



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

“GTPasas RhoA, Rac1 y Cdc42 y los GEFs
**Tiam1 y β Pix en el desarrollo de
cáncer cervicouterino”**

T E S I S

para obtener el grado de

Maestría en Ciencias Biomédicas

P R E S E N T A:

Q.B.P. MIGUEL ANGEL MENDOZA CATALÁN

DIRECTOR DE TESIS:

DR. EDUARDO CASTAÑEDA SAUCEDO

Chilpancingo, Guerrero. Septiembre de 2009.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

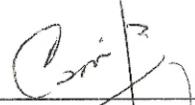
APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 10 días del mes de julio de dos mil nueve, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "GTPasas RhoA, Rac1 y Cdc42 y los GEFs Tiam-1 y β -pix en el desarrollo de cáncer cervicouterino", presentada por el alumno Miguel Ángel Mendoza Catalán, para obtener el Grado de **Maestría en Ciencias Biomédicas**. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial



 Dr. Eduardo Castañeda Saucedo
 Dirección de tesis



 Dra. Luz del Carmen Alareón Romero



 Dra. Berenice Illades Aguiar



 Dr. Donaciano Flores Robles



 Dr. Patricio Gariglio Vidal

Vo. Bo



 Dra. Berenice Illades Aguiar
 Coordinadora de la Maestría en Ciencias Biomédicas



 Dr. Alfonso Bernabé Carreño
 Director de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Celular del Cáncer de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero en Chilpancingo Guerrero.

Bajo la dirección de:

Dr. Eduardo Castañeda Saucedo y

la asesoría de:

Dra. Berenice Illades Aguiar

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

Dr. Donaciano Flores Robles

Dr. Patricio Gariglio Vidal

Con la colaboración de:

Área de patología del Hospital General Regional “Vicente Guerrero”
del IMSS en Acapulco, Guerrero;

Dra. Laura Sierra López

Dr. José Francisco Coppe

Esta investigación se desarrolló con financiamiento otorgado por el proyecto de repatriación del Dr. Eduardo Castañeda Saucedo (**CONACYT** MOD-ORD-12-08 PCI-155-04-08).

Durante el período en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, el C. Miguel Ángel Mendoza Catalán, recibió beca del **CONACYT**. Además, recibió apoyo de la beca de movilidad estudiantil del banco Santander durante el periodo Febrero-Junio de 2009.

AGRADECIMIENTOS

*A **Dios**, porque todo lo que soy y todo lo que tengo se lo debo a Él.*

Sal. 62:7

*Al **Dr. Eduardo Castañeda Saucedo**; por su tan acertada dirección en este trabajo, por el tiempo invertido, por su apoyo académico y moral, por la confianza y amistad brindada y por ser un ejemplo a seguir en el mundo de la investigación y superación personal. ¡¡Mucho éxito en los próximos proyectos!!*

*A la **Dra. Berenice Illades Aguiar**, por su apoyo en la realización de este proyecto, por el tiempo tan grato de conocerla y su constante preocupación por mejorar el trabajo que se esté realizando. He aprendido mucho de usted.*

*A la **Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero**, y al **Dr. Donaciano Flores Robles** por su disposición de ayudarme y sus valiosas sugerencias en la mejora de este trabajo.*

*Al **Dr. Patricio Gariglio Vidal**, por abrirme las puertas de su laboratorio en el departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV en el D.F. y por sus valiosas aportaciones. A "**Wilox**" (Rodolfo Ocadiz), **Elizabeth** y **Enrique** por su gran apoyo y consejos que ayudaron a sacarle más provecho a esta investigación.*

*Al **Dr. Luis Jave** y la **Dra. Adriana Aguilar** por abrirme las puertas de su laboratorio en la División de Inmunología del Centro de Investigación Biomédica de Occidente en Guadalajara Jalisco. A la **Dra. Naela** por su valioso apoyo y el tiempo brindado en la realización de los WB, eres una excelente maestra.*

*A la **QBP. Gema Rosa Cristobal Mondragón**, Y al **QBP Jesús Adame Gómez** por su apoyo técnico y labor fundamental en este proyecto. Mucho éxito en lo que emprendan.*

*A mis amigos: **Adriana, Mirna, Luz y Lucio** por que demostraron ser realmente eso... **Amigos** y eso es algo que en verdad se aprecia y queda en la memoria... aún*

con Alzheimer. Gracias por su generoso esfuerzo de compartir conmigo el verdadero sentido de la amistad.

A los compañeros de la **Maestría en Ciencias Biomédicas**, Julio, Daniel, Jazmín, Yazmín, Jorge, América, Luilli, Nancy, Kimberli (tantos años), Arianna y Alinne; fue grato navegar con ustedes en este barco. ¡Éxito en lo que sigue!

DEDICATORIAS

A **Dios**, mi Señor y Salvador por su gracia y misericordia para mí. Por ser la luz que brilla en los momentos de oscuridad, por que ha sido mi refugio y amigo fiel en cualquier situación. Por el privilegio de conocerle y tener a esta familia de la cual disfruto, por ser la fuente principal de todos mis triunfos y alegrías... y por la esperanza que me otorga día con día...

A **mis padres, José Mendoza Oseguera y Emelia Catalán Maldonado**, por ser la constante fuente de inspiración de mi esfuerzo. Sus consejos, su ejemplo y su cariño son la base de este triunfo. Gracias por esta vida juntos, ustedes son los responsables de todos mis logros... **NUESTROS LOGROS**. Gracias, mi formación y vida profesional es sólo una consecuencia de su apoyo y amor incondicional. Ustedes son un ejemplo de vida, esfuerzo y dedicación, **LOS QUIERO** de tal forma que no hay palabras que lo expresen acertadamente. Dios los bendiga hoy y siempre. Una vez más... lo logramos.

A **mis hermanos... Cecy, Sandy y José**; por todos los momentos que hemos pasado juntos, sean buenos o malos, siempre he tenido algo que aprender de ustedes, son realmente importantes para mí, gracias por todo su apoyo, gracias simplemente por ser mis hermanos, son una bendición para mí. Los quiero mucho.

A la mejor amiga que he conocido... **Donajii**; por tu amistad persistente en tanto tiempo, por el cariño que me regalas y por la satisfacción de compartir tantos momentos y recuerdos contigo. Te quiero mucho.

A todos aquellos que de una u otra forma han sido parte de mi vida y que me lleva a lo que ahora puedo ser. Gracias.

INDICE

I. Resumen	1
II. Abstract	2
III. Introducción	3
IV. Material y métodos	7
V. Resultados	9
VI. Discusión y conclusiones	18
VII. Referencias	22
VIII. Anexos	25

I. Resumen

El cáncer cérvico uterino (CaCU) es un problema de salud muy importante y una de las principales causas de mortalidad en México y en particular en algunos estados con altos índices de marginación, entre ellos el estado de Guerrero. Las GTPasas Rho funcionan como interruptores moleculares que fluctúan entre la forma inactiva (unidas a GDP) y la forma activa (unidas a GTP). Participan en una gran variedad de eventos celulares incluyendo la regulación del tamaño celular, proliferación, apoptosis/sobrevivencia, citoarquitectura, polaridad, adhesión celular y tráfico de membrana. La expresión de algunas GTPasas de la familia Rho y algunos de sus activadores se encuentra desregulada en algunos tipos de cáncer, tales como el de mama, el cáncer gástrico, y el carcinoma de colon, entre otros. El objetivo de este estudio fue evaluar cambios en la expresión de las GTPasas RhoA, Rac1 y Cdc42 y los GEFs Tiam y β Pix en el desarrollo del CaCU. Se utilizaron biopsias de tejido sano, lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (LEIBG), lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (LEIAG) y CaCU incluidas en parafina. La detección de las GTPasas y los GEFs se llevó a cabo mediante inmunohistoquímica. Encontramos una asociación estadísticamente significativa entre el aumento en la intensidad de Rac1 y Tiam1 en el epitelio cervical y la presencia de LEIBG y LEIAG, así como una asociación significativa entre el aumento en la intensidad de RhoA y β Pix con LEIAG. No encontramos ninguna asociación entre la intensidad de Cdc42 y la presencia de LEIBG, LEIAG o CaCU. En tejido sano, Rac1, Cdc42, RhoA, Tiam1 y β Pix se expresan en las células intermedias y superficiales del epitelio, pero no se expresan en células basales; en LEIBG y LEIAG estas proteínas se expresan en todos los estratos del epitelio cervical. Además, encontramos que el 70% de las LEIBG presentaron señal nuclear de Rac1, la cual se asocia con la presencia de VPH de alto riesgo, mientras que todas las muestras de tejido sano fueron negativas a la señal nuclear de Rac1. Ensayos preliminares en células HeLa y ratones hembra muestran que el tratamiento con estrógenos induce la translocación nuclear de Rac1. En conjunto, nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de Rac1, RhoA, Tiam1 y β Pix, así como la translocación nuclear de Rac1 en células epiteliales cervicales podrían jugar un papel importante en la progresión del CaCU.

Palabras clave: Cáncer cervicouterino, VPH, GTPasas Rho, Tiam1, Rac1.

II. Abstract

Cervical cancer is an important health problem and one of the major causes of mortality in Mexico particularly in some states with high rates of exclusion, including the state of Guerrero. Fortunately, advances in molecular oncology have improved our understanding of the molecular basis of this disease and the development of better diagnostic strategies and treatments. Rho GTPases are proteins that cycle between an active GTP-bound and an inactive GDP-bound state. They participate in the regulation of a great variety of cellular events including the control of cellular size, proliferation, apoptosis, polarity, adhesion, and membrane traffic. The expression of Rho GTPases and their activators (GEFs) is deregulated in some types of cancer such as breast, gastric, and colon carcinoma. The aim of this study was to evaluate changes in the expression of the GTPases Rac1, RhoA and Cdc42 and the GEFs Tiam1 and β Pix, during cervical cancer progression. Using immunohistochemistry on paraffin-embedded cervical biopsies, we found a strong significant association between increase in the intensity of Rac1, Tiam1 and Cdc42 and the presence of low-grade (LSIL) and high-grade (HSIL) squamous intraepithelial lesions, as well as a significant association between increase in RhoA and β Pix intensity and the presence of HSIL. In healthy cervical epithelial, Rac1, Cdc42, RhoA, Tiam1 and β Pix signal was absent in basal cells, whereas basal cells were positive in LSIL and HSIL. We also found a strong correlation between the presence of Rac1 staining in the nucleus of epithelial cells and the presence of LSIL and HSIL. All healthy tissue samples were negative for Rac1 nuclear signal, whereas 70% of the LSIL presented nuclear signal and this was associated with the presence of High-risk HPV. Preliminary studies using HeLa cells and female mice suggest that estrogen (17β e) treatment induces nuclear translocation of Rac1. All together, our results suggest that overexpression of Rac1, RhoA, Tiam1 and β Pix, as well as the nuclear translocation of Rac1 in cervical epithelial cells may play an important role in the progression of cervical cancer.

