$
HeLa/ HeLa-Ras Mutado	2.6	$p = 0.105$
HeLa-Vector/HeLa-Ras-Nor	4.54	$p < 0.03$
HeLa-Vector/HeLa-Ras-Mut	0.93	$p = 0.51$
HeLa-Nor/HeLa-Mut	4.23	$p < 0.03$

Tabla 1. Contrastes pareados entre clonas celulares a lo largo del tiempo.

De un 40 a un 60% fue la reducción del tamaño tumoral generado por las células HeLa que portan el gen *ras* silvestre. Los tamaños tumorales desarrollados en los ratones por esta clona fueron de 6 a 7 veces más pequeños que aquellos formados por las células transfectadas con el oncogen (fig 4C). Los rangos de peso de los tumores fueron de 0.4 gr. para HeLa pEcneo, 3.12 gr. HeLa pEjneo, 0.83 gr. vector y 1.73 gr. para las células HeLa sin

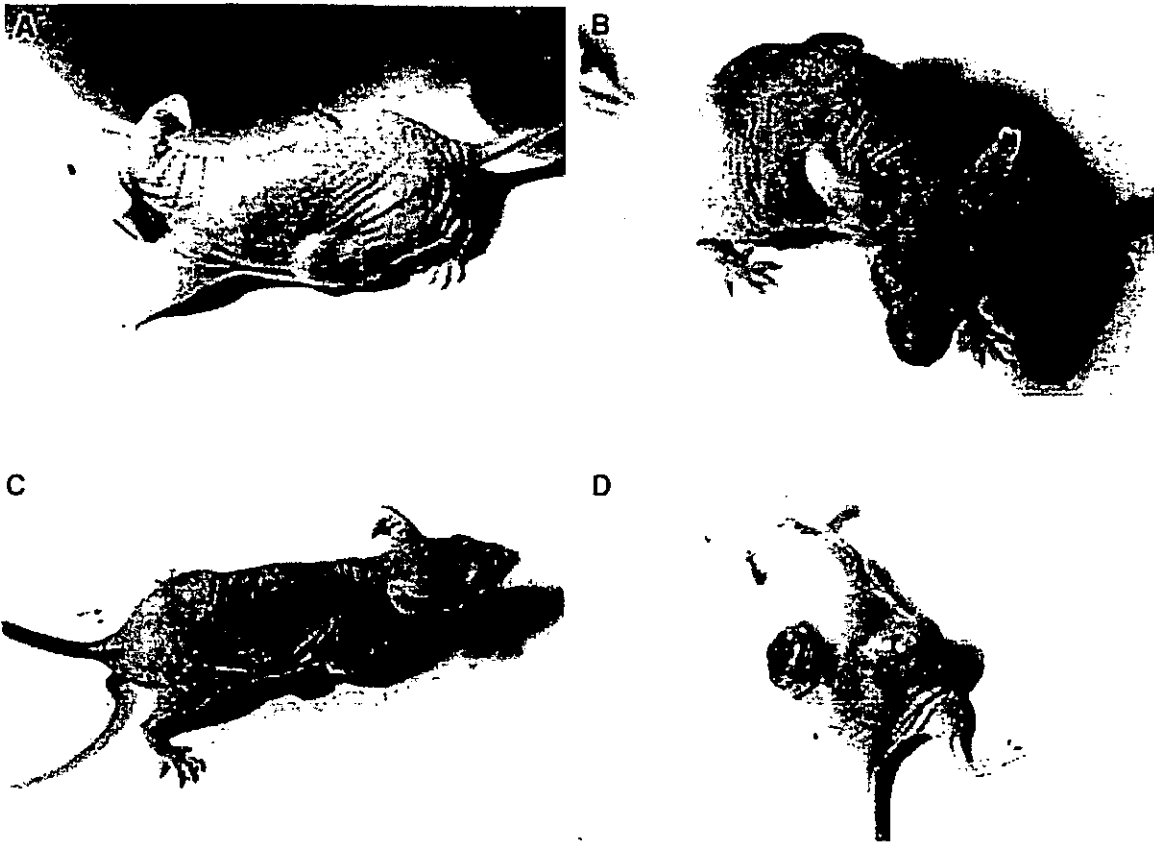


Figura 4: Reducción del tamaño tumoral por el gen *ras* silvestre en células HeLa inoculadas en ratones atímicos A) células HeLa sin transfectar B) células HeLa-vector C) células HeLa-*ras* silvestre y D) células HeLa-*ras* mutado.

De los tumores, se aislaron células y se restablecieron en cultivo. Las células derivadas de los tumores pSV2neo, pEcneo y pEjne fueron resistentes a G418, por más de cuatro semanas, lo cual indica que a pesar de formar tumores todavía siguen reteniendo la construcción plasmídica, o por lo menos el gen de resistencia a la neomicina.

LAS CELULAS HeLa RECUPERADAS DE LOS TUMORES MUESTRAN UNA PERDIDA EN LA CAPACIDAD PARA FORMAR CELULAS MULTINUCLEADAS

En trabajos anteriores en el laboratorio se determinaron los porcentajes de células multinucleadas que aparecen en cultivo después de haber sido transfectadas establemente con ambas versiones del gen *ras* (Miranda, E. et.al 1996). Las células transfectadas con *ras* mutado, muestran una disminución muy marcada en los porcentajes de células multinucleadas antes de ser inyectadas (60%) y después de haber sido recobradas del tumor que generaron (fig. 5),

