



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

Departamento de Farmacología

**RhoGEFs endoteliales: análisis sistemático de su perfil de expresión en
células endoteliales tumorales y estimuladas con VEGF**

Tesis que presenta

M. en C. Ricardo Hernández García

Para obtener el Grado de

Doctor en Ciencias

En la especialidad de

Farmacología

Director de tesis: Dr. José Vázquez Prado

México, D. F.

Junio, 2016

Este trabajo estuvo apoyado por la beca 17450 otorgada por el CONACyT y fue realizado en el Departamento de Farmacología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. José Vázquez Prado

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) grants 152434 (to J.V.P.) and 79429 (to G.R.C.) and by a University of California Institute for Mexico and the United States, UC-Mexus-Conacyt collaborative grant to JVP and MLIA. RHG is a graduate student supported by a CONACyT fellowship.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Vázquez Prado por todo el apoyo brindado durante el desarrollo de este proyecto de investigación y por ayudarme a crecer tanto a nivel personal como profesional.

A mis asesores: Dra. Claudia González Espinosa, Dra. Ma. del Carmen García García, Dr. Benjamín Florán Garduño y Dr. Alejandro Zentella, por su asesoría y sugerencias aportadas en este proyecto.

A mis amigos y colaboradores: Dra. Ivette Hernández-Negrete, Dra. María Luisa Guzmán-Hernández, Dr. Jorge Carretero-Ortega y el M. en C. Francisco Herrera-Vigenor. Por permitirme participar y aprender nuevas estrategias al colaborar en sus trabajos de investigación.

A mis compañeros y amigos: Alejandro Ledezma Sánchez, Lydia Chávez Vargas, Alma Patricia Reyes Ibarra, Iliana Ramírez Rangel, Israel Valencia Martínez, Sandra Sánchez Barbosa, Ismael Bracho Valdés, Ana Luisa Esparza Silva, Jonathan García Román, Adán Olguín Olguín, Paola Moreno Álvarez, Aleida Vázquez Macías, Liseth Aldaba Muruato, Evelyn Robles Molina, Misael Neri Dionisio Vicuña, Tania Yareli Gutierrez López, Magda Hernández Vasquez, Marco Antonio Bedolla Hernández, R. Daniel Cervantes Villagrana, Alejandro Castillo kauil, Sendi Rafael Adame García, Víctor Aparicio Color, Irving García Jiménez. Por su ayuda, por el valioso tiempo que compartimos y por tenerme paciencia durante mi estancia en el laboratorio.

Al apoyo técnico de Estanislao Escobar Islas, Margarita Valadez Sánchez, Oscar Casas Mejía, David Pérez Rangel, Jaime estrada Trejo y a Omar Hernández García.

DEDICATORIA

A mi Padres,

Por la educación que me brindaron tanto de la vida, como académicamente, por su apoyo económico, por su comprensión, por su confianza, por el amor que me brindaron y por su apoyo incondicional en todo momento para realizar uno de mis sueños, terminar mis estudios de doctorado que sienta un precedente en nuestra familia.

A mi amada esposa e hija por el apoyo y ánimo que me brindaron día a día para alcanzar nuevas metas, tanto profesionales como personales. Cuando parecía que me iba a rendir, siempre estuvieron a mi lado para apoyarme.

A toda mi familia,

Porque a pesar de todos los sucesos familiares, siempre han estado presentes en toda mi vida, gracias por su comprensión y apoyo incondicional en todo momento.

Índice

Índice - - - - -	-2
Índice de figuras -- - - - -	5
Resumen - - - - -	7
Abstract - - - - -	8
Introducción - - - - -	9
Angiogénesis - - - - -	9
Etapas de la angiogénesis- - - - -	11
Switch angiogénico - - - - -	14
Mecanismos de la angiogénesis-- - - - -	16
Angiogénesis y transducción de señales en células endoteliales-- - - - -	17
La célula endotelial - - - - -	18
Migración celular endotelial - - - - -	19
Células Tip - - - - -	20
RhoGTPasas - - - - -	21
RhoGTPasas en la polaridad celular - - - - -	25
RhoGEFs - - - - -	27
Mecanismo general de la regulación de los RhoGEFs - - - - -	30
Regulación de los RhoGEFs - - - - -	31
Regulación por interacciones proteína-proteína- - - - -	31
Regulación por Segundos Mensajeros - - - - -	32
Modificación postraduccional- - - - -	32
RhoGEFs en las uniones celulares- - - - -	33
GEFs de la familia de Dock- - - - -	34
RhoGEFs en la formación de vasos sanguíneos - - - - -	35
Los GEFs son necesarios para la angiogénesis y la función vascular - - - -	38
Limitaciones y perspectivas de investigación actual- - - - -	38