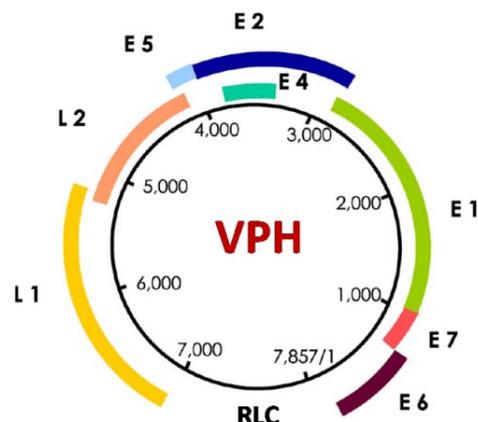
Keywords: Cervical cancer, HPV, Rho GTPases, Rac1, Tiam1.

III. Introducción

El cáncer cérvico uterino (CaCU) es el segundo cáncer más común entre las mujeres de todo el mundo y contribuye en 9.8% de todos los tipos de cáncer en mujeres. En México, esta patología es un problema de salud muy importante y una de las principales causas de mortalidad. Según el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), tan sólo en el año 2003, se presentó una tasa de mortalidad por tumores malignos del cuello del útero de 8.3 muertes por cada 100,000 mujeres afectadas¹. Guerrero es uno de los estados con los índices más altos de mujeres sin acceso a los servicios de salud (47.7%), lo cual se ve reflejado en una elevada tasa de mortalidad por CaCU, la cual fue de 10.3 casos por cada 100,000 mujeres afectadas en el año 2007^{2,3}.

Estudios epidemiológicos han establecido a la infección persistente por virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) como la causa central del desarrollo del CaCU y sus lesiones precursoras. Se han identificado más de 100 tipos de VPH, de los cuales 40 afectan el tracto genital y de estos, 15 son oncogénicos. Los papilomavirus oncogénicos de alto riesgo más comunes son, en orden descendente de frecuencia: VPH-16, 18, 31, 33, y los de bajo riesgo asociados con lesiones benignas: 6, 11 y 13⁴⁻⁷. Los papilomavirus son virus pequeños de aproximadamente 55nm de diámetro, poseen un genoma de ADN circular con una longitud de aproximadamente 8,000pb que codifica para dos proteínas estructurales (L1 y L2) y al menos otras seis llamadas proteínas tempranas o no estructurales (E1, E2, E4-E7), además de una región reguladora río arriba de aproximadamente 1,000pb (Figura 1)^{4,5}.

Figura 1. **Genoma del VPH.** Se muestra el arreglo de los genes no estructurales (E), los genes de la cápside (L1 y L2) y la región larga de control (RLC)⁶.



La capacidad oncogénica de los VPH se atribuye principalmente a dos de sus proteínas no estructurales: E6 y E7. Estas proteínas se asocian con reguladores del ciclo celular y estimulan la proliferación celular⁸. La proteína E7 se une a pRb, un regulador clave del ciclo celular, y esta interacción libera al factor de transcripción E2F, favoreciendo la entrada a la fase de replicación del ADN. Además, E7 puede inhibir a otras proteínas involucradas en la proliferación celular incluyendo desacetilasas de histonas, componentes del complejo de transcripción AP-1 y los inhibidores p21 y p27⁹. La proteína E6 complementa el papel de E7 a través de la degradación de p53. La inactivación de p53 por E6 ocurre a través del reclutamiento de la ubiquitina ligasa celular E6AP, el complejo E6/E6AP se une a p53 facilitando su poliubiquitinación y degradación proteosomal, lo cual previene la inducción de apoptosis en respuesta a daños en el ADN. La proteína E6 también puede inactivar a otras proteínas pro-apoptóticas incluyendo Bax y Bak^{8,9}.

En el extremo C-terminal de E6 se ha identificado una región altamente conservada entre los VPH-AR, la cual es necesaria para su actividad oncogénica¹⁰. Esta región contiene varios dominios de interacción proteína/proteína, entre los que se incluye un dominio de unión a proteínas con dominios PDZ. Un estudio reciente sugiere que los VPH de humanos y de primates utilizan la interacción con dominios PDZ como un mecanismo conservado para interferir con la función de proteínas que participan en la regulación de la polaridad celular¹¹. Se ha encontrado que la interacción de E6 con algunas proteínas con dominio PDZ puede llevar a la degradación de estas proteínas y favorecer el proceso tumorigénico^{10,12,13}. De manera interesante, un gran número de factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GTP exchange factors: GEFs), proteínas que actúan como activadores de GTPasas de la familia Rho y que están implicados en la regulación de la polaridad celular, poseen dominios PDZ^{14,15}. Esto sugiere que la oncoproteína E6 podría interferir con la función reguladora de las GTPasas Rho mediante la degradación de sus GEFs.

La familia de GTPasas Rho constituye un grupo numeroso dentro de la superfamilia de proteínas Ras. Actualmente se conocen más de una docena de miembros de esta familia en mamíferos, los cuales, en función de homologías estructurales se

clasifican en cinco subfamilias: RhoBTB, Rac, Cdc42, Rho y Rnd-Miro. De éstas, las subfamilias Rac, Cdc42 y Rho son las mejor caracterizadas estructural y funcionalmente¹⁶. Estas proteínas funcionan como interruptores moleculares que fluctúan entre la forma inactiva (unidas a GDP) y la forma activa (unidas a GTP). El intercambio entre las formas activa e inactiva de las GTPasas es regulado por tres familias de proteínas, los activadores o factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GTP exchange factors: GEFs) y dos familias de supresores, las proteínas activadoras de GTPasas (GTPase activating proteins: GAPs) y los inhibidores de disociación de nucleótidos de guanina (GDP dissociation inhibitors: GDIs)^{17,18}. Las GAPs potencian la actividad intrínseca de las GTPasas, hidrolizando el GTP a GDP, lo cual resulta en la inactivación de la GTPasa, mientras que los GEFs catalizan la disociación del GDP de la GTPasa, dando como resultado una forma libre de nucleótido que posteriormente puede incorporar el GTP resultando en la GTPasa activa¹⁵. Los GDIs interaccionan con las formas inactivas de las GTPasas secuestrándolas en el citoplasma e inhibiendo su activación. Además los GDIs están implicados en la localización (citoplasma/membrana) de las GTPasas y la selección de sus efectores (Figura 2)¹⁹.

La forma activa de las GTPasas puede asociarse y formar complejos con una diversidad de moléculas efectoras en el citoplasma, desencadenando cascadas de señalización intracelular que resultan en modificaciones de la expresión génica¹⁷. Las GTPasas Rho participan en una gran variedad de eventos celulares incluyendo la regulación del tamaño de la célula, proliferación, apoptosis/sobrevivencia, citoarquitectura, polaridad, adhesión celular y tráfico de membrana²⁰.

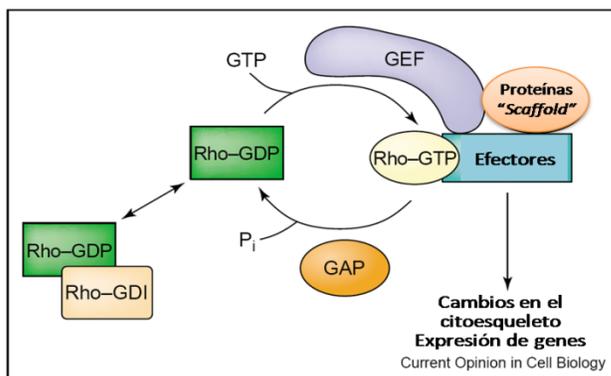


Figura 2. **Ciclo de las GTPasas Rho.** Las transiciones de los estados activo/inactivo son controladas por GEFs, GAPs y GDIs¹⁸.

El amplio espectro de funciones reguladas por los miembros de la familia de GTPasas Rho explica que la alteración funcional de estas proteínas esté relacionada con el desarrollo de procesos patológicos, como son algunas enfermedades neurológicas, inmunitarias o cáncer^{16,21,22}. Algunos estudios utilizando modelos animales han demostrado la importancia de estas proteínas en el desarrollo de neoplasias^{18,23}. Además, se ha observado que la expresión de GTPasas Rho y algunos de sus GEFs se encuentra desregulada en una gran variedad de tumores humanos. La sobreexpresión de las GTPasas en tumores humanos está correlacionada con el grado de progresión de la enfermedad, siendo las lesiones más avanzadas y agresivas las que presentan niveles más altos de expresión^{20,24}. Se ha encontrado que algunas isoformas de Rho se encuentran sobreexpresadas en cáncer de mama y que dicha sobreexpresión está correlacionada con el desarrollo de metástasis²⁵⁻²⁹. En cáncer gástrico, se observó un aumento en la expresión de Rac1 y una disminución de Tiam1³⁰. En carcinoma de colon, se ha demostrado que la sobreexpresión de Tiam1 está asociada al potencial maligno de los tumores³¹. En estudios en retinoblastoma, se encontró sobreexpresión de Tiam1 y disminución de Rac1 y Cdc42³². En adenocarcinoma colorectal, se observó que la sobreexpresión de Rac1 acelera el proceso tumorigénico y que su inhibición suprime completamente la formación de tumores, sugiriendo que Rac1 tiene un papel importante en el progreso de esta patología³³. En carcinoma hepatocelular, el aumento en la expresión de RhoA se asocia con invasión venosa y diferenciación celular, y esta sobreexpresión indica pobre pronóstico en estos pacientes³⁴.

Sin embargo, hasta la fecha no existen estudios que demuestren la participación de las GTPasas de la familia Rho en el desarrollo de CaCU. El objetivo de este estudio fue evaluar cambios en la expresión de las GTPasas RhoA, Rac1 y Cdc42 y los GEFs Tiam1 y β Pix durante el desarrollo del CaCU. El estudio de las alteraciones en la expresión de GTPasas de la familia Rho y sus GEFs en mujeres con lesiones premalignas o CaCU, permitirá identificar proteínas de esta vía de señalización que puedan servir como biomarcadores o blancos terapéuticos para esta patología.

III. Material y métodos

Se realizó un estudio transversal comparativo durante el periodo junio 2008-julio 2009. Se incluyeron 104 biopsias de tejido cervical incluidas en parafina con diagnóstico histopatológico confirmado de tejido sano, lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LEIBG), lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LEIAG) y CaCU. Las muestras fueron obtenidas en el Hospital General Regional (HGR) “Vicente Guerrero” del IMSS en Acapulco, Gro. durante el periodo de estudio. Se eliminaron del estudio las muestras cuya integridad del tejido no permitía un análisis adecuado (tejidos incompletos, ausencia de lesión).

Las muestras se etiquetaron con una clave que incluye sólo un folio y la fecha de recolección de la muestra, manteniendo confidencial la identidad de las pacientes. El material de desecho utilizado durante la prueba (guantes, puntas, pipetas desechables, geles y demás), así como el material biológico fueron tratados y desechados de acuerdo a la norma NOM-087-ECOL-2002 en contenedores para Residuos Peligrosos Biológicos Infecciosos (RPBI) de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas.

Materiales. Para detectar la expresión de las GTPasas RhoA, Rac1 y Cdc42 y de los GEFs β Pix y Tiam1 en biopsias cervicales se utilizaron anticuerpos primarios policlonales: anti-RhoA (C-15): sc-32039 dilución 1:50; anti-Rac1 (C-14): sc-217 dilución 1:25; anti-Cdc42 (B-8): sc-840 dilución 1:50; anti- β Pix (C-19): sc-10932 dilución 1:50; y anti-Tiam1 (C-16): sc-872 dilución 1:200 (Santa Cruz Biotechnology, USA). Para revelar la reacción se utilizó el kit *Mouse/Rabbit Immunodetector HRPw/DAB* (Bio SB-USA).