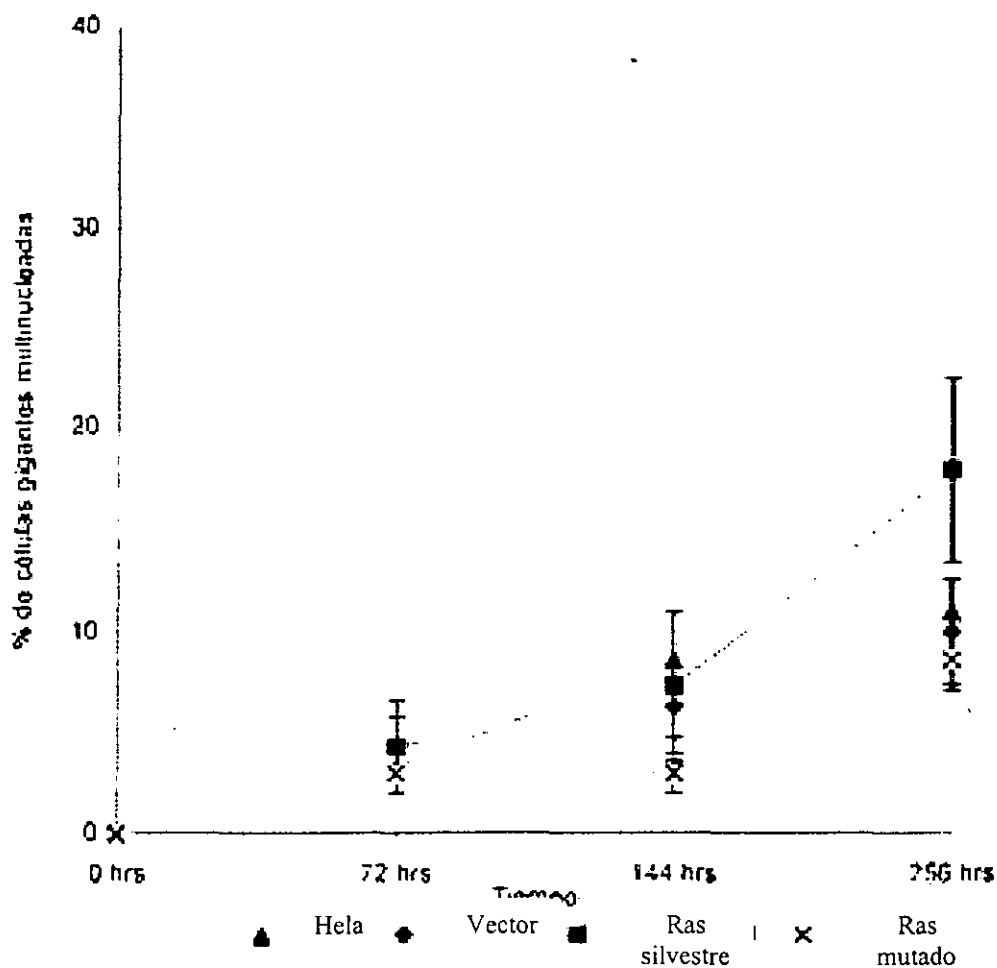


Figura 5: Generación de células gigantes a partir de células recobradas de tumores desarrollados en ratones atímicos inoculados con células HeLa transfectadas con los genes *h-ras* silvestre y mutado.

el porcentaje cae a menos del 10%. Sucede lo mismo con las células procedentes del tumor generado con *ras* silvestre, aunque la diferencia es menor, 25% antes de inyectarlas y un 20% después de reestablecerlas en cultivo. A pesar de esto, un buen porcentaje 20% aproximadamente, de células derivadas del tumor pEneo continúan formando células gigantes multinucleadas (fig. 6C)

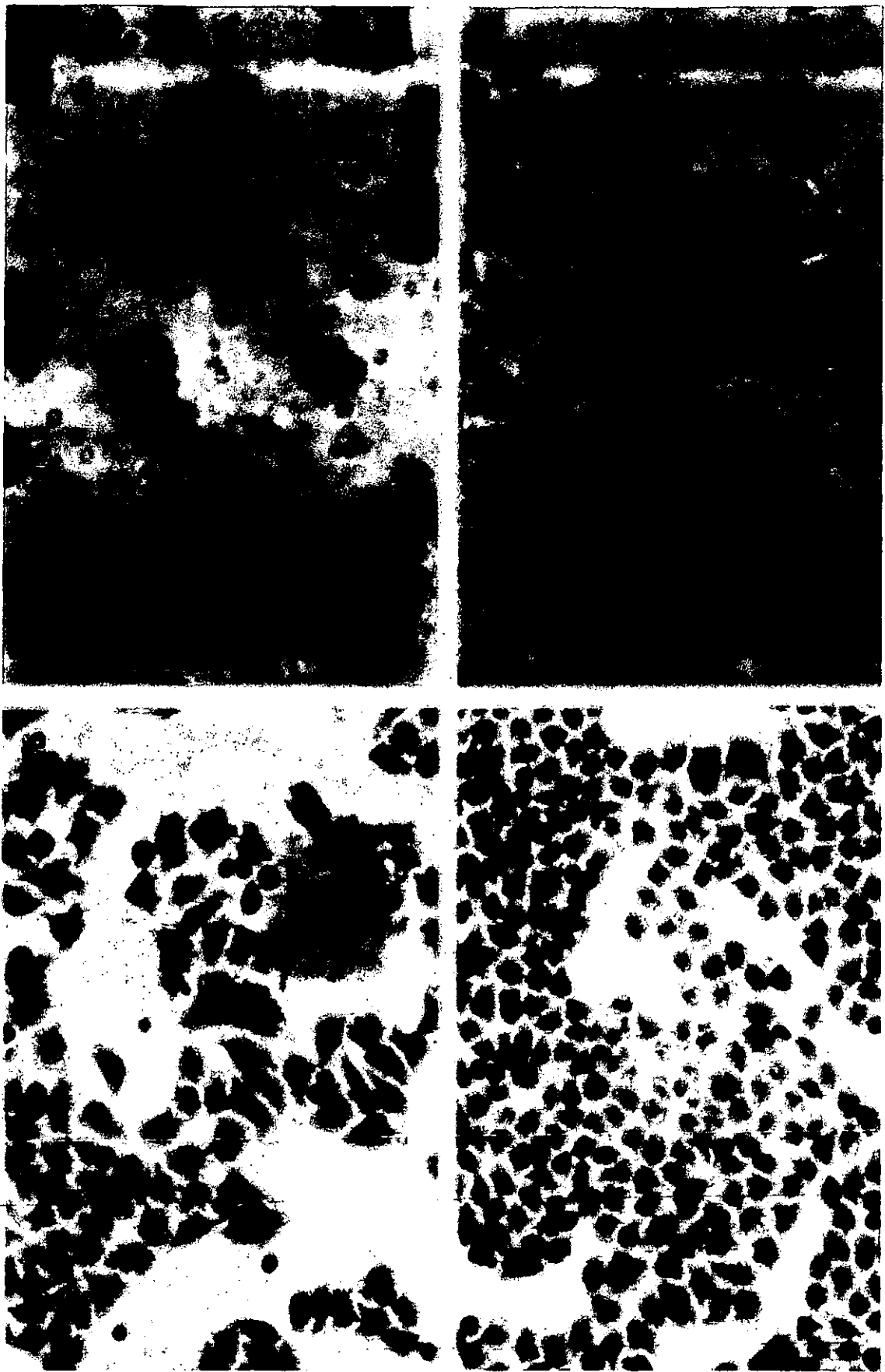


Figura 6: Células gigantes procedentes del tumor generado por células HeLa transfectadas con *ras* silvestre. A) HeLa sin transfectar B) HeLa-vector vacío C) HeLa-*ras* silvestre D) HeLa-*ras* mutado.

En ensayos de crecimiento con independencia de anclaje las células HeLa transfectadas con *ras* silvestre derivadas del tumor muestran independencia de anclaje en agar semisólido, adquiriendo nuevamente su capacidad para formar colonias. Antes de pasar por el ratón estas células aproximadamente el 20% de las colonias tenían menos de 10 células y después de pasar por el ratón este porcentaje cae por abajo del 10% (fig.1A).

EL CICLO CELULAR DE LAS CÉLULAS TRANSFECTADAS Y CONTROL ES PARECIDO.