Implicaciones clínicas	39
Justificación	40
Hipótesis	41
Objetivo General	41
Objetivos particulares	41
Estrategia experimental	42
Diseño de primers para las PCRs de todos los RhoGEFs identificados en el SMART, atípicos y convencionales	45
Análisis estructural	48
Análisis de la expresión de RhoGEFs en células endoteliales	
Microvasculares humanas (HMEC)	50
Curso temporal de estimulación con VEGF	50
Extracción de RNA total por el método de trizol	51
Retrotranscripción del RNA total	52
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	53
Electroforesis en geles de agarosa	54
Análisis de geles en el programa ImageJ	55
Protocolo de obtención de Tumor de LLC (carcinoma de pulmón de Lewis) en ratones desnudos	57
Aislamiento de células endoteliales tumorales (LLC) de ratón	59
Obtención de lisados de células HMEC	60
Western blot	60
Revelado del western blot	62
Resultados	63
Discusión	93
Conclusión	104
Perspectivas	105

Apendice	106
Análisis de la expresión de RhoGEFs en células endoteliales microvasculares (HMEC) estimulando a diferentes receptores, con medios condicionados de células de cáncer y en situación de hipoxia y resultados- -	107
Protocolo de aislamiento de células endoteliales tumorales y otros tejidos de Humano y resultados	111
Transfección de células HeLa con pCEFL-EGFP, myc-βPIX y pCEFL EGFP- β-PIX y resultados-	114
shRNA 3A GENERACIÓN: SISTEMA CONSTITUTIVO shRNA 3 ^a -	116
Transformación de bacterias <i>E.coli</i> DH5α-	117
Obtención de plásmidos pDSL_hpIG y pDSL_ hpIP a partir de un cultivo de <i>E. coli</i> crecidos en un volumen de 5 ml de medio LB-	118
Determinar la concentración de DNA	119
Protocolo para generación de lentivirus en el vector pDSL_hpIG y pDSL_hpIP, en células HEK293ft transfectadas	120
Aislamiento de células endoteliales HMEC infectadas con pDSL_hpIG- shRNA-ARHGEF7 por FACS (fluorescence-activated cells sorting) y resultados	124
Tablas	126
Referencias	132

Índice de figuras

Figura 1. Origen y formación de vasos sanguíneos y linfáticos - - - - -	10
Figura 2. La cascada angiogénica. Durante el proceso de la angiogénesis- - -	11
Figura 3. Angiogénesis Tumoral - - - - -	13
Figura 4. Modos de formación de vasos- - - - -	16
Figura 5. Diferencias moleculares fenotipos entre las células endoteliales Tip y Stalk - - - - -	21
Figura 6. Regulación de Rho GTPasas- - - - -	23
Figura 7. Rho GTPasas regulan los dos principales modos de polimerización de la actina - - - - -	25
Figura 8. RhoGTPasas y control de protrusiones celulares - - - - -	27
Figura 9. Rho GTPasa - - - - -	29
Figura 10. Esquema de las GTPasas y la familia de GEFs Dock - - - - -	35
Figura 11. Protocolo de estrategia experimental - - - - -	43
Figura 12. Pantalla principal de BLAST- - - - -	47
Figura 13. Resultados del BLAST - - - - -	48
Figura 14. Curso temporal de células HMEC estimuladas con VEGF - - - - -	50
Figura 15. Protocolo para la obtención de tumores de carcinoma de pulmón de Lewis - - - - -	58
Figura 16. Expresión de RhoGEFs en células HMEC - - - - -	64
Figura 17. Numero de publicaciones indexadas de RhoGEFs y RhoGEFs endoteliales - - - - -	65
Figura. 18 identificación de aminoácidos del RhoGEF que participan en la interacción con su GTPasa correspondiente - - - - -	66
Figura 19. Análisis estructural de la interacción de RhoGEF-GTPasa- - - - -	68
Figura 20. Árbol filogenético de RhoGEFs humanos- - - - -	70
Figura 21. Expresión de RhoGEFs en células endoteliales HMEC- - - - -	71
Figura 22. Expresión de RhoGEFs en células HUVEC - - - - -	72