Inmunohistoquímica (IHQ). Se realizaron cortes histológicos de 3 μ m, posteriormente fueron desparafinados y rehidratados. Se realizó recuperación antigénica a base de citrato de sodio, utilizando la vaporera *Exotic* de *Moulinex* durante 10 minutos a una temperatura máxima de 95°C. Se inactivo la peroxidasa endógena agregando peróxido de hidrógeno al 3%, se realizó el bloqueo de uniones inespecíficas con PBS + 1% de BSA y se incubó con el anticuerpo primario durante 1

hora a temperatura ambiente. Para revelar la reacción se utilizó el sistema de detección Mouse/Rabbit Immunodetector HRPw/DAB de *Bio SB*, se realizó la contratinción con Hematoxilina de Harris y después de deshidratar el tejido, se dio lugar al montaje con el medio de montaje rápido para microscopía *Entellan®* de *Merck*. Finalmente, se visualizó la señal en un microscopio de luz visible. Como control positivo se utilizaron cortes de biopsias de cáncer de mama invasor y como control negativo se utilizó un corte en el cual se omitió el anticuerpo primario. Para evaluar la expresión de las proteínas estudiadas se tomó en cuenta su localización en el epitelio (tercio inferior o medio y superior), porcentaje de células positivas y la intensidad de la reacción (0: negativo, 1+: baja intensidad, 2+: intensidad media, 3+: alta intensidad).

Hibridación *in situ*. Se realizó utilizando el sistema de detección GenPoint de DaKo Cytomation (Carpinteria, CA), el cual contiene una sonda dirigida a VPH-AR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68). El resultado de la prueba fue proporcionado por el Laboratorio de Investigación en Citopatología de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la UAG.

Análisis estadístico.

Para la captura de información de las distintas variables se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 12.0. Para la descripción de los datos utilizamos medidas de tendencia central, frecuencias absolutas y relativas, así como prueba exacta de Fisher para determinar diferencias entre los grupos. Se realizó un análisis de correlación para conocer la relación entre la intensidad de la expresión de las proteínas y el grado de lesión cervical, de igual forma la relación entre la localización de la expresión y el grado de lesión se determinó utilizando coeficiente de correlación de contingencia. Para medir la fuerza de asociación entre estas variables, se obtuvieron razones de momios (OR por sus siglas en inglés) mediante un modelo de regresión logística. El modelo de regresión se ajustó por edad y por la presencia de VPH de alto riesgo para la obtención de los ORs ajustados. El análisis estadístico se llevó a cabo con el paquete estadístico STATA versión 9.2.

IV. Resultados

Población de estudio

Se estudiaron 104 biopsias cervicales incluidas en parafina, con diagnóstico histopatológico confirmado de epitelio sano (13), LEIBG (48), LEIAG (35) y CaCU (8) (Cuadro 1). Las muestras fueron proporcionadas por el departamento de patología del Hospital General Regional “Vicente Guerrero” del IMSS en Acapulco, Gro. y corresponden a mujeres que acudieron a la toma de biopsia durante el periodo comprendido entre julio 2008-junio 2009. La media de edad de las pacientes es de 39.72 con una desviación estándar de 12.63 (Cuadro 1).

Cuadro 1. Distribución de casos por grupo de edad

Edad	Sanas n (%)	LEIBG n (%)	LEIAG n (%)	CaCU n (%)	Total n (%)
20-30	0 (0)	16 (33.3)	10 (28.6)	0 (0)	26 (25)
31-40	3 (23.1)	16 (33.3)	17 (48.6)	2 (25)	38 (36.5)
41-50	7 (53.8)	12 (25)	4 (11.4)	0 (0)	23 (22.1)
51 o más	3 (23.1)	4 (8.4)	4 (11.4)	6 (75)	17 (16.4)
Total	13 (12.5)	48 (46.2)	35 (33.6)	8 (7.7)	104

Expresión de Rac1, RhoA, Cdc42, Tiam1 y β Pix en epitelio cervical sano, LEIBG, LEIAG y CaCU.

Para determinar el patrón de expresión de las GTPasas Rac1, RhoA, Cdc42 y los GEFS Tiam1 y β Pix en biopsias de epitelio cervical sano, LEIBG, LEIAG y CaCU, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica y se evaluó la localización de estas proteínas en los diferentes estratos del epitelio cervical. Se encontró que, en el epitelio cervical sano, Rac1, RhoA, Cdc42, Tiam1 y β Pix se expresan en la capa intermedia y superficial del epitelio, pero no en las células de la capa basal. En contraste, en la mayoría de las LEIBG y LEIAG la expresión de estas proteínas se extiende a todo el epitelio, incluyendo las células basales, mientras que en muestras de CaCU se observó señal positiva en todas las células invasoras (Figuras 3 y 4).

En todas las biopsias de tejido cervical sano, la expresión de Rac1, RhoA y Tiam1 se observó en los tercios medio y superficial del epitelio, pero estuvo ausente en la capa

basal. Este mismo patrón se observó para Cdc42 y β Pix en el 75% y 77% de las muestras de tejido sano, respectivamente. Por otro lado, en más del 90% de las muestras de LEIBG la señal de Rac1, Cdc42 y Tiam1 se observó en todo el espesor del epitelio, incluyendo las células basales. De manera similar, el 80% de las LEIBG mostraron señal en todo el epitelio para RhoA y β Pix. Así mismo, en LEIAG la expresión de RhoA, Cdc42, Tiam1 y β Pix se observó en todo el epitelio en más del 90% de las muestras, mientras que en menos del 10% de las mismas se observó señal negativa en la capa basal para Rac1. En el 100% de las muestras de cáncer se observó señal positiva de Rac1, RhoA, Cdc42, Tiam1 y β Pix en todas las células invasoras (cuadro 2).

Con la finalidad de determinar la asociación existente entre el patrón de expresión de las GTPasas y los GEFs y el diagnóstico histopatológico, se realizó un análisis estadístico bivariado y multivariado. Todas las proteínas estudiadas presentan una fuerte asociación estadísticamente significativa entre la señal positiva en las células basales y la presencia de LEIBG o LEIAG. Rac1, Cdc42 y Tiam1 muestran una asociación más importante con LEIBG ($p < 0.05$), mientras que la localización de RhoA y β Pix se asocia más fuertemente con LEIAG (Cuadro 2).

Al evaluar la intensidad de la señal de las diferentes GTPasas y los GEFs, se encontró que en más del 65% de las muestras de tejido sano se observó una señal débil para las tres GTPasas y los GEFs, el resto de las muestras (<20%) presentó una intensidad de moderada a fuerte. En contraste, en LEIBG, se observó una señal débil para Rac1 en el 14.3% de los casos y una señal de moderada a fuerte en el 85.7% de los mismos. De manera similar, el 77.8% de las LEIAG presentó una señal de moderada a fuerte y en el resto (<25%) señal débil. Tiam1 se expresó con intensidad moderada o fuerte en el 93.3% y 82.8% de LEIBG y LEIAG respectivamente. La intensidad de la señal para RhoA y β Pix fue de moderada a fuerte en el 50% y 37.5% de LEIBG respectivamente y cerca del 60% de LEIAG muestran señal moderada a fuerte de ambas proteínas. La señal de Cdc42 se observó de moderada a fuerte en el 50% de las LEIBG y LEIAG. En CaCU, Rac1 se expresó con intensidad moderada a fuerte en el 100% de los casos, de forma similar

Tiam1 en el 71.4% de los mismos. La expresión de RhoA y Cdc42 fue débil en más del 80% de estas muestras y β Pix en más del 60% de las mismas (Cuadro 3).

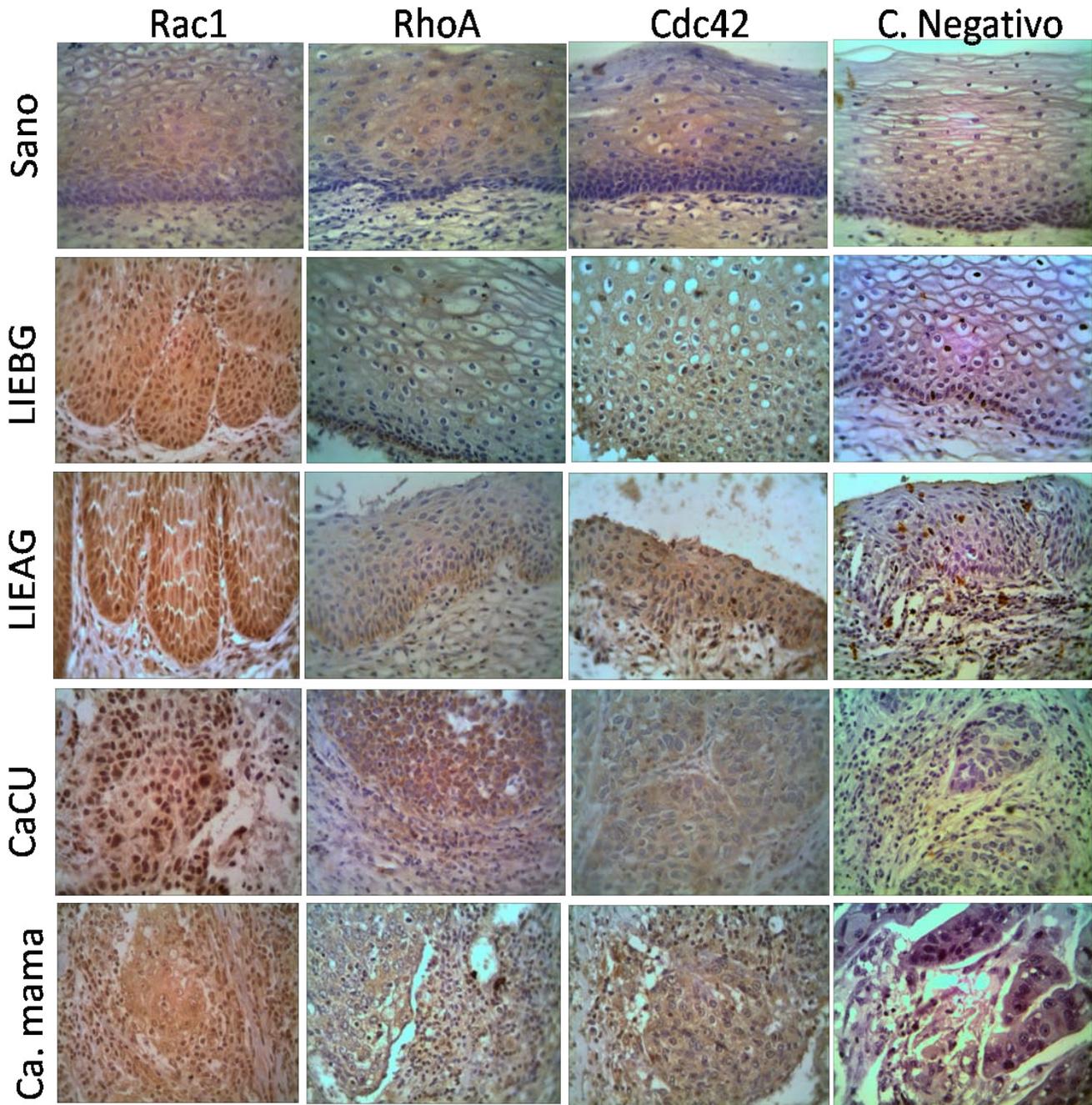


Figura 3. Detección de GTPasas Rac1, RhoA y Cdc42 en epitelio cervical normal (Negativo a VPH-AR), LEIBG, LEIAG y cáncer cervical invasor (positivo a VPH-AR). Cáncer de mama como control positivo. Control negativo: ausencia de anticuerpo primario (40X). Señal positiva color café o rojizo.