La figura 7, análisis por citofluoremetría de flujo, muestra las diferencias del ciclo celular entre células transfectadas antes de ser inyectadas a los ratones y células recuperadas de los tumores que generaron. El análisis de las células transfectadas con *ras* silvestre y *ras* mutado antes de ser inyectadas indica que existe un mayor porcentaje de células en fase G2/M 57% y 63% respectivamente (fig 7 panel A) a diferencia de las células derivadas de todos los tumores panel (B), que exhiben un patrón proliferativo muy similar al de las células HeLa sin transfectar y donde los porcentajes en la fase G2/M caen del 57 al 19% para las células transfectadas con el gen normal y del 63 al 23% para las transfectadas con el gen mutado.

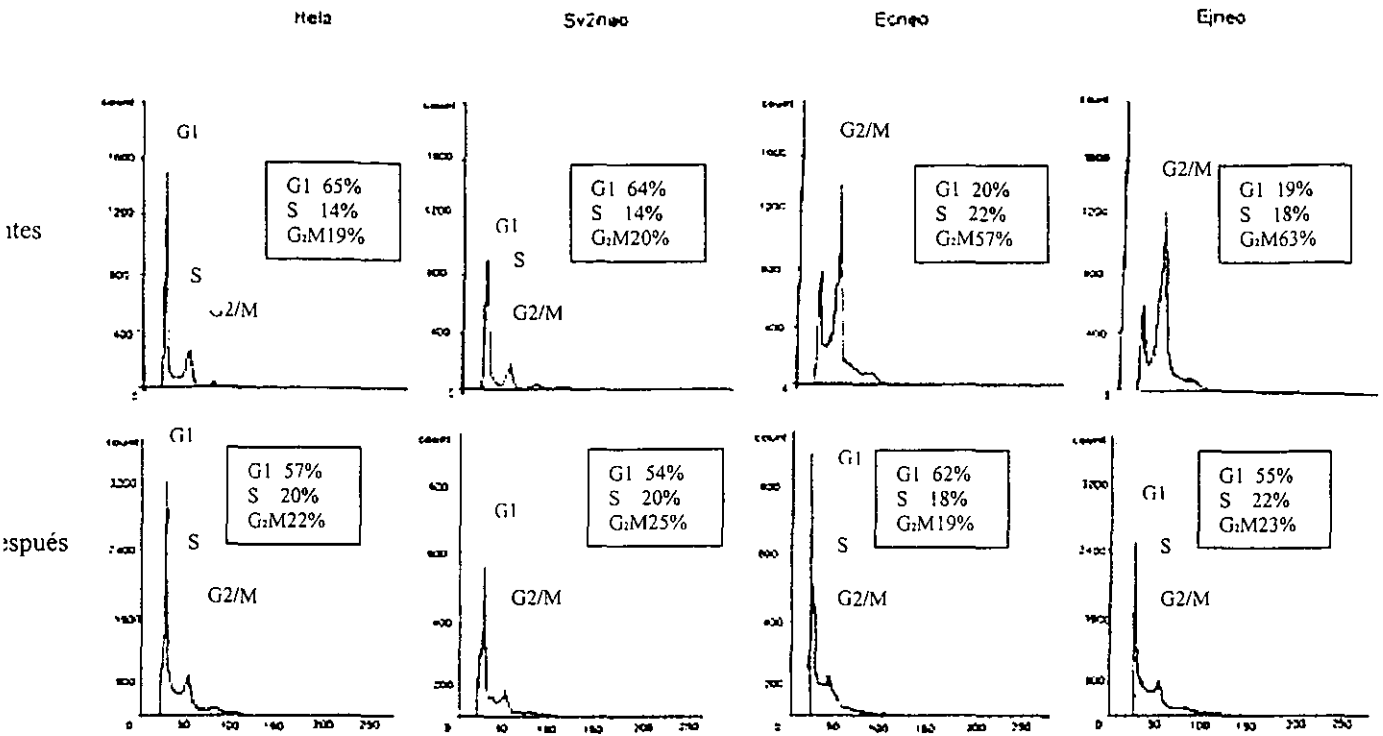


Figura 7: Diferencias en ciclo celular entre clonas antes de ser inyectadas (panel A) y después de haber sido recuperadas de los tumores generados en ratones atímicos.

DISCUSION:

Se dice que el crecimiento con independencia de anclaje es la principal característica de las células tumorales *in vitro* que mejor correlaciona con la tumorigenicidad. Sin embargo, no siempre existe una correlación directa entre estos dos fenómenos, ya que hay casos en los cuales se transfectan células con genes supresores y estas continúan creciendo en agar semisólido pero cuando se inyectan en ratones atímicos son incapaces de formar tumores. (Pershouse et al., 1993). En este trabajo buscamos esa posible correlación, introduciendo a un alelo silvestre del gen *ras* I en células HeLa. No se sabe con certeza si *ras* silvestre puede tener una participación destacada en este proceso cuando es transfectado en células tumorigénicas. Lo que hemos visto es que puede revertir parcialmente el crecimiento con independencia de anclaje en células HeLa (fig 1). Hemos visto que el proto-oncogen puede reducir la aparición de colonias grandes y aumentar el número de colonias pequeñas (con menos de 10 células por colonia) en un 20% lo que significa que este tipo de colonias tiene una capacidad limitada de división celular inducida por *ras*, que aquellas con más de treinta