Figura 23. Expresión de RhoGEFs en células endoteliales de ratón IMEC 30 ciclos	-73
Figura 24 Tamaño de los tumores de LLC	-75
Figura 25. Expresión de RhoGEFs en células endoteliales aisladas de tumores de carcinoma de pulmón de Lewis (TEC)	- 75
Figura 26. Expresión de RhoGEFs del grupo1A en diferentes tipos celulares endoteliales	- 76
Figura 27. Expresión de RhoGEFs del grupo1B en diferentes tipos celulares endoteliales	-77
Figura 28. Expresión de RhoGEFs del grupo2A en diferentes tipos celulares endoteliales	-79
Figura 29. Expresión de RhoGEFs del grupo2B en diferentes tipos celulares endoteliales	-82
Figura 30. Caracterización de RhoGEFs atípicos en células endoteliales HMEC	-85
Figura 31. Análisis de la expresión de RhoGEFs endoteliales empleando RT-PCR a 35 ciclos de amplificación y uso de RNA total de células HEK293T	- 86
Figura 32. Caracterización y normalización del cDNA de células endoteliales estimuladas a diferentes tiempos con VEGF	- 88
Figura 33. RhoGEFs inducibles por VEGF en células endoteliales HMEC	- 89
Figura 34. Expresión de RhoGEFs en proteína a 3horas de estímulo con VEGF	- 90
Figura 35. Características estructurales y análisis de expresión de los GEFs de la familia de DOCK en células endoteliales	- 91
Figura 36. Esquema de curso temporal para la obtención RNA de células endoteliales HMEC estimuladas con medios condicionados de células de cáncer	-106
Figura 37. Expresión de RhoGEFs en células endoteliales con diferentes estímulos	-108
Figura 38. Perfil de RhoGEFs de tumor de cáncer de mama	-113
Figura 39. Clonación y expresión del RhoGEF ARHGEF7	- 115
Figura 40. Expresión de pDSL-hpIG-shRNA β -PIX en células HMEC y HUVEC	-125

Resumen

En la angiogénesis tumoral está involucrada la migración de células endoteliales en respuesta a factores angiogénicos derivados del tumor. La migración de células endoteliales requiere de la activación de GTPasas de la familia de Rho. Estas GTPasas son activadas por complejos de proteínas multidominio conocidos como factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (RhoGEFs), los cuales son regulados estrechamente por interacciones proteína-proteína, modificaciones postraduccionales y cambios dinámicos en la concentración local de segundos mensajeros, en particular lípidos. Nosotros enfocamos nuestro estudio en dilucidar la expresión diferencial de RhoGEFs en células endoteliales humanas (HMEC y HUVEC), células endoteliales de ratón (IMEC) y células endoteliales aisladas de tumores de ratón (TEC). Así como en la expresión de RhoGEFs en células endoteliales HMEC estimuladas con VEGF a diferentes tiempos. También se analizó a nivel de proteína la expresión de algunos RhoGEFs seleccionados. Analizamos el complejo RhoGEF-GTPasa con el programa Cn3d para identificar los aminoácidos que participan en la interface. Probamos la hipótesis: Existe una expresión diferencial de RhoGEFs relacionada al proceso de migración endotelial y angiogénesis tumoral. Resultados: Primero realizamos un análisis bioinformático para identificar a los RhoGEFs existentes en el genoma humano y murino. Se diseñaron primers específicos y con RNA de buena calidad realizamos RT-PCRs obteniendo los siguientes resultados: en células HMEC se expresaron 47 RhoGEFs del grupo identificado en la base de datos SMART, más 5 RhoGEFs atípicos, en HUVEC 52, en IMEC 53, y en TEC 49. Solo 11 RhoGEFs respondieron al estímulo de VEGF aumentado su expresión: FGD5, RASGRF2, ITSN1, AKAP13, VAV3, ARHGEF6, ARHGEF7, PREX2, PREX1 y PLEKHG1. Comprobamos la expresión de 8 RhoGEFs a nivel de proteína: ARHGEF1, ARHGEF2, ARHGEF12, ARHGEF7, TRIO, ITSN1L, PREX1 y Vav2. Identificamos a dos aminoácidos conservados, asparagina (N) y glutámico (E), que participan en la interfase del complejo RhoGEF-GTPasa. En el complejo DOCK-GTPasa identificamos una valina que se conserva y participa en la interfase de unión. En conclusión, nuestros estudios muestran que existe una diferencia en la expresión de los RhoGEFs en células endoteliales humanas (HMEC y HUVEC). En las células endoteliales murinas normales cultivadas in vitro y tumorales in vivo hay una expresión diferencial, sugiriendo que existen modificaciones genéticas en las células endoteliales tumorales in vivo, tal vez inducidas por el mismo entorno celular tumoral. Nuestro objetivo a largo plazo es la identificación de los RhoGEFs fundamentales en la angiogénesis inducida por el tumor y su caracterización como potenciales blancos terapéuticos.