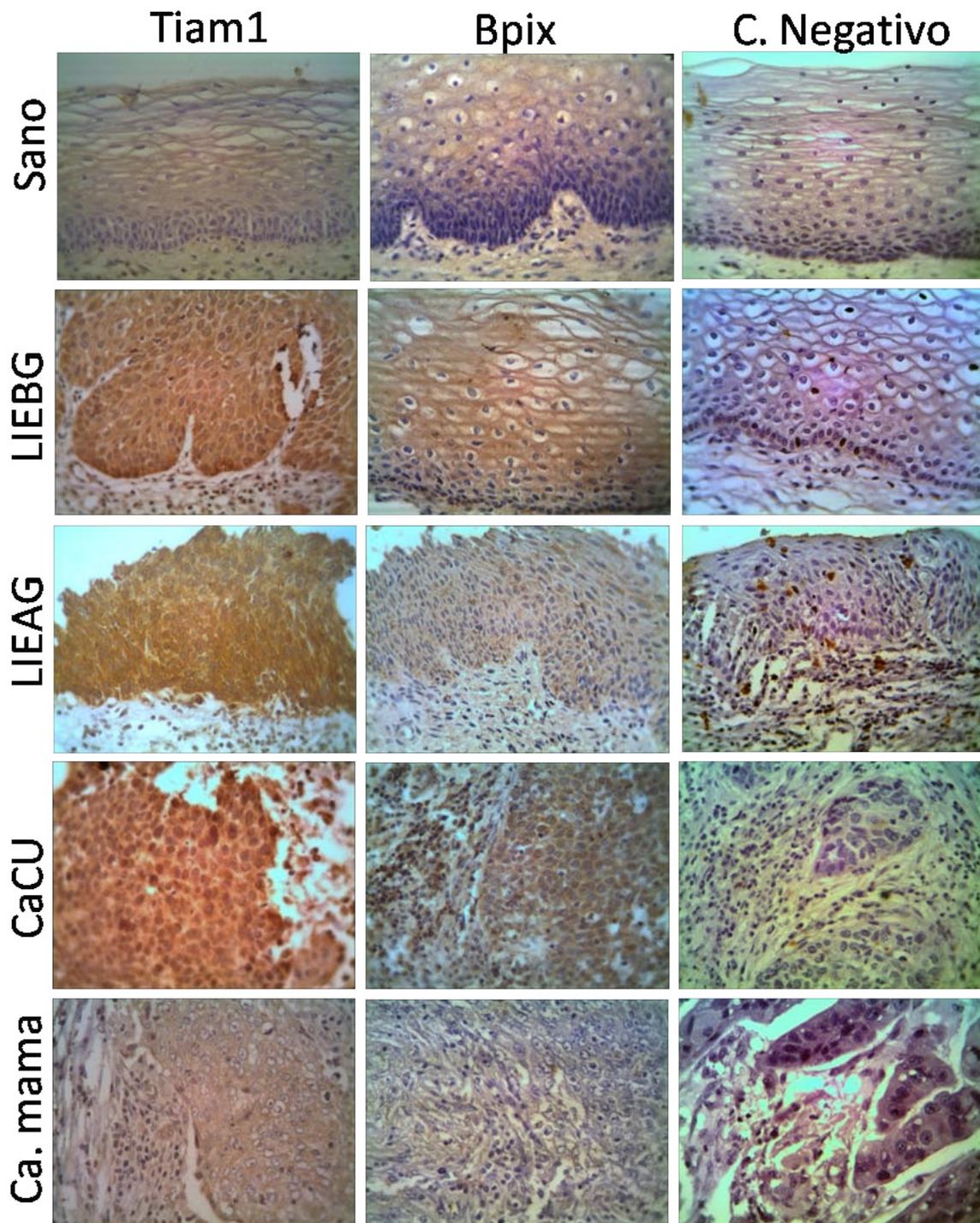


Figura 4. Detección de GEFs Tiam1 y β Pix en epitelio cervical normal (Negativo a VPH-AR), LEIBG, LEIAG y cáncer cervical invasor (positivo a VPH-AR). Cáncer de mama como control positivo. Control negativo: ausencia de anticuerpo primario (40X). Señal positiva color café o rojizo.

El análisis estadístico muestra que existe una asociación significativa muy fuerte entre la intensidad de la señal de Rac1 y las LEIBG (OR=15) y LEIAG (OR=9). De igual manera, se observó una asociación muy fuerte entre la señal de Tiam1 y las LEIBG (OR=40.24) y LEIAG (OR=15.1). RhoA y β Pix presentaron asociación con LEIAG con un OR de 10.3 y 26.2 respectivamente ($p < 0.05$). La intensidad de Cdc42 no se asoció con la presencia de lesiones cervicales (Cuadro 3).

Al realizar un análisis de correlación entre la expresión de las GTPasas y los GEFs, y la presencia de VPH de alto riesgo, se encontró que la expresión de Rac1, Cdc42, RhoA, Tiam1 y β Pix en la capa basal del epitelio se asocia de forma significativa a la presencia de VPH de alto riesgo. En cuanto a la intensidad de la expresión, sólo se encontró asociación entre la expresión de Tiam1 y Rac1 y la presencia de VPH de alto riesgo (Anexo 2).

Cuadro 2. Localización tisular de Rac1, RhoA, Cdc42, Tiam1 y β Pix y su asociación con el diagnóstico histopatológico.

Tercios epiteliales	Sano n (%)	LEIBG n (%)	OR ^a (IC 95%)	OR ^b (IC 95%)	p	LEIAG n (%)	OR ^a (IC 95%)	OR ^b (IC 95%)	p
Rac1 (n=80)									
Capa basal -	12 (100)	3 (8.6)	1.0	1.0		3 (11.1)	1.0	1.0	
Capa basal +	0 (0)	32 (91.4)	128 (12.1-∞)	123 (10-∞)	<0.001	24 (88.9)	96 (9.0-∞)	94 (8.4-∞)	<0.001
Cdc42 (n=101)									
Capa basal -	9 (75)	1 (2.2)	1.0	1.0		1 (3.2)	1.0	1.0	
Capa basal +	3 (5)	48 (97.8)	144 (13.4-1544)	71 (4.2-1203)	0.003	30 (96.8)	90 (8.3-974)	50 (2.8-910)	0.008
RhoA (n=103)									
Capa basal -	12 (100)	7 (14.6)	1.0	1.0		0 (0)	1.0	1.0	
Capa basal +	0 (0)	41 (85.4)	70 (7.9-∞)	64.7 (6.2-∞)	<0.001	36 (100)	432 (25-∞)	459 (24.4-∞)	<0.001
Tiam1 (n=86)									
Capa basal -	12 (100)	1 (2.2)	1.0	1.0		0 (0)	1.0	1.0	
Capa basal +	0 (0)	44 (97.8)	528 (30.7-∞)	356 (20-∞)	<0.001	29 (100)	348 (20.1-∞)	260 (15-∞)	<0.001
βPix (n=105)									
Capa basal -	10 (77)	6 (12.5)	1.0	1.0		1 (2.9)	1.0	1.0	
Capa basal +	3 (23)	42 (87.5)	23 (5-109))	24 (3.4-168)	0.001	34 (97.1)	113 (10.6-1213)	90 (5.7-1436)	0.001

OR^a: Odds ratio crudo

OR^b: OR ajustado por edad y VPH-AR.

NOTA: Las muestras de CaCU no se evaluaron por tercios epiteliales, la expresión se dio en todas las células invasoras

Cuadro 3. Intensidad de Rac1, RhoA, Cdc42, Tiam1 y β Pix y su asociación con el diagnóstico histopatológico.

Intensidad	Sano n (%)	LEIBG n (%)	OR ^b (IC 95%)	<i>p</i>	LEIAG n (%)	OR ^b (IC 95%)	<i>p</i>	CaCU n (%)	OR ^b (IC 95%)	<i>p</i>
Rac1 (n=80)										
1+	8 (66.7)	5 (14.3)	1.0		6 (22.2)	1.0		0 (0)	1.0	
2 y 3 +	4 (33.3)	30 (85.7)	15 (1.9-134)	0.001	21 (77.8)	9 (1.01-65)	0.008	6 (100)	10.4(0.7-165)	0.045
Cdc42 (n=101)										
1+	8 (66.7)	26 (53)	1.0		15 (48.4)	1.0		8 (88.9)	1.0	
2 y 3 +	4 (33.3)	23 (47)	0.9 (0.17-4.8)	0.9	16 (51.6)	0.98 (0.16-5.6)	0.97	1 (11.1)	0.01 (0.1-1.6)	0.1
RhoA (n=103)										
1+	9 (75)	24 (50)	1.0		11 (30.6)	1.0		6 (85.7)	1.0	
2 y 3 +	3 (25)	24 (50)	3.8 (0.6-22)	0.14	25 (59.4)	10.3 (1.5-69)	0.02	1 (14.3)	1.2 (0.07-20)	0.89
Tiam1 (n=86)										
1+	9 (75)	3 (6.7)	1.0		5 (17.2)	1.0		2 (28.6)	1.0	
2 y 3 +	3 (25)	42 (93.3)	40.2 (6-275)	<0.001	24 (82.8)	15.1 (2.6-88)	0.003	5 (71.4)	7.5 (0.9-61)	0.06
βPix (n=104)										
1+	13 (100)	30 (62.5)	1.0		12 (34.3)	1.0		5 (62.5)	1.0	
2 y 3 +	0 (0)	18 (37.5)	7.8 (0.8- ∞)	0.077	23 (65.7)	26.2 (2.5- ∞)	0.007	3 (37.5)	10.9 (0.6- ∞)	0.1

OR^b: OR ajustado por edad y VPH-AR.

Señal nuclear de Rac1 en tejido cervical.