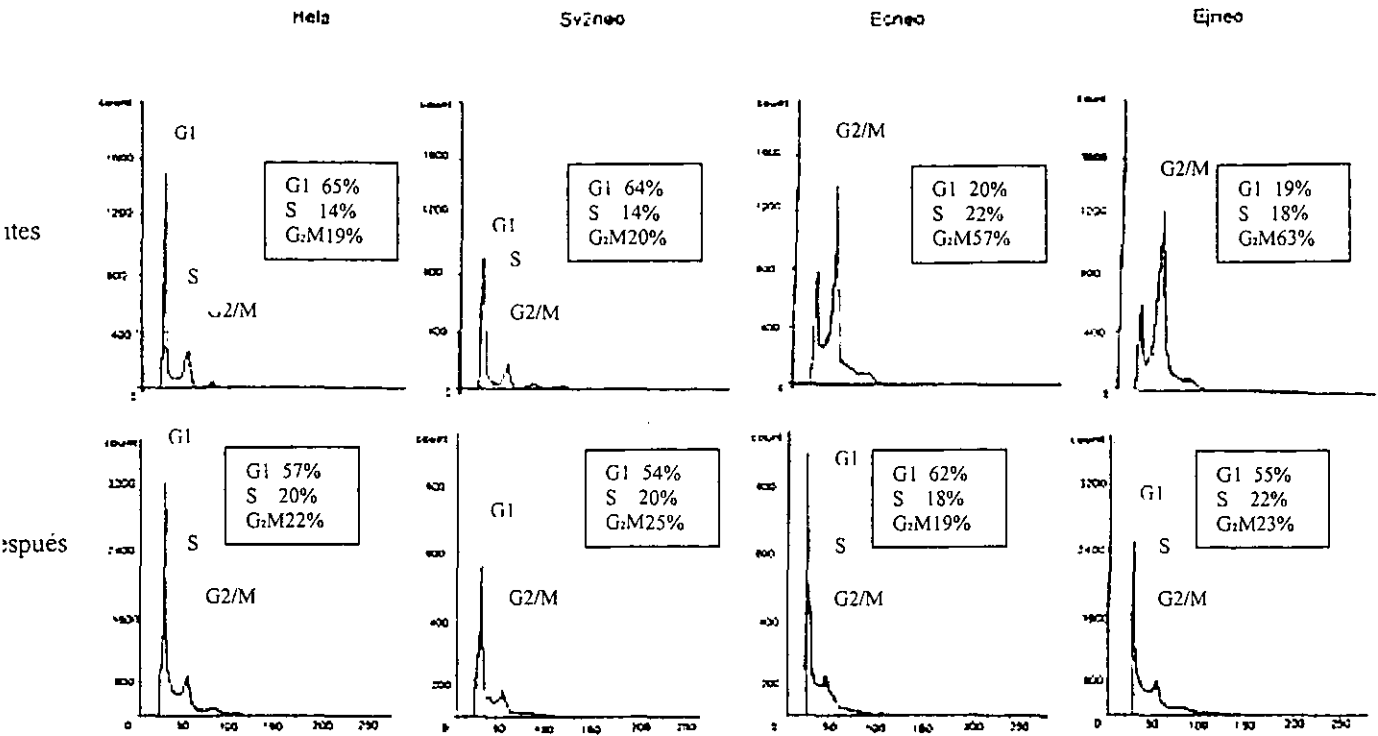


Figura 7: Diferencias en ciclo celular entre clonas antes de ser inyectadas (panel A) y después de haber sido recuperadas de los tumores generados en ratones atímicos.

DISCUSION:

Se dice que el crecimiento con independencia de anclaje es la principal característica de las células tumorales *in vitro* que mejor correlaciona con la tumorigenicidad. Sin embargo, no siempre existe una correlación directa entre estos dos fenómenos, ya que hay casos en los cuales se transfectan células con genes supresores y estas continúan creciendo en agar semisólido pero cuando se inyectan en ratones atímicos son incapaces de formar tumores. (Pershouse et al., 1993). En este trabajo buscamos esa posible correlación, introduciendo a un alelo silvestre del gen *ras* 1 en células HeLa. No se sabe con certeza si *ras* silvestre puede tener una participación destacada en este proceso cuando es transfectado en células tumorigénicas. Lo que hemos visto es que puede revertir parcialmente el crecimiento con independencia de anclaje en células HeLa (fig 1). Hemos visto que el proto-oncogen puede reducir la aparición de colonias grandes y aumentar el número de colonias pequeñas (con menos de 10 células por colonia) en un 20% lo que significa que este tipo de colonias tiene una capacidad limitada de división celular inducida por *ras*, que aquellas con más de treinta

células por colonia que constantemente se están dividiendo.

Dado que las tres clonas (vector, *ras* silvestre y *ras* mutado) son monoclonales, el hecho de solo el 20% de las colonias encontradas con *ras* silvestre sean pequeñas no puede explicarse por heterogeneidad en los sitios de inserción del transgen, ni por el número de copias del transgen introducido originalmente. Esta heterogeneidad en el tamaño de las colonias podría deberse a un apagamiento en la expresión del transgen en las células que dan origen a estas colonias. Sin embargo esto es poco probable porque este experimento se realizó tres veces a lo largo de un año con resultados similares. Si existiera apagamiento el porcentaje de colonias pequeñas debería haber disminuido. Dado que todas las clonas conservan resistencia a geneticina podemos concluir que el inserto no se perdió. La heterogeneidad podría deberse a inestabilidad genética de las células HeLa que al cabo de varias generaciones convierta el fondo genético de una clona en un fondo heterogeneo. Si bien esta posibilidad podría explicar la reducción de las colonias en el 20% de la población no se observó heterogeneidad en el tamaño de las colonias cuando se introdujo el alelo mutado de *ras*.

La introducción de *ras* silvestre incrementó la frecuencias de colonias multinucleadas a más del doble (Miranda et al 1996). Dado que estas células son más frágiles es posible que la reducción en tamaño de las colonias también se deba a la muerte de estas células.

Se ha visto que cuando se hacen experimentos de transformación celular, con los genes *ras*, las células una vez que son transformadas adquieren la capacidad de crecer en agar semisuave, la expresión de cualquiera de los tres oncogenes *ras* participan directamente en este fenómeno (Schafer et al., 1991; Pershouse et al., 1993; Qiu et al., 1997). Sin embargo, es importante destacar, por lo que sabemos, que el oncogen *H-ras* es de los tres, el que tiene mayor capacidad para transformar líneas celulares de origen epitelial en comparación con los oncogenes *N* y *K ras* y es también el que presenta un mayor potencial para la formación de colonias (Maher et al., 1995). En este trabajo nosotros hemos observado que la transfección del oncogen *H-ras* en células HeLa no cambia significativamente la capacidad que tienen estas para formar colonias en agar, aunque si podemos observar que las colonias pueden llegar a ser más grandes en tamaño (fig 2D) que

las colonias formadas por células sin transfectar. Probablemente esto sea indicativo de su agresividad.

En ensayos de tumorigenicidad en ratones atímicos encontramos que *ras* silvestre es capaz de suprimir parcialmente la tumorigenicidad de células HeLa al disminuir el volumen tumoral comparado con aquel generado con células que portan gen mutado. El volumen tumoral fue 6-7 veces más pequeño (fig 4c) que aquellas células sin transfectar o aquellas que portan el oncogen, pero sin llegar a tener la supresión total. Al parecer se puede afectar el potencial tumorigenico de las células HeLa simplemente con el hecho de transfectarlas ya que la presencia del vector vacío disminuye el tamaño de la masa tumoral (sin afectar el número de tumores que se forman (fig 3). Esto disminuye la magnitud del efecto del gen *ras* silvestre. Pero si solo comparamos los tumores generados por células transfectadas con *ras* silvestre con las células transefectadas con *ras* mutado y el vector vacío, observamos que hay un efecto adicional al vector vacío. Si nosotros pensamos que solo *ras* silvestre es el encargado de ocasionar este efecto entonces podríamos decir que las células que forman parte del tumor podrían haber perdido el plásmido y por ende el mismo gen o que posiblemente el gen haya mutado. Sin embargo, todas las células reestablecidas de los tumores fueron resistentes a neomicina, excepto aquellos que no fueron transfectadas con el plásmido de resistencia. Esto significa que las células siguen conservando la construcción plamidica. Difícilmente el gen *ras* silvestre transferido pudiera haber tenido mutaciones de novo, ya que hay trabajos que así lo señalan. En Células que cuentan con dos alelos de *N-ras* , uno normal y otro mutado, al eliminar el alelo mutado, se logra suprimir la independencia de anclaje pero estas células siguen formando tumores en ratones, además los tumores no presentan mutaciones de novo en ninguno de los tres genes *ras* . Con esto podríamos decir que es muy probable que el gen *ras* exógeno siga funcionando en las células HeLa procedentes de los tumores que generaron y que la disminución en el tamaño tumoral de esta clona podría ser resultado de una pequeña población de células tumorigénicas segregadas dentro de una población predominantemente no tumorigénica.