Abstract

Tumoral angiogenesis involves endothelial cell migration in response to tumor-derived angiogenic factors. Endothelial cell migration requires the activation of Rho family GTPases. These GTPases are activated by complex multidomain proteins known as guanine nucleotide exchange factors (RhoGEFs), which are tightly regulated by protein-protein interactions, postranslational modifications and dynamic changes on the local concentration of second messengers, particularly of lipid origin. We elucidated the differential expression of RhoGEFs in human endothelial (HMEC and HUVEC) and mouse endothelial cells (IMEC) in vitro and isolated from tumors (TEC). Expression of RhoGEFs in HMEC endothelial cells stimulated with VEGF at different times was also analyzed, as well as, protein levels of selected RhoGEFs. With the Cn3d program, we analyzed representative structural complexes of RhoGEF-GTPase to identify interacting amino acids. We hypothesized the existence of a differential expression of RhoGEFs linked to endothelial cell migration and tumor angiogenesis. Results: We analyzed the expression of all RhoGEFs identified by our initial bioinformatic analysis in the human and murine genomes. Specific primers were designed and high quality RNA was prepared. By RT-PCR, in HMEC we detected 47 RhoGEFs (from those listed in the SMART database) plus 5 atypical RhoGEFs, 52 in HUVEC, 53 in IMEC and 49 in TEC. Only 11 Rho GEFs increased their expression in response to VEGF: FGD5, RASGRF2, ITSN1, AKAP13, Vav3, ARHEGF6, ARHGEF7, PREX2, PREX1, PLEKHG1. At protein level, the expression of ARHGEF1, ARHGEF2, ARHGEF7, ARHGEF12, TRIO, ITSN1L, PREX1 and Vav2 was confirmed. A couple of conserved aminoacids, asparagine (N) and glutamic acid (E), were identified at the interface between selected RhoGEFs and GTPases. At the binding interface of the DOCK-GTPase complex, a conserved valine was identified. In conclusion, our studies revealed a differential expression of RhoGEFs in human endothelial cells (HMEC and HUVEC) as well as in cultured normal murine endothelial cells and those isolated from tumors. Our data suggest that RhoGEFs adapt their expression in tumor endothelial cells. Our long-term goal is the identification of critical RhoGEFs implicated in tumor angiogenesis and their characterization as potential therapeutic targets.

Introducción

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Este proceso ocurre de forma natural durante el desarrollo y etapas posteriores, siendo esencial en la salud y viéndose alterado en diversos estados de enfermedad. Los vasos sanguíneos se encargan de la distribución de oxígeno y nutrientes y eliminan los productos de desecho de los tejidos. La formación de vasos sanguíneos debe ocurrir cuando se forma un tejido nuevo, así como en la reparación de heridas. La angiogénesis fisiológica se activa en el sistema reproductivo femenino, en la vascularización del endometrio durante el ciclo menstrual, en la implantación del embrión y en la formación de la placenta durante el embarazo. Todos estos casos son ejemplos normales de formación intensa de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis).