Un hallazgo interesante de este estudio fue que más del 50% de las LEIBG, LEIAG y CaCU presentaron señal nuclear de Rac1 en las células del epitelio cervical, mientras que el 100% de las muestras de tejido sano no presentó señal nuclear de Rac1 (Figura 5). El 71.4% de LEIBG, el 52% de LEIAG y el 50% de CaCU mostraron señal nuclear positiva para Rac1. Se realizó un análisis bivariado y multivariado para conocer el grado de asociación entre esta señal nuclear y el diagnóstico histopatológico. Se encontró que existe una asociación muy fuerte entre la señal nuclear de Rac1 y la presencia de LEIBG y LEIAG con un OR de 32.3 y 12.4 respectivamente ($p < 0.05$). También se encontró asociación entre la señal positiva de Rac1 en el núcleo y el diagnóstico de CaCU, pero ésta no tuvo significancia estadística (Cuadro 4). Además, el 62% de las muestras positivas a VPH-AR (independientemente del grado de lesión) presentaron señal nuclear de Rac1, mostrando asociación significativa con un OR de 3.9 (Cuadro 5). De igual manera se encontró que el 5% y 10% de LEIBG y LEIAG respectivamente mostraron señal nuclear de Tiam1, asociándose con el grado de lesión pero sin significancia estadística (datos no mostrados).

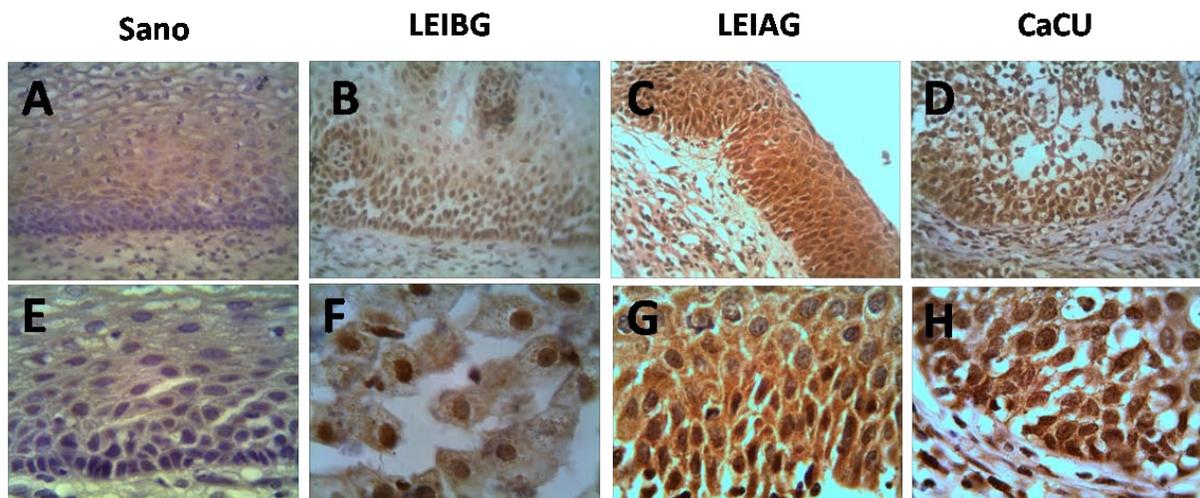


Figura 5. Señal nuclear de Rac1 en tejido sano, LEIBG, LEIAG y CaCU. A-D: 40x; E-H 100x.

Cuadro 4. Localización nuclear de Rac1 y su asociación con el diagnóstico histopatológico.

Rac1 n=80	Sano n (%)	LEIBG n (%)	LEIAG n (%)	CaCU n (%)	OR ^a (IC 95%)			OR ^b (IC 95%)		
<u>Señal nuclear</u>					LEIBG	LEIAG	CaCU	LEIBG	LEIAG	CaCU
r= 0.5										
Negativa	12 (100)	10 (28.6)	14 (51.8)	3 (50)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Positiva	0 (0)	25 (71.4)	13 (48.2)	3 (50)	30 (3.4-∞)	10.4 (1.2-∞)	12 (0.9-∞)	32.3 (3.2-∞)	12.4 (1.3-∞)	4.5 (0.2-∞)
p=<0.001*										

*Prueba exacta de Fisher

OR^a: Odds ratio crudo.

OR^b: OR ajustado por edad.

r: coeficiente de correlación de contingencia.

Cuadro 5. Señal nuclear de Rac1 y su asociación con la presencia de VPH-AR.

Rac1 n=67	VPH- n (%)	VPH+ n (%)	OR ^a (IC 95%)	OR ^b (IC 95%)
<u>Señal nuclear</u>		VPH+	VPH+	
r= 0.27				
Negativa	12 (70.6)	19 (38)	1.0	1.0
Positiva	5 (29.4)	31 (62)	3.92 (1.2-12.9)	3.5 (1.05-11.9)
p=<0.020*				

*Prueba de X²; OR^a: Odds ratio crudo; OR^b: OR ajustado por edad.

r: coeficiente de correlación de contingencia.

V. Discusión y conclusiones

Las GTPasas y sus activadores son proteínas de señalización intracelulares que participan en varios procesos como, la migración celular, adhesión célula-célula, modulación del citoesqueleto de actina, polaridad celular, entre otros. Se han observado alteraciones en su expresión en diferentes tipos de displasias como el cáncer de mama, cáncer gástrico, adenocarcinoma hepatocelular, y cáncer de colon; estos cambios en la expresión favorecen el proceso tumorigénico y en algunos casos promueven lesiones de carácter invasivo. Hasta la fecha, no existen estudios que describan la expresión de estas proteínas en epitelio cervical. En este estudio, se evaluó la expresión de Rac1, RhoA, Cdc42, Tiam1 y β Pix en tejido cervical sano, LEIBG, LEIAG y CaCU y determinamos su correlación con el grado de lesión cervical y la presencia de VPH-AR.

En epitelio cervical sano, la expresión de Rac1, Cdc42, RhoA, Tiam1 y β Pix se limitó al segundo y tercer tercio epitelial con una señal predominantemente débil. Las GTPasas de la familia Rho participan en varios procesos celulares incluyendo el control del ciclo celular y la reorganización del citoesqueleto (microfilamentos y microtúbulos). RhoA regula la progresión de la fase G1 a S del ciclo celular en células de cáncer gástrico³⁵. Durante la división celular, Cdc42 participa en la orientación del huso mitótico en células epiteliales³⁶. Por otra parte, Rac1 se acumula en el núcleo durante la fase G2 promoviendo la división celular en células COS-1 (Fibroblastos inmortalizados de mono)³⁷. Tomando en cuenta estas observaciones, una posible explicación de la ausencia de estas proteínas en la capa basal del epitelio cervical sano es que, estas sólo se expresan en células en proceso de diferenciación pero no en células en etapa de quiescencia en su ciclo celular, como las de la capa basal que funcionan como células de reserva. Este patrón de expresión contrasta con lo observado en la epidermis de ratones, donde Rac1 sólo se expresa en las células basales³⁸. Esta diferencia en la expresión puede deberse al tipo de epitelio, ya que a diferencia del tejido cervical, la epidermis tiene folículos pilosos y se cree que Rac1 está implicada en el mantenimiento de los folículos y las células madre epidermales.

En contraste, en LEIBG y LEIAG la expresión de las tres GTPasas y los dos GEFs se extendió a todo el epitelio, incluyendo la capa basal con una señal generalmente más fuerte que la observada en el tejido sano. Estos cambios en la expresión de las proteínas, excepto la intensidad de Cdc42, mostraron una fuerte asociación con el grado de lesión y la presencia de VPH-AR. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de Cdc42 entre las lesiones y el tejido sano, sin embargo, estos resultados contrastan con lo reportado por Gómez del Pulgar *et al.* en adenocarcinoma colorectal, donde observan una alta expresión de Cdc42 en las lesiones, y esta sobreexpresión desregula al supresor de tumor ID4³⁹. En cuanto al aumento en la expresión de Rac1, RhoA y Tiam1, los resultados son similares a los obtenidos en otros tipos de cáncer: Espina *et al.*, en 2008, observan un aumento en la expresión de Rac1 en adenocarcinoma colorectal, y este aumento acelera el proceso tumorigénico³³. Engers *et al.*, en 2007 encontraron un aumento de Rac1 en lesiones prostáticas de alto grado y cáncer de próstata en comparación con el tejido sano⁴⁰. Li *et al.* en 2006 observaron un aumento en la expresión de RhoA en carcinoma hepatocelular³⁴. Malliri *et al.*, en carcinoma colorectal observan un aumento en la expresión de Tiam1 y la señal se observa en toda la cripta displásica⁴¹. El aumento en la expresión de estas proteínas se asocia con un pronóstico negativo para los pacientes, lo que sugiere que Rac1, RhoA y Tiam1 podrían tener un papel importante en la progresión del CaCU, y su sobreexpresión podría estar asociada con un mal pronóstico en las pacientes. Sin embargo, se necesitaría un estudio de seguimiento que ayude a definir el papel funcional de estas proteínas en la progresión de las lesiones premalignas.

Cruz *et al.*, observaron que el aumento en la expresión de Rac1 y Tiam1 en células cancerosas de páncreas en cultivo se relaciona con la sobreexpresión de la integrina $\alpha 5\beta 6$, lo cual estimula la migración e invasión de estas células⁴². Hazelbag *et al.*, observaron que la expresión de esta integrina en epitelio cervical sano es muy baja, pero incrementa en lesiones escamosas intraepiteliales y esta sobreexpresión es un factor pronóstico desfavorable⁴³. Lo anterior sugiere que el aumento en la expresión de Tiam1 y Rac1 en tejido cervical, podría asociarse con la expresión de integrina $\alpha 5\beta 6$ favoreciendo la migración e invasión de células cancerosas.

Las oncoproteínas E6 y E7 de VPH-AR han sido implicadas en mitosis anormales por su habilidad para modificar el citoesqueleto de las células induciendo disturbios en los centrosomas, provocando inestabilidad genética en las células infectadas⁴⁴⁻⁴⁶. Lo anterior sugiere que, al modificar el citoesqueleto, posiblemente la presencia del VPH-AR afecte la expresión y/o localización tisular de Rac1, Cdc42, RhoA, Tiam1 y β Pix.

El extremo C-terminal de la oncoproteína E6 presenta un dominio de unión a proteínas con dominios PDZ, el cual es altamente conservado entre los VPH-AR; mediante este dominio puede interactuar con estas proteínas e inducir su degradación. Por otro lado, los GEFs Tiam1 y β Pix poseen dominios PDZ. Basados en estos antecedentes, existe la posibilidad de que E6 pueda unirse y degradar a Tiam1 y β Pix, por lo que se esperaba encontrar una disminución en la expresión de estas proteínas en presencia de VPH-AR. Los resultados muestran que los niveles de expresión de Tiam1 y β Pix aumentan en las lesiones, lo que sugiere que estas proteínas no son afectadas por la presencia de E6. Sin embargo, se necesita de más estudios para conocer como se da la interacción Tiam1/ β Pix-E6 y que efectos funcionales tiene en las células del epitelio cervical.

Una de los hallazgos más interesantes de este trabajo fue la presencia de Rac1 en el núcleo de las células epiteliales de LEIBG, LEIAG y CaCU. Se realizó una subdivisión de los datos de acuerdo a la clasificación de Richart e interesantemente se encontró que, el 100% de las muestras de tejido sano no presentó señal nuclear de Rac1, en contraste, el 52% de las muestras con infección por VPH sin displasia presentaron señal nuclear, y el 100% de las muestras con neoplasia intraepitelial cervical de grado 1 (NIC1) fueron positivas a Rac1 nuclear (datos no mostrados). Se encontró una fuerte asociación de la señal nuclear de Rac1 con LEIBG y LEIAG, así como con la presencia de VPH-AR. Michaelson *et al.* en el 2008 demostraron que Rac1 se acumula en el núcleo durante la fase G2 del ciclo celular y promueve la división celular de células COS-1³⁷. Por otro lado, Buongiorno *et al.* en el 2008 observan que Rac1 y Tiam1 se asocian con el complejo β -catenina/TCF aumentando la transcripción de genes blanco de la vía Wnt que se sabe participa en procesos

oncogénicos⁴⁷. Estos resultados sugieren que la presencia de Rac1 en el núcleo de las células del epitelio cervical, podría jugar un papel importante en la progresión del CaCU, mediante la activación de genes blanco de la vía Wnt.