Hay que mencionar que la clona HeLa Ecneo utilizada en este estudio sobreexpresa el gen H-*ras* silvestre (Miranda etal.,1996) y recordar también que células que sobre-

expresan H-ras silvestre muestran una morfología completamente transformada y que sus efectos son los mismos que aquellos producidos por el oncogen (Lowy y Willumsen,1993). Nuestros datos indican que aunque la morfología y los efectos *in vitro* parezcan ser los mismos en células HeLa transfectadas con el oncogen o el gen normal, estos no son los mismos en la capacidad que tienen estas células para formar tumores. Con esto podemos destacar dos puntos importantes, el primero, que existe una correlación entre el tamaño de las colonias de *ras* silvestre *in vitro* y de la masa tumoral *in vivo* y el segundo la correlación entre el 20% de colonias chicas *in vitro* y el 100% de tumores chicos *in vivo*. Las clonas transfectadas con los genes *ras* mostraron 3 características muy distintas e interesantes antes de ser inyectadas a los ratones y después de haber sido recuperada de los tumores. La primera fue en la capacidad que tienen las células transfectadas con *ras* silvestre o *ras* mutado para formar células multinucleadas cuando se crecen *in vitro* antes de inyectarlas (Miranda et.al 1996) y después de pasarlas por los ratones, aquí los porcentajes se ven afectados. Cuando son recuperadas de los tumores las células con *ras* mutado muestran una disminución en la generación de células multinucleadas que prácticamente es igual a la células HeLa sin transfectar. Por el contrario, las células transfectadas con el gen *ras* silvestre procedentes del tumor siguen generando células multinucleadas en aproximadamente un 20 %; esto pareciera indicar que estas células podrían estar desapareciendo dentro del ratón y se estaría dando una eliminación paulatina de poblaciones celulares tendientes a desaparecer. Esto podría ayudar a explicar en parte el porque de la reducción del tamaño tumoral. Posiblemente se da el crecimiento de una pequeña población de células tumorigénicas dentro de una población predominantemente no tumorigénica, donde las células multinucleadas por su tamaño y morfología son eliminadas por muerte mitótica (Miranda et al. 1996).

El análisis histopatológico de todos los tumores generados con las cuatro líneas celulares señala que en todos los casos se trata de un carcinoma epitelioide, de los cuales el tumor HeLa *ras* silvestre presenta un mayor número de bandas de fibronectina. Este fenómeno podría estar asociado a cuestiones que tienen que ver con metástasis. De alguna manera la encapsulación de la masa tumoral rodeada por bandas de fibronectina podría

impedir que las células puedan seguir creciendo y que al mismo tiempo se dé un proceso migratorio, sin embargo en ninguno de los ratones estudiado se encontraron metástasis.

En los ensayos de independencia de anclaje, las clonas reestablecidas de los tumores generados con células Hela *ras* silvestre adquiere nuevamente capacidad para formar colonias en agar. Cabe notar que las colonias pequeñas de la clona de *ras* silvestre tuvieron una frecuencia similar a las de *ras* mutado, y se pierde el incremento que presentaban antes de inyectarlas al ratón. Es posible que al ser inyectadas las células con *ras* silvestre que dan origen a este incremento mueran y por lo tanto estén ausentes de la población derivada de los tumores disgregados. Estos resultados son parecidos a los encontrados por Feinlab y col. en 1997 al reportar que cuando inyectaron fibroblastos de ratón (que no forman colonias en agar semisólido) pero como resultado de su inyección en ratones atímicos provocaron el crecimiento de tumores de menor tamaño al esperado. Después de 10 semanas al restablecer células procedentes de estos tumores y hacer ensayos de independencia de anclaje se dieron cuenta que estas células nuevamente fueron capaces de formar colonias en agar, característica que no presentaban antes de ser inyectadas. Cuando estas células se reinyectaron en ratones tuvieron una capacidad tumorigénica muy parecida a las células control, lo cual habla de una selección clonal más agresiva dentro del ratón.

La tercera característica interesante que observamos en las clonas antes y después de su paso por los ratones es el comportamiento del ciclo celular. Antes de inyectar las cuatro clonas celulares encontramos diferencias entre todas ellas con respecto a su patrón de proliferación. Cuando se analiza el ciclo celular de las células procedentes de los tumores estas muestran un patrón proliferativo muy similar al de las células control, además es bastante diferente al de las células HeLa transfectadas con *ras* silvestre o mutado antes de pasar por el ratón. El comportamiento del ciclo celular pareciera ser el mismo entre ellas. Este comportamiento similar del ciclo celular de las cuatro clonas procedentes de los tumores, podría respaldar la idea de que el tumor producido por *ras* silvestre pudo haber sido generado por una subpoblación tumorigénica seleccionada dentro de una población más grande no tumorigénica y cuando se inocularon en el ratón generaron un tumor más

pequeño. Podemos decir que este efecto, aunque no es contundente, provoca la supresión importante del crecimiento tumoral y por ende de la tumorigenicidad. Este efecto es adicional al que se produce simplemente con transfectar el vector vacío, y es mucho más evidente si lo comparamos con el crecimiento tumoral de las células HeLa sin transfectar.

Con base a estudios reportados en la literatura proponemos que el efecto de *ras* podría ser por la vía Cdc42-Rac-Rho, pues creemos que la generación de células multinucleadas puede estar siendo activada por Rac ya que se ha visto que cuando se inactiva esta vía, donde Ras se encuentra por arriba de Rac, desaparecen las células multinucleadas (Qiu et al., 1995). La independencia de anclaje podría estar controlada por Ras a través de Cdc42 como lo demostró Qiu en 1995 al transfectar varias líneas celulares con Cdc42 y lograr inducir independencia de anclaje. Sin embargo, aún no es posible explicar porqué las células multinucleadas aparecen en una pequeña fracción poblacional.

Se ha propuesto que Cdc42 podría actuar arriba de Rac y Rho y que podría ser determinante para la transformación maligna generada por Ras ya que en células con *ras* mutado en las que se inhibe Cdc42 con N17-Cdc42 (mutante negativa) se logra suprimir fuertemente el crecimiento con independencia de anclaje.

Tampoco podemos descartar la posibilidad de que la ciclina A este implicada en este fenómeno ya que la capacidad de *ras* para dirigir la expresión de la ciclina A, puede ser crítica para la inducción del crecimiento con independencia de anclaje, aunque las vías de señalización utilizadas por *ras* para inducir la expresión de ciclina A sean desconocidas.