En el embrión, los vasos sanguíneos son indispensables para sostener el crecimiento de órganos, administrando el oxígeno necesario para su desarrollo. Aparte de su función nutritiva, los vasos proporcionan señales tróficas para promover la morfogénesis de los órganos. Los vasos sanguíneos surgen a partir de precursores endoteliales que comparten un origen con progenitores hematopoyéticos. Esta relación entre los sistemas sanguíneo y vascular arterial sigue siendo importante para la angiogénesis durante toda la vida, incluso en la enfermedad. Durante el desarrollo embrionario, las células progenitoras endoteliales se ensamblan para formar un laberinto primitivo vascular de pequeños capilares - un proceso conocido como vasculogénesis (Fig.1). Durante la fase de la angiogénesis, el plexo vascular se expande progresivamente por medio de vasos con brotes y remodelaciones en una red vascular altamente organizada y estereotipada de largos vasos ramificados en otros más pequeños (Fig.1). Los capilares recién formados se cubren por pericitos y células musculares lisas, éstas proporcionan fuerza y permiten regular la perfusión de los vasos, un proceso denominado arteriogenesis. El sistema linfático se desarrolla de manera diferente, ya que la mayoría de los vasos linfáticos se transdiferencian de las venas (1, 2).

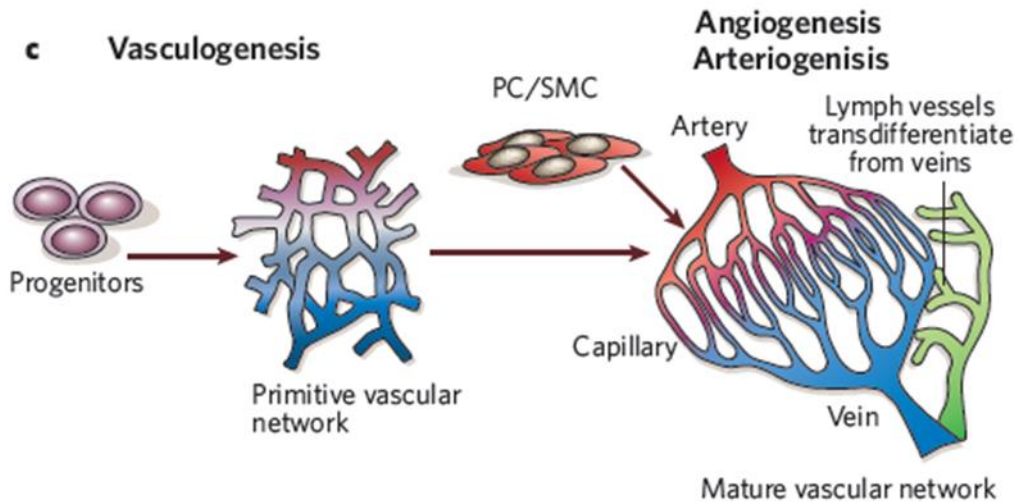


Fig.1 **Origen y formación de vasos sanguíneos y linfáticos.**

El desarrollo de los sistemas vasculares: durante la vasculogénesis, células progenitoras endoteliales dan lugar a un laberinto vascular primitivo de arterias y venas; durante la etapa posterior conocida como angiogénesis, la red se expande. Los nuevos capilares son cubiertos por pericitos (PC) y células de músculo liso (SMCs) dando lugar a una red vascular estereotípicamente organizada. Los vasos linfáticos se desarrollan a partir de la transdiferenciación de las venas (2).

Entonces, durante la angiogénesis brotan ramas laterales a partir de los vasos (a través de la delaminación y migración de células endoteliales) para colonizar las áreas avasculares en el embrión. Durante la remodelación vascular posterior, muchos de los vasos pequeños iniciales se unen, expanden y reorganizan dando lugar a la aparición de la red vascular madura de vasos de mayor tamaño que se extienden en ramas más pequeñas (3).

El cuerpo humano controla la formación de vasos sanguíneos mediante mecanismos de comunicación dependientes de la secreción de factores angiogénicos (factores de crecimiento que estimulan la formación de vasos sanguíneos) y factores angioestáticos (inhibidores endógenos de la formación de vasos sanguíneos). Cuando los factores angiogénicos están presentes en mayor cantidad que los factores angioestáticos la balanza se inclina a favor de la formación de vasos sanguíneos. Por el contrario, cuando los inhibidores están presentes en mayor cantidad que los estimulantes se detiene la formación de vasos sanguíneos. Existe una gran cantidad de factores que regulan la angiogénesis, así como un número importante de células que los producen, por lo que este proceso tiene particularidades en los diferentes tejidos y es llevado a cabo mediante diversas etapas que involucran múltiples pasos.