Estudios preliminares que realizamos en células HeLa y ratones C57 tratados con estrógeno (17 β e), muestran que los estrógenos pueden inducir la translocación nuclear de Rac1 en células epiteliales cervicales (Anexo 3). Estos resultados sugieren que Rac1 podría jugar un papel importante en la progresión del CaCU, particularmente en respuesta a la estimulación estrogénica.

Basados en la observación de que el tratamiento con estrógenos induce la translocación nuclear de Rac1 en células HeLa y en células del epitelio cervical de ratones C57 tratados, y considerando la relación entre Tiam1/Rac1 y la vía Wnt, creemos que niveles elevados de estrógenos en una mujer podrían aumentar la translocación nuclear de Rac1, y así favorecer el proceso oncogénico. En este estudio se desconoce si las pacientes han estado en tratamiento hormonal, si han consumido anticonceptivos hormonales o su índice estrogénico; por lo tanto, no podemos asociar la señal nuclear de Rac1 con algún efecto patogénico; sin embargo, esta observación da una perspectiva para analizar este evento en un estudio futuro en que se conozcan estas variables y sea posible evaluar su asociación con la localización nuclear de Rac1 y la vía Wnt como un posible factor de riesgo oncogénico.

En conclusión, el aumento en la intensidad de estas proteínas y su expresión en la capa basal del epitelio cervical en LEIBG y LEIAG sugieren su participación en el proceso oncogénico. Existe translocación nuclear de Rac1 en LEIBG, LEIAG y CaCU. Estos cambios en la expresión se asocian fuertemente a la presencia de VPH-AR. Estos resultados servirán como base para la realización de estudios más exhaustivos que determinen el papel funcional de Rac1, RhoA, Cdc42, Tiam1 y β Pix en el desarrollo del CaCU y evalúen su valor potencial como biomarcadores y/o blancos terapéuticos para esta enfermedad.

VI. Referencias:

1. SPM. Estadísticas de mortalidad en México: muertes registradas en el año 2003. *Salud Pública Mex.* 2005;47(2):171-87.
2. Secretaría de Salud. Dirección General de Información en Salud. México, 2007. URL: <http://www.sinais.salud.gob.mx>. Último acceso: Junio 2009.
3. Palacio-Mejía LS, Rangel-Gomez G, Hernandez-Avila M, Lazcano-Ponce E. Cervical cancer, a disease of poverty: mortality differences between urban and rural areas in Mexico. *Salud Publica Mex.* 2003;45 Suppl 3:S315-25.
4. Muñoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine.* 2006 Aug 21;24S3:S1-S10.
5. Premoli G ea. Virus del papiloma humano; visión actual en biomedicina. *ADM.* 2005;62(6):213-24.
6. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* 2003 Jan;16(1):1-17.
7. Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Muñoz N, Villa LL. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine.* 2006 Aug 21;24 Suppl 3:S26-34.
8. Wise-Draper TM, Wells SI. Papillomavirus E6 and E7 proteins and their cellular targets. *Front Biosci.* 2008;13:1003-17.
9. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *Clin Virol.* 2005;32s:S7-S15.
10. Nguyen ML, Nguyen MM, Lee D, Griep AE, Lambert PF. The PDZ ligand domain of the human papillomavirus type 16 E6 protein is required for E6's induction of epithelial hyperplasia in vivo. *Journal of virology.* 2003 Jun;77(12):6957-64.
11. Tomaic V, Gardiol D, Massimi P, Ozbun M, Myers M, Banks L. Human and primate tumour viruses use PDZ binding as an evolutionarily conserved mechanism of targeting cell polarity regulators. *Oncogene.* 2009 Jan 8;28(1):1-8.
12. James MA, Lee JH, Klingelutz AJ. Human papillomavirus type 16 E6 activates NF-kappaB, induces cIAP-2 expression, and protects against apoptosis in a PDZ binding motif-dependent manner. *Journal of virology.* 2006 Jun;80(11):5301-7.
13. Latorre IJ, Roh MH, Frese KK, Weiss RS, Margolis B, Javier RT. Viral oncoprotein-induced mislocalization of select PDZ proteins disrupts tight junctions and causes polarity defects in epithelial cells. *Journal of cell science.* 2005 Sep 15;118(Pt 18):4283-93.
14. Garcia-Mata R, Burrridge K. Catching a GEF by its tail. *Trends Cell Biol.* 2007 Jan;17(1):36-43.
15. Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell.* 2007 Jun 1;129(5):865-77.
16. Sanchez RP. GTPasas de la familia Rho/Rac: Participación en procesos biológicos y patologías. Salamanca España. 2006.
17. Bishop AL, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J.* 2000 Jun 1;348 Pt 2:241-55.
18. Malliri A, Collard JG. Role of Rho-family proteins in cell adhesion and cancer. *Current opinion in cell biology.* 2003 Oct;15(5):583-9.
19. Dovas A, Couchman JR. RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem J.* 2005 Aug 15;390(Pt 1):1-9.
20. Benitah SA, Valeron PF, van Aelst L, Marshall CJ, Lacal JC. Rho GTPases in human cancer: an unresolved link to upstream and downstream transcriptional regulation. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Dec 17;1705(2):121-32.
21. Boettner B, Van Aelst L. The role of Rho GTPases in disease development. *Gene.* 2002 Mar 20;286(2):155-74.
22. Luo L. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nature reviews.* 2000 Dec;1(3):173-80.

23. Kissil JL, Walmsley MJ, Hanlon L, et al. Requirement for Rac1 in a K-ras induced lung cancer in the mouse. *Cancer research*. 2007 Sep 1;67(17):8089-94.
24. Sahai E, Marshall CJ. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002 Feb;2(2):133-42.
25. Jiang WG, Watkins G, Lane J, et al. Prognostic value of rho GTPases and rho guanine nucleotide dissociation inhibitors in human breast cancers. *Clin Cancer Res*. 2003 Dec 15;9(17):6432-40.
26. Wu M, Wu ZF, Kumar-Sinha C, Chinnaiyan A, Merajver SD. RhoC induces differential expression of genes involved in invasion and metastasis in MCF10A breast cells. *Breast cancer research and treatment*. 2004 Mar;84(1):3-12.
27. Baugher PJ, Krishnamoorthy L, Price JE, Dharmawardhane SF. Rac1 and Rac3 isoform activation is involved in the invasive and metastatic phenotype of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res*. 2005;7(6):R965-74.
28. Chan AY, Coniglio SJ, Chuang YY, et al. Roles of the Rac1 and Rac3 GTPases in human tumor cell invasion. *Oncogene*. 2005 Nov 24;24(53):7821-9.
29. Zuo Y, Shields SK, Chakraborty C. Enhanced intrinsic migration of aggressive breast cancer cells by inhibition of Rac1 GTPase. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006 Dec 15;351(2):361-7.
30. Walch A, Seidl S, Hermannstadter C, et al. Combined analysis of Rac1, IQGAP1, Tiam1 and E-cadherin expression in gastric cancer. *Mod Pathol*. 2008 May;21(5):544-52.
31. Minard ME, Ellis LM, Gallick GE. Tiam1 regulates cell adhesion, migration and apoptosis in colon tumor cells. *Clin Exp Metastasis*. 2006;23(5-6):301-13.
32. Adithi M, Venkatesan N, Kandalam M, Biswas J, Krishnakumar S. Expressions of Rac1, Tiam1 and Cdc42 in retinoblastoma. *Exp Eye Res*. 2006 Dec;83(6):1446-52.
33. Espina C, Cespedes MV, Garcia-Cabezas MA, et al. A critical role for Rac1 in tumor progression of human colorectal adenocarcinoma cells. *Am J Pathol*. 2008 Jan;172(1):156-66.
34. Li XR, Ji F, Ouyang J, Wu W, Qian LY, Yang KY. Overexpression of RhoA is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Eur J Surg Oncol*. 2006 Dec;32(10):1130-4.
35. Zhang S, Tang Q, Xu F, et al. RhoA regulates G1-S progression of gastric cancer cells by modulation of multiple INK4 family tumor suppressors. *Mol Cancer Res*. 2009 Apr;7(4):570-80.
36. Jaffe AB, Kaji N, Durgan J, Hall A. Cdc42 controls spindle orientation to position the apical surface during epithelial morphogenesis. *J Cell Biol*. 2008 Nov 17;183(4):625-33.
37. Michaelson D, Abidi W, Guardavaccaro D, et al. Rac1 accumulates in the nucleus during the G2 phase of the cell cycle and promotes cell division. *J Cell Biol*. 2008 May 5;181(3):485-96.
38. Benitah SA, Frye M, Glogauer M, Watt FM. Stem cell depletion through epidermal deletion of Rac1. *Science*. 2005 Aug 5;309(5736):933-5.
39. Gomez Del Pulgar T, Valdes-Mora F, Bandres E, et al. Cdc42 is highly expressed in colorectal adenocarcinoma and downregulates ID4 through an epigenetic mechanism. *International journal of oncology*. 2008 Jul;33(1):185-93.
40. Engers R, Ziegler S, Mueller M, Walter A, Willers R, Gabbert HE. Prognostic relevance of increased Rac GTPase expression in prostate carcinomas. *Endocr Relat Cancer*. 2007 Jun;14(2):245-56.
41. Malliri A, Rygiel TP, van der Kammen RA, et al. The rac activator Tiam1 is a Wnt-responsive gene that modifies intestinal tumor development. *The Journal of biological chemistry*. 2006 Jan 6;281(1):543-8.
42. Cruz-Monserrate Z, O'Connor KL. Integrin alpha 6 beta 4 promotes migration, invasion through Tiam1 upregulation, and subsequent Rac activation. *Neoplasia*. 2008 May;10(5):408-17.

43. Hazelbag S, Kenter GG, Gorter A, et al. Overexpression of the alpha v beta 6 integrin in cervical squamous cell carcinoma is a prognostic factor for decreased survival. *J Pathol.* 2007 Jul;212(3):316-24.
44. Nguyen CL, Eichwald C, Nibert ML, Munger K. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the centrosomal component gamma-tubulin. *Journal of virology.* 2007 Dec;81(24):13533-43.
45. Cooper B, Brimer N, Vande Pol SB. Human papillomavirus E6 regulates the cytoskeleton dynamics of keratinocytes through targeted degradation of p53. *Journal of virology.* 2007 Nov;81(22):12675-9.
46. Kadaja M, Sumerina A, Verst T, Ojarand M, Ustav E, Ustav M. Genomic instability of the host cell induced by the human papillomavirus replication machinery. *EMBO J.* 2007 Apr 18;26(8):2180-91.
47. Buongiorno P, Pethe VV, Charames GS, Esufali S, Bapat B. Rac1 GTPase and the Rac1 exchange factor Tiam1 associate with Wnt-responsive promoters to enhance beta-catenin/TCF-dependent transcription in colorectal cancer cells. *Mol Cancer.* 2008;7:73.
48. Frederick M. *Current Protocols Molecular Biology.* Canada: John Wiley & Sons; 1988.