La investigación bibliográfica y los datos presentados en este trabajo parecen indicar que *ras* no es un gen supresor en células HeLa y que solo suprime parcialmente el crecimiento con independencia de anclaje en agar (probablemente porque está sobreexpresado). Tampoco pudimos hacer una correlación clara entre el crecimiento con independencia de anclaje y la tumorigenicidad ya que encontramos una heterogenicidad en los tamaños de colonias donde hay células que tienen una capacidad muy limitada para crecer y otras que forman colonias semejantes a los controles.

Por último, aunque pareciera que todo apunta a que *ras* efectivamente no funciona como antagonista de *ras* mutado, no podremos descartar del todo que no lo sea, ya que

tenemos un problema muy serio en nuestro modelo pues el fondo genético de las células HeLa presenta una serie de inconvenientes para analizar el efecto de *ras* silvestre ya que presenta mutaciones en otros oncogenes, además de tener insertados un par más de oncogenes vírales lo que complica llevar a cabo análisis mas detallados en función de un solo gen si tomar en cuenta el fondo genético de la línea celular.

La expresión de *ras* no es suficiente por si misma para que ocurra una supresión total de la tumorigenicidad. Como sabemos la tranfección con el cromosoma 11 protege *ras* mutado, de esta manera seria lógico que pudiera existir otro gen en la misma región p15.5 del brazo corto del cromosoma 11, donde también se encuentra el gen *ras* , y que probablemente este sea el supresor o que este posible gen coopere activamente con *ras* para llevar a cabo la supresión.

CONCLUSION:

Trabajos anteriores a este, sugieren que *ras* puede funcionar muy bien como supresor de la tumorigenicidad, siempre y cuando se trabaje con modelos en los cuales el fondo genético sea bien conocido, es decir, en modelos que sugieren que solo este gen es el alterado. Si se tienen células transformadas con *ras*, uno puede controlar su tumorigenicidad cuando se les transfecta el gen normal, el cual causa un efecto neutralizante sobre el oncogen dando como resultado la incapacidad celular para generar tumores en ratones atímicos.

Si bien las células HeLa no son un buen modelo para el estudio de Ras en la tumorigenesis ya que la disminución del crecimiento tumoral en ratones atímicos no es contundente como efecto neutralizante que pueda ser ocasionado por el gen *ras* silvestre sobre la aparición de tumores. Hay que considerar que estas células tienen integrado en su genoma la secuencia viral del HPV 18, que las proteínas codificadas por los genes E6 y E7 del virus inactiva a p53 y Rb, respectivamente, 2 proteínas cuya participación en el ciclo celular es muy importante. Así que, no solo se requiere de *ras* para llevar a cabo la supresión total de la tumorigenicidad en células HeLa. Sin embargo, podemos decir que *ras* la suprime parcialmente ya que las células transfectadas con el alelo silvestre presentan alteraciones en ciclo celular y una disminución en crecimiento con independencia de anclaje así como también de la tumorigenicidad. Los resultados son de importancia ya que el potencial uso de *ras* silvestre en terapia génica tendría que darse en fondos genéticos contra oncogénos activos además de *ras*.

BIBLIOGRAFIA:

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

Bogusky, MS. And McCormick, F. 1993. Protein regulating *ras* and its relatives. Nature 366:643-654.

CONCLUSION:

Trabajos anteriores a este, sugieren que *ras* puede funcionar muy bien como supresor de la tumorigenicidad, siempre y cuando se trabaje con modelos en los cuales el fondo genético sea bien conocido, es decir, en modelos que sugieren que solo este gen es el alterado. Si se tienen células transformadas con *ras*, uno puede controlar su tumorigenicidad cuando se les transfecta el gen normal, el cual causa un efecto neutralizante sobre el oncogen dando como resultado la incapacidad celular para generar tumores en ratones atímicos.

Si bien las células HeLa no son un buen modelo para el estudio de Ras en la tumorigenesis ya que la disminución del crecimiento tumoral en ratones atímicos no es contundente como efecto neutralizante que pueda ser ocasionado por el gen *ras* silvestre sobre la aparición de tumores. Hay que considerar que estas células tienen integrado en su genoma la secuencia viral del HPV 18, que las proteínas codificadas por los genes E6 y E7 del virus inactiva a p53 y Rb, respectivamente, 2 proteínas cuya participación en el ciclo celular es muy importante. Así que, no solo se requiere de *ras* para llevar a cabo la supresión total de la tumorigenicidad en células HeLa. Sin embargo, podemos decir que *ras* la suprime parcialmente ya que las células transfectadas con el alelo silvestre presentan alteraciones en ciclo celular y una disminución en crecimiento con independencia de anclaje así como también de la tumorigenicidad. Los resultados son de importancia ya que el potencial uso de *ras* silvestre en terapia génica tendría que darse en fondos genéticos contra oncogénes activos además de *ras*.

BIBLIOGRAFIA:

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

Bogusky, MS. And McCormick, F. 1993. Protein regulating *ras* and its relatives. Nature 366:643-654.

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

Bortner,DM.,Langer,SJ. and Ostrowski, MC. (1993) Non-nuclear oncogenes and the regulation of gene expression in transformed cells. Crit Rev Oncog. 4:137-160.

Bos JL (1989) *ras* oncogenes in human cancer: a review. Cancer Res. 49:4682-92

Boylan JF, Shih TY, Fisher PB, and Zimmer SG (1992) Induction and progression of the transformed phenotype in cloned rat embryo fibroblast cells: studies employing type 5 adenovirus and wild-type and mutant *Ha-ras* oncogenes. Mol Carcinog. 5:118-28

Brown R, Marshall CJ, Pennie SG, and Hall A (1984) Mechanism of activation of an N-*ras* gene in the human fibrosarcoma cell line HT1080. EMBO J. 3: 1321-6

Caamano, J., DiRado, M., Lizasa, T., Momiki, S., Fernandes, E.; Ashendel, C., Noda, M., and Klein, A. (1992) Partial suppression of tumorigenicity in the human lung cancer cell line transfected with K-rev-1. Mol Carcino. 6:252-59

Carlsson, G, Gullberg, B. y Hafstrom, L. (1983) Estimation of liver tumor volume using different formulas, an experiment study in rats. J Cancer Res clin Oncol. 105, 23-23.

Chang EH, Gonda MA, Ellis RW, Scolnick EM, and Lowy DR (1982) Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. Proc Natl Acad Sci. 79:4848-52

Chang, M., Won, S.J., and Liu, H.S. (1997) A ribozyme specifically suppresses transformation and tumorigenicity of *Ha-ras* -oncogene-transformed NIH/3T3 cell lines. J Cancer Res Clin Oncol. 123:91-99

Chant, J. and Stower, G (1995) GTPase cascades choreographing cellular behavior, movement, morphogenesis and more. Cell. 81:1-4

Colburn,N.,Vorder Bruege,J.,Bates,J.,Gray,J.D., Kelsey,W.H. and Shimida,T. (1978) Correlation of anchorage-independente with tumorigenicity of chemically transformed mouse epidermal cells. Cancer Res. 38:624-34

Craig, R. and Sager,R. (1985) Suppression of tumorigenicity in hibrids of normal and oncogene-transformed CHEF cells. Proc Natl Acad Sci. 82:2062-66.

DeFeo D, Gonda MA, Young HA, Chang EH, Lowy DR, Scolnick EM, and Ellis RW (1981) Analysis of two divergent rat genomic clones homologous to the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus. Proc Natl Acad Sci. 78:3328-32

Delgado MD, Quincoces AF, Gomez-Casares MT, Martinez CA, Cuadrado MA, Richard C. and Leon J (1992) Differential expression of *ras* protooncogenes during in vitro differentiation of human erythroleukemia cells. *Cancer Res.* 52:5979

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

Eccleston JF, Moore KJ, Morgan L, Skinner RH, and Lowe PN. (1993) Kinetics of interaction between normal and proline 12 Ras and the GTPase-activating proteins, p120-GAP and neurofibromin. The significance of the intrinsic GTPase rate in determining the transforming ability of *ras*. *J Biol Chem.* 268:27012-9

Egan, SE., Broere, JJ., Jarolim,L.,Wright,JA., and Greenberg,AH. (1989). Co-regulation of metastatic and transforming activity of normal and mutant *ras* genes. *Int J Cancer.* 43:443-48.

Fearon, ER., Antonarakis, SE., Meyers, DH., and Levine MA. (1984) *c-Ha-ras* oncogene lies between B-globin and insuline loci on human chromosome 11p. *Am J Hum Genet.* 36:329-337

Feinleib,J.L. and Krauss R. (1996). Dissociation of *ras* oncogene-induced gene expression and anchorage-independent growth in a series of somatic cell mutants. *Mol Carcino.* 16:139-148

Feng, M., Cabrera, G., Deshane, J., Scanlon, K.J., and Curiel, D.T. (1995) Neoplastic Reversion Accomplished by High efficiency adenoviral-mediated delivery of an anti-*ras* ribozyme. *Cancer Res.* 55:2024-28

Fiorucci G, and Hall A (1988) All three human *ras* genes are expressed in a wide range of tissues. *Biochim Biophys Acta* 950:81-3

Freedman,V.H.and Shin,S.I. (1974) Cellular tumorigenicity in nude mice: Correlation with cell growth in semi-solid medium. *Cell* 3:355-59.

Geiser,A.,Anderson,MJ., and Stanbridge,EJ. (1989) Suppression of tumorigenicity in human cell hybrids derived from cell lines expressing different activated *ras* oncogenes. *Cancer Res.* 49:1572-77.

Gilbert PX, and Harris H. (1988) The role of the *ras* oncogene in the formation of tumours. *J Cell Sci.* 3:433-46

Grand RJ, and Owen D. (1991) The biochemistry of *ras* p21. *Biochem J.* 279:609-31

Griegel S, Traub O, Willecke K, and Schafer R. (1986) Suppression and re-expression of transformed phenotype in hybrids of HA-*ras* -1-transformed rat-1 cells and early-passage rat embryonic fibroblasts. *Int J Cancer.* 38:697-705

Guadano, TM., Othsubo, M., Roberts, JM. and Asoian, RK. (1993) A link between cyclin A expression and adhesion-dependent cell cycle progression. *Science.* 262:1572-75

Hagag N, Diamond L, Palermo R, and Lyubsky S (1990) High expression of *ras* p21 correlates with increased rate of abnormal mitosis in NIH3T3 cells. *Oncogene.* 10:1481-9

Hall A. (1994) biochemical function for *ras* --at last. *Science.* 264:1413-4

Hancock JF, Magee AI, Childs JE, and Marshall CJ (1989) All *ras* proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell.* 57:1167-77

Hofer, F., Fields, S., Schneider, C. and Martin, GS. (1994) Activated *ras* interacts with the raf guanine nucleotide dissociation stimulator. *Proc Natl Acad Sci.* 91:11089-93

Kakkanas, A. and Spandidos, D. (1990) In vitro and in vivo onco-suppressor activity of normal cells on cells transformed with the H-*ras* 1 oncogene. *In vivo* 4:109-114

Kang, JS. y Robert S, and Krauss. (1996). *Ras* induces anchorage-independent growth by suverting multiple adhesion-regulated cell cycle events. *Mol Cell Biol.* 3370-3380.

Kashani-Sabet, M., Funato, T., Florenes, VA., Fodstad, O., and Scanlon, KJ. (1994) Suppression of the neoplastic phenotype in vivo by an anti-*ras* ribozyme. *Cancer Res* 54:900-902.

Kitayama H, Sugimoto Y, Matsuzaki T, Ikawa Y, and Noda M (1989) A *ras* -related gene with transformation suppressor activity. *Cell* 56:77-84

Kitayama H, Matsuzaki T, Ikawa Y, and Noda M (1990) Genetic analysis of the Kirsten-*ras* -revertant 1 gene: potentiation of its tumor suppressor activity by specific point mutations. *Proc Natl Acad Sci.* 11:4284-8

Kozma, R., Ahmed, S., Best, A. and Lim, L. (1995) The *ras* related Cdc42 Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia. *Mol Cell Biol.* 15:1942-52

Kusumaky, N. (1991). Suppression of *ras* transformants. *Cancer Res.* 11:313-320

Leon J, Guerrero I, and Pellicer (1987) A Differential expression of the *ras* gene family in mice. *Mol Cell Biol.* 7:1535-40

Lim,L., Manser,E., Leung,T., and Hall, C. (1996) Regulation of phosphorylation pathways by p21 GTPases: The p21 Ras-related Rho subfamily and its role in phosphorylation signalling pathways. *Eur J Biochem.* 242:171-185

Lowy, DR., and Willumsen, BM. (1993) Function and regulation of *ras* . *Annu Rev Biochem.* 62:851-891.

Maher, J., Baker, DA., Manning, M., Dibb, NJ. and Roberts, IAG. (1985) Evidence for cell-specific differences in transformation by N, H an K *ras* . *Oncogen.* 11:1639-47

Meng-Yao, C., Shen-Jeu, W., and Hsiao-Sheng, L. (1997) A ribozyme specifically suppreses transformation and tumorigenicity of Ha-*ras* oncogene transformed NIH/3T3 cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol.* 123:91-99

Miranda, E.I., Santana, C., Rojas, E., Hernández, S., Ostrosky-Wegman, P., and García-Carrancá, A. (1996) Induced mitotic death of HeLa cells by abnormal expression of c-H-*ras* . *Mutation Res.* 349:173-182.