VII. Anexos

Anexo 1.

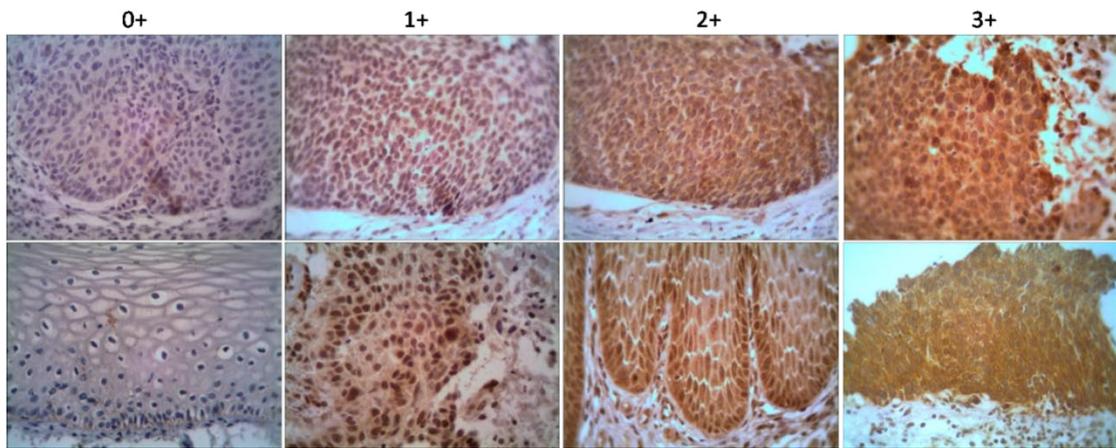


Figura 6. Criterios para evaluar la intensidad de la reacción de IHQ para la detección de Rac1, Rhoa, Cdc42, β Pix y Tiam1.

Anexo 2

Localización tisular de Rac1, Cdc42, RhoA, Tiam1 y β Pix y su asociación con la presencia de VPH de alto riesgo.

Proteína	VPH - n (%)	VPH + n (%)	OR ^a (IC 95%)	OR ^b (IC 95%)	p
Rac1 (n=80)					
Capa basal -	9 (53)	7 (14)	1.0	1.0	--
Capa basal +	8 (47)	43 (86)	6.9 (2-24)	6.4 (1.7-23)	0.005
Cdc42 (n=101)					
Capa basal -	8 (38.1)	3 (3.8)	1.0	1.0	--
Capa basal +	13 (61.9)	77 (96.2)	15.8 (3.7-67.4)	14.9 (3.2-68.2)	0.001
RhoA (n=103)					
Capa basal -	12 (57.1)	7 (8.6)	1.0	1.0	--
Capa basal +	9 (42.9)	74 (91.4)	14.1(4.4-45)	13.6 (4.1-45)	<0.001
Tiam1 (n=86)					
Capa basal -	10 (50)	3 (5)	1.0	1.0	--
Capa basal +	10 (50)	57 (95)	19 (4.9-88)	23.5 (5.1-138)	<0.001
βPix (n=105)					
Capa basal -	9 (41)	7 (8.8)	1.0	1.0	--
Capa basal +	13 (59)	23 (91.2)	7.2 (2.3-23)	6.6 (2-21.6)	0.002

Intensidad de Rac1, Cdc42, RhoA, Tiam1 y β Pix y su asociación con la presencia de VPH de alto riesgo.

Proteína	VPH - n (%)	VPH + n (%)	OR ^a (IC 95%)	OR ^b (IC 95%)	p
Rac1 (n=80)					
1+	8 (47)	11 (22)	1.0	1.0	
2 y 3 +	9 (53)	39 (78)	3.2 (0.98-10.1)	3.2 (0.97-10.4)	0.055
Cdc42 (n=101)					
1+	15 (71.4)	42 (52.5)	1.0	1.0	--
2 y 3 +	6 (28.6)	38 (47.5)	2.3(0.8-6.4)	2.1 (0.7-6)	0.18
RhoA (n=103)					
1+	11 (52.4)	38 (46.9)	1.0	1.0	--
2 y 3 +	10 (47.6)	43 (53.1)	1.2 (0.48-3.3)	1.2 (0.44-3.1)	0.77
Tiam1 (n=86)					
1+	9 (45)	10 (17)	1.0	1.0	--
2 y 3 +	11 (55)	50 (83)	4.1 (1.34-12.5)	3.85 (1.2-12.2)	0.02
βPix (n=105)					
1+	15 (68.2)	44 (55)	1.0	1.0	--
2 y 3 +	7 (31.8)	36 (45)	1.8 (0.64-4.7)	1.5 (0.5-4.3)	0.4

Anexo 3.

Estudios preliminares

Efecto del estrógeno sobre la translocación nuclear de Rac1

Metodología:

Líneas celulares. Las líneas celulares SiHa (VPH16+), HeLa (VPH18+), C33A (VPH-), y MCF-7 (Cáncer de mama) fueron proporcionadas por el Dr. Patricio Gariglio del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN). Las células fueron mantenidas en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; ICN; Flow Laboratories) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado, 30 unidades/ml de penicilina, 30µg/ml de estreptomycin y L-glutamine 2mM. Fueron cultivadas a 37°C en un ambiente de 5% de CO₂.

Tratamiento estrogénico. Después de 24 horas de cultivo, las células HeLa fueron tratadas con 17β-estradiol a una concentración final de 0.1µM en medio DMEM suplementado con 0.5% de suero fetal bovino por 24 horas, posteriormente se realizó el fraccionamiento celular núcleo/citoplasma.

Extracción de proteínas y fraccionamiento celular. Las células fueron lisadas en 100 a 200µl de solución de lisis RIPA (Anexo 4) y se realizó la extracción de proteínas totales (Anexo 8). Se centrifugó a 120000gs a 4°C por 15 a 20 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en un tubo limpio. Se prepararon alícuotas con 30 a 40µl de proteína total por muestra y se almacenaron a -80°C. Para el fraccionamiento celular, las células fueron resuspendidas en buffer A (Hepes pH 7.6 20mM, KCl 100mM, Sacarosa 5%, EGTA pH 8.0 0.25mM, DTT 0.5mM), se agregó Buffer B (Buffer A + NP40 0.8%), después de centrifugar se recuperó el sobrenadante (fracción citoplásmica) y el resto se resuspendió en buffer RIPA (fracción nuclear).

Western blot (WB). Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles de acrilamida al 12.5% (anexo 5). Posteriormente se realizó la transferencia de proteínas a la membrana de nitrocelulosa. La membrana fue bloqueada incubándola

con BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubó con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C (Anti-Rac1 BD Transduction Laboratories 610650). Posteriormente, se incubó 1 hora con el anticuerpo secundario y se reveló con luminol en placas de rayos X. Para validar el resultado, se utilizó la línea celular MCF-7 derivada de cáncer de mama como control positivo.

Resultados.

Se sabe que Rac1 tiene una señal de localización nuclear, y que interacciona con β -catenina aumentando la transcripción de genes blanco de la vía Wnt (Boungiorno 2008; Michaelson 2008). Además, se ha demostrado que el estrógeno incrementa la expresión de genes de la vía Wnt/ β -catenina (Quan *et al*, 2008). En un estudio preliminar realizado en el departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV México D.F., observamos que la exposición a estrógeno provoca la translocación nuclear de Rac1 en las células del epitelio cervical en ratones hembra de 6 meses de edad tratados con estrógeno durante 5 meses (Figura 7).

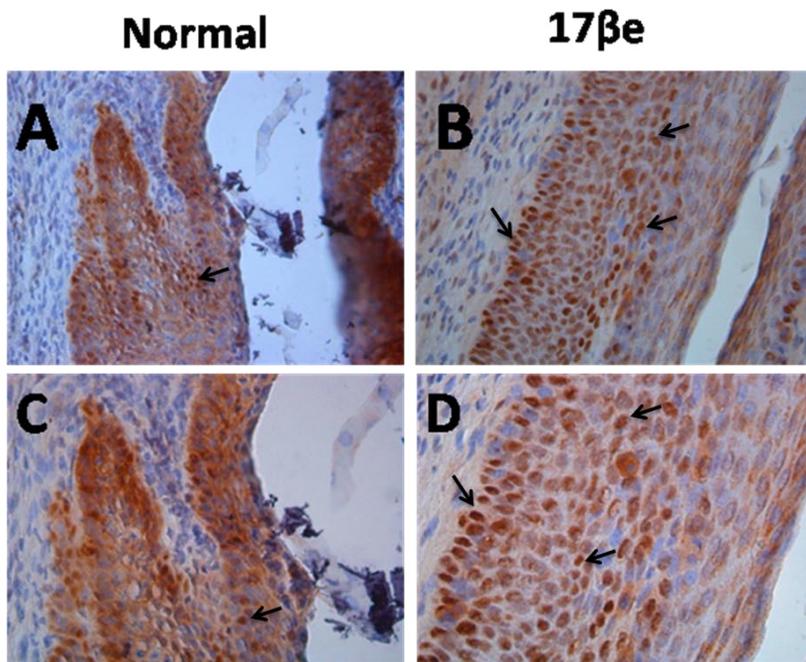


Figura 7. **Señal nuclear de Rac1 en ratones C57 tratados con estrógeno.** Detección inmunohistoquímica de Rac1; zona exocervical. A y C: Raton C57 sin tratamiento, 40x y 63x respectivamente. B y D: Ratón C57 con tratamiento estrogénico 0.01mM, 40x y 63x. Las flechas señalan algunos núcleos positivos a Rac1, se observa un aumento notable en la señal nuclear de Rac1 en el tratamiento con 17βe.

Expresión de Rac1 y Tiam1 en líneas celulares derivadas de CaCU.

Se Analizó la expresión de Rac1 y Tiam1 en las líneas celulares C33A, SiHa y HeLa. Rac1 se expresa en proporción similar en las distintas líneas celulares, sugiriendo que, la expresión de Rac1 no es afectada por el tipo viral (Figura 8).

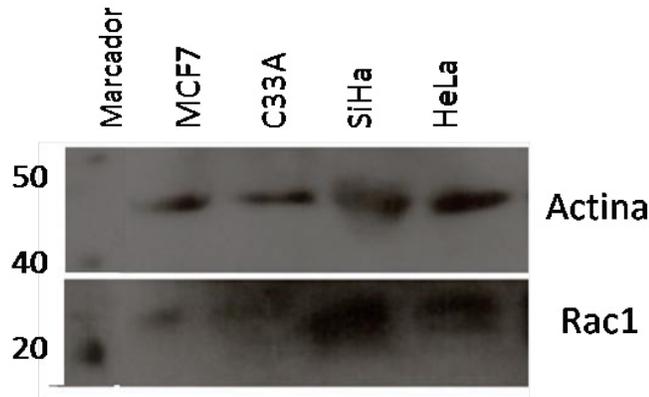


Figura 8. **Detección de Rac1 y Tiam1 en líneas celulares derivadas de CaCU.** Detección de Rac1 (~25kDa) por WB en extracto total de proteínas. Las células MCF7 fueron usadas como control positivo a Rac1.

Efecto del estrógeno sobre la translocación nuclear de Rac1.

Se realizaron tratamientos con estrógeno a una concentración final de 0.01mM en células HeLa. Se observó que el tratamiento estrogénico aumenta la expresión nuclear de Rac1 en las células que recibieron 17 β e con respecto a las que sólo recibieron el vehículo (Figura 9).

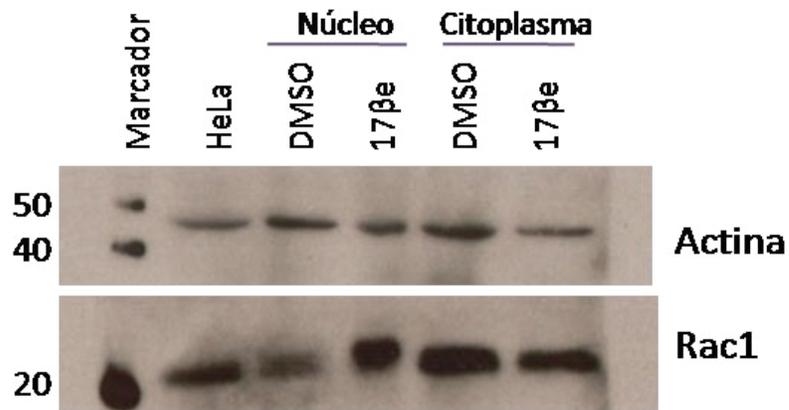


Figura 9. **Detección de Rac1 en células HeLa tratadas con estrógeno.** Después de 24 horas de tratamiento, se realizó el fraccionamiento núcleo/citoplasma para detectar Rac1 mediante western blot.

Anexo 4. Soluciones⁴⁸

RIPA

- Tris HCl 50mM pH 8
- NaCl 150mM
- NP-40 1%
- Deoxicolato de sodio 0.5%
- SDS 1%

TBS

- 24.23g de Trizma HCl
- 80.06g de NaCl
- 800ml de agua ultra pura
- pH 7.6 con HCl

TBST

- 100ml de TBS más 900ml de agua ultra pura más 1ml de Tween20.

HEMATOXILINA DE HARRIS

- 1.0g Hematoxilina cristalizada
- 10ml Alcohol etílico absoluto
- 20g Alumbre de potasio
- 0.5g Oxido mercurico
- 200ml Agua destilada

Citrato de sodio a 0.01 M

- Citrato de sodio 2.94g
- H₂O destilada

Se pesaron 2.94g de citrato de sodio y se aforó a 1 litro.

Formol amortiguado

- Formaldehido (36-38%) 100ml
- Fosfato de Na dibásico anhídrido 6.5g
- Fosfato de Na monobásico monohidtratado 4.0g
- H₂O destilada 900ml

Se pesaron 6.5g de fosfato de Na dibásico anhídrido, 4.0g de fosfato de Na monobásico monohidratado y se midieron 100ml de formaldehído, se mezclaron todos los componentes y se aforó a 1 litro con agua destilada.

PBS (Solución Buffer de fosfatos) 10X pH.7.4

- NaCl 80.0g
- KCl 2.0g
- Na₂HPO₄ 12.0g
- KH₂PO₄ 2.0 g
- H₂O 1l

Se pesó la cantidad indicada para cada componente, se mezclaron y se aforó a 1 litro con agua destilada. Se ajustó el pH a 7.4 y se refrigeró.

PBS/BSA (Albúmina Sérica Bovina) 1%

- BSA 500mg
- PBS 49.5ml

Se midieron ambos componentes, se mezclaron y se refrigeró.

Anexo 5. Preparación de geles⁴⁸

Preparación de los geles de acrilamida.

Los geles de acrilamida se prepararan en función del tamaño de las proteínas a separar, de acuerdo a la siguiente tabla:

Tamaño de la proteína (kDa)	Porcentaje del gel
4-40	20
12-45	15
10-70	12.5
15-100	10
20-200	8

Fase de separación:

Soluciones	Concentración final de acrilamida en el gel									
	5	6	7	7.5	8	9	10	12.5	13	15
30% acrylamide/ 0.8% bisacrylamide	5	6	7	7.5	8	9	10	12.5	13	15
4x Tris-Cl SDS pH 8.8	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
dH2O	17.5	16.5	15.5	15	14.5	13.5	12.5	10	9.5	7.5
10% APS	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
TEMED	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02

- a. Estas combinaciones sirven para preparar 30 ml de gel de separación
- b. Las unidades de todos los números en la tabla son mililitros.
- c. Preparar la mezcla fresca justo antes de preparar el gel
- d. Dejar polimerizar la fase de separación (30min – 1h)

Fase de concentración:

30% acrilamida/0.8% bisacrilamida 1.3ml, 2.50ml of 4x Tris-Cl/SDS, pH 6.8, 6.10ml de H₂O. Agregar 50µl of persulfato de amonio al 10% y 10µl de TEMED. Agitar cuidadosamente para mezclar. Usar inmediatamente. Produce 10ml para colocar en el gel, suficiente para 4 minigeles. El gel de concentración es preparado de esta manera independientemente de la concentración de acrilamida del gel de separación.

Anexo 6.

Inmunohistoquímica

Protocolo estandarizado (Mouse/Rabbit Immunodetector HRPw/DAB de *Bio SB*)

1. Desparafinación

- a) 10' en el horno a 60°C
- b) Xilol mínimo 5'
- c) Xilol-Alcohol 3'
- d) Alcohol absoluto 3'
- e) Alcohol 90% 3'
- f) Alcohol 70% 3'
- g) Alcohol 50% 3'
- h) Agua destilada 5'

2. Recuperación antigénica

Citrato de sodio, 50ml en vaso de Kopplin.

Vaporera *Exotic moulimex* 10' temperatura máxima 95°C

Lavado PBS 5'

3. Bloqueo

- a) Immunodetector Perodidasa Block 10'
- b) Lavado PBS 5'
- c) PBS + BSA 1% 30'
- d) Lavado PBS 5'

4. Anticuerpos

- a) Anticuerpo primario 1 hora a temperatura ambiente *
- b) Lavados PBS, 3 x 1'
- c) Immunodetector *Biotin link* 10' / Ac secundario 30' (RhoA y BPix)
- d) Lavados PBS, 3 x 1'
- e) Immunodetector *HRP label* 10'
- f) Lavados PBS, 3 x 1'
- g) DAB (30 uL cromogeno en 1ml de buffer DAB) *
- h) Parar la reacción en agua corriente

5. Contraintinción

- a) Hematoxilina de Harris 3''
- b) Agua corriente. Eliminar exceso al chorro de agua.
- c) Viraje. Introducir la laminilla en agua amoniacal por 3''
- d) Agua corriente.

6. Deshidratación y Montaje.

- a) Agua destilada 5'
- b) Alcohol 50% 3'
- c) Alcohol 70% 3'
- d) Alcohol 70% 3'
- e) Alcohol 90% 3'
- f) Alcohol absoluto 3'
- g) Xilol-Alcohol 1:1 3'
- h) Xilol 10'
- i) Montaje con *Entellan* de Merck.

* Consultar la hoja de *Diluciones y Revelado*. El tiempo de incubación con DAB y la dilución variará de acuerdo al anticuerpo primario a utilizar.

Diluciones y revelado

Anticuerpo	Dilución	Tiempo de incubación	Tiempo de revelado DAB
Rac1	1:25	1 hora	4'
RhoA	1:50	1 hora	4'
Cdc42	1:50	1 hora	4'
Tiam1	1:200	1 hora	3'
BPix	1:50	1 hora	4'

Anexo 7.

Cultivos celulares

A partir de un cultivo previo en caja de petri:

1. Eliminar medio de cultivo (Vacío)
2. Colocar 1.5ml de tripsina por 2 minutos, retirar la tripsina por 2 minutos, y nuevamente 1.5ml de tripsina por 1 minuto. (HeLa)
Caski: Tripsina 5', s/tripsina 5', tripsina 5'
C33: Tripsina 1', 1' sin tripsina
3. Lavar con 1ml de PBS, y despegar con ayuda del mismo.
4. Centrifugar 1.5 minutos a 1500rpm.
5. Quitar PBS (vacío) cuidando de no tocar la pastilla de células.
6. Aforar a 1mL con Medio de cultivo DMEM.
7. Cuantificación. Colocar 5ul de células en 45ul de azul tripano (1:10, colocar 10ul de la mezcla en cámara de Neubauer y contar 4 de 9 cuadrantes.
Ej. Cuenta=314; $314/4 \times 10 \times 1000 = 7,850,000$ en 1000ul.
8. Homogenizar y colocar lo necesario de la mezcla celular en una caja p60 o p100. Distribuir las gotas de la mezcla.
9. Agregar 2ml más de medio DMEM.
10. Incubar 2 días aproximadamente a 37°C y 5% de CO₂.

Anexo 8.

Extracción de proteínas

1. Retirar el medio de cultivo (vacío)
2. Agregar 1ml de PBS, retirar con el vacío.
3. Agregar 1ml más de PBS.
4. Con ayuda de un "Gendarme" bajar las células.
5. Pipetear el PBS + células y colocar en otro tubo limpio.
6. Centrifugar 5000rpm por 2 minutos (Cuarto frío).
7. Desechar el sobrenadante.
8. Agregar RIPA, 250ul y el inhibidor de proteasas (1ul x c/100 de RIPA) por 30', dando vortex cada 10 minutos.
*La cantidad de RIPA depende del tamaño de la pastilla.
9. Centrifugar (cuarto frío) a 14000rpm x 10'.
10. Recuperar el sobrenadante (proteínas) y colocar en un tubo limpio.
11. Alicuotar si se requiere.
12. Almacenar el extracto protéico a -80°C.

Fraccionamiento celular

Buffer A: Hepes pH 7.6 20mM, KCl 100mM, Sacarosa 5%, EGTA pH 8.0 0.25mM, DTT 0.5mM

Buffer B: Buffer A + NP40 0.8%

1. Centrifugar a 3,000Gs x 5' a 4°C
2. Resuspender en 75µl de Buffer A
3. Adicionar 75µl de Buffer B
4. Incubar 10' en hielo
5. Centrifugar a 5,000Gs x 10'
6. Recuperar sobrenadante (Fracción citoplásmica)
7. Resuspender pastilla en 100µl de Buffer RIPA (fracción nuclear)

Anexo 9.
Cuantificación de proteínas
(DC protein assay Bio-Rad)

1. Preparar el volumen a utilizar de la solución A' (10µl de solución S^c/ 500µl de solución A)
2. En una placa de Elisa, colocar 25µl de solución A' y 5µl de muestra.
3. Enseguida agregar 200µl de la solución B para un volumen final de 230µl.
4. Incluir una curva de BSA con concentraciones de 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 y 0.156 µg/µl.
5. Leer en el espectrofotómetro a 450nm.