Nobes, CD. and Hall, A. (1995) Rho, Rac and Cdc42 GTPase regulate the assembly of multimolecular focal complex associated with actin stress fibers, lamellipodia and fillipodia. *Cell* 81: 53-62

Noda, M., Kitayama, H., Matsuzaki, M., Sugimoto, Y., Okayama, R., Bassin, R.H., and Ikawa, Y. (1989) Detection of genes with a potencial for suppressing the transformed phenotype associated with activated *ras* genes. *Proc Natl Acad Sci.* 86:162-66

O'Brien, S.J., Nash, WG., Goodwin, JL, Lowy, DR., and Chang, EH. (1983) Dispersion of the *ras* family of transformed genes to four different chromosomes in man. *Nature* 302:839-842

Ogiso, Y., Sakai, N., Watari, H., Yokahoma, T., and Kuzumaki, N. (1994) Suppression of various human tumor cell lines by a dominant negative H-*ras* mutant. *Gen Ther.* 1:403-407

Paterson,H., Reeves, B., Browns, R., Hall, A., Furth, M., Boss, J., Jones, P., and Marshall, C. (1987) Activated N-*ras* controls the transformed phenotype of HT1080 human fibrosarcoma cells. *Cell* 51:803-12.

Perona, R., Esteve, P., Jimenez, B., Ballestro, RP., Ramon, S. and Lacal JC., (1993) Tumorigenic activity of rho genes from *Aplysia californica*. *Oncogen* 8:1285-92

Pershouse MA, Stubblefield E, Hadi A, Killary AM, Yung WK, and Steck PA (1993) Analysis of the functional role of chromosome 10 loss in human glioblastomas. *Cancer Res.* 53:5043-50

Plattner, R., Anderson, MJ., Sato, KY., Fasching, CL., Der, CJ. and Stanbridge, EJ. (1996) Loss of oncogenic *ras* expression does not correlate with loss of tumorigenicity in human cells. *Proc Natl Acad Sci.* 93:6665-70

Prendergast, GC., Khosravi, PA., Solski, H., Kurzawa, H., Lebowitz, PF. and Der, CJ. (1995) Critical role for Rho in cell transformation by oncogenic *ras*. *Oncogene* 10:2289-96

Qiu, RG., Abo, A., McCormick, F., and Symons M. (1997) Cdc42 regulates anchorage-independent growth and is necessary for *ras* transformation. *Mol Cell Biol.* 17: 3449-58

Qiu, RG., Chen, J. and McCormick, S. (1995) An essential role for rac in *ras* transformation. *Nature* 374:457-59

Ricketts MH, and Levinson AD (1988) High-level expression of c-H-*ras* 1 fails to fully transform rat-1 cells. *Mol Cell Biol.* 4:1460-8

Ridley, AJ. and Hall, A. (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesion in response to growth factors. *Cell.* 70:389-99

Ridley, AJ., Paterson, HF., Jonhston, CL., Diekman, D., and Hall, A. (1992) The small GTP-binding protein rac regulates to growth factor-induced membrane ruffling. *Cell.* 70:401-10

Sandberg AA, and Berger CS (1994) Review of chromosome studies in urological tumors: Cytogenetics and molecular genetics of bladder cancer. *J Urol.* 151:545-60

Saxon, P., Srivatsan, ES. and Stanbridge EJ. (1986) Introduction of human chromosome 11 via microcell transfer controls tumorigenic expression of HeLa cells. *EMBO* 5:3461-66.

Schafer, R., Iyer, J., Iten, E., and Nirkko, AC. (1988) Partial reversion of the transformed phenotype in H-*ras* -transfected tumorigenic cells by transfer of a human gene. *Proc Natl Acad Sci.* 85:1590-94.

Schafer, R. S., Jaya I., Iten, E., Nirkko, A., Balmer J., and Klemenz, R. (1991) Molecular and functional analysis of tumor-suppressor genes by transfection. *Environ Health Persp.* 93:79-82

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

Shimizu K, Goldfarb M, Perucho M, and Wigler M (1983) Isolation and preliminary characterization of the transforming gene of a human neuroblastoma cell line. *PNAS* 80(2):383-7

Shin,S.I.,Freedman,V.H., Riser, R.,and Pollack,R. 1975. Tumorigenicity of virus-transformed cell in nude mice is correlated specifically with anchorage-independent growth in vitro. *Proc Natl Acad Sci.* 72:4435-39.

Shirasawa S, Furuse M, Yokoyama N, and Sasazuki T (1993) Altered growth of human colon cancer cell lines disrupted at activated *Ki-ras*. *Science.* 26:85-8

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

Spandidos, D.A., Frame,M., and Wilkie,N.M. (1990). Expression of the normal *H-ras* 1 gene can suppress the transformed and tumorigenic phenotypes induced by mutant *ras* genes. *Anticancer Res* 10: 1543-54.

Spandidos, A. and Wilkie,N.M. (1988) The normal human *H-ras* 1 gene can act as an oncosuppressor. *Br J Cancer* 58:67-71.

Srivatsan,E.S.,Benedict,W.F.,and Stanbridge,E.J. (1986) Implication of chromosome 11 in the suppression of neoplastic expression in human cells hybrids. *Cancer Res.* 46:6174-79.

Stanbridge, E.J. (1976) Suppression of malignancy in human cells. *Nature.* 260:17-21.

Stenman G, Delorme EO, Lau CC, and Sager R (1987) Transfection with plasmid pSV2gptEJ induces chromosome rearrangements in CHEF cells. *Proc Natl Acad Sci.* 84:184-8

Su, ZZ., Austin, V., Zimmer, G., and Fisher, P. (1993) Defining the critical gene expression changes associated with expression and suppression of the tumorigenic and metastatic phenotype in *Ha-ras* transformed cloned rat embryo fibroblast cell. *Oncogene* 8:1211-19

Toksoz D, Farr CJ, and Marshall CJ (1989) Ras genes and acute myeloid leukaemia. *Br J Hematol.* 71:1-6

Tolsma, SS., Cohen, J., Ehrlich, L., and Bouck, N. (1993) Transformation of NIH/3T3 to anchorage independence by H-ras is accompanied by loss of suppressor activity. *Experim Cell Res* 205:232-39.

Tsuda, T., Marinetti, MR., Masuelli, L. and Cutler, M. (1995) The *ras* suppressor RSU-1 localizes to 10p13 and its expression in the U251 glioblastoma cell lines correlates with a decrease in growth rate and tumorigenic potential. *Oncogene* 11:397-403

Yamada, T., Doi, R. and Yamada H. (1996) Normal and transforming *ras* are differently regulated for posttranslational modifications. *J Cell Biochem* 61:172-181

Willumsen, BM., Christensen, A., Hubbert NL, Papageorge AG, and Lowy DR (1984) The p21 *ras* C-terminus is required for transformation and membrane association. *Nature*. 310:583-6

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

Zhang, K., Noda, M., Vass, WC., Papageorge, AG., and Lowy, DR. (1990) Identification of small clusters of divergent amino acids that mediate the opposing effects of *ras* and Krev-1. *Science*. 249:162-5