Etapas de la angiogénesis

La angiogénesis, en un número de condiciones fisiológicas y aberrantes, inicia con la degradación proteolítica de la membrana basal del vaso progenitor para que se forme un retoño capilar y ocurra la migración celular. Esto coincide con un aumento de la permeabilidad vascular que permite la extravasación de proteínas plasmáticas, mismas que establecen un andamio provisional para la migración de células endoteliales. Las células endoteliales migran hacia el estímulo angiogénico y proliferan. Así pues, entre las distintas etapas del proceso se reconoce la degradación de la matriz extracelular (ECM) por metaloproteasas de matriz (MMPs), la maduración de las células endoteliales que inhiben el crecimiento y el remodelado que se requiere para dar forma de los tubos. El reclutamiento de las células periendotheliales (pericitos), que sirven de sostén a los tubos endoteliales, además proporciona una función accesoria al vaso y libera factores de crecimiento secuestrados en la matriz extracelular (ECM). Todos estos pasos son regulados por las interacciones entre los factores de crecimiento, las células vasculares y la matriz extracelular (ECM) para ensamblar cordones tubulares ramificados (Fig. 2) (4)

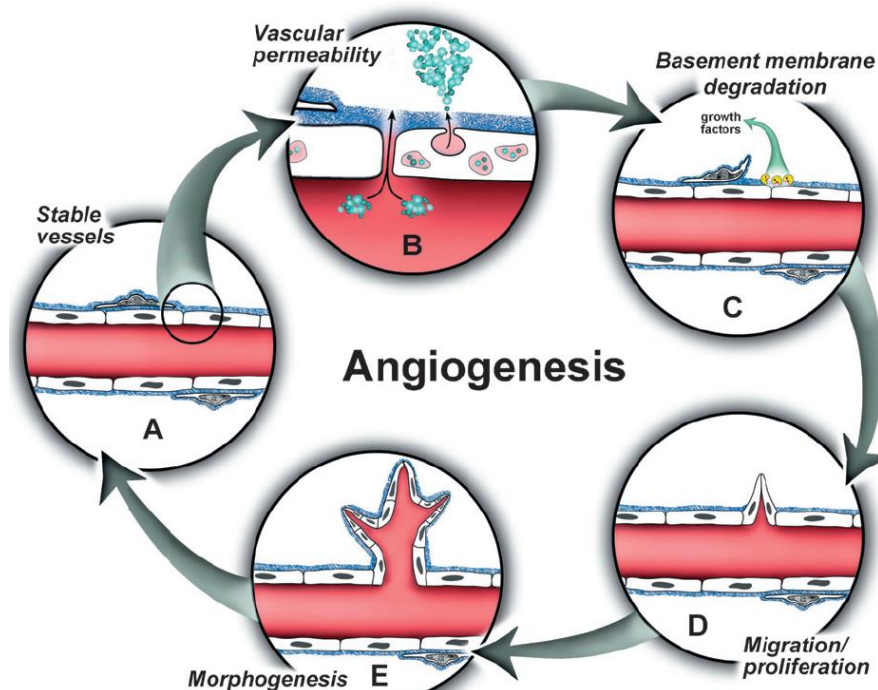


Fig. 2. La cascada angiogénica. Durante el proceso de la angiogénesis, los vasos estables (a) se someten a un aumento de la permeabilidad vascular (esto ha sido demostrado sólo bajo ciertas condiciones), que permite la extravasación de proteínas plasmáticas (b). La degradación de la ECM por MMP libera contactos pericitos-CE y libera factores de crecimiento secuestrados en la ECM (c). Entonces, las EC proliferan y migran hacia su destino final (d), ensamblando cordones que soportan el lumen (e). Matriz extracelular ECM; metaloproteinasas de matriz, MMP; CE, célula endotelial (5).

Angiogénesis patológica

Alteraciones en el crecimiento de los vasos sanguíneos tienen un impacto importante en nuestra salud y contribuyen a la patogénesis de muchos desórdenes, algunos bastante inesperados. Una lista larga de trastornos se caracteriza por una angiogénesis excesiva. Históricamente, los más conocidos son el cáncer, la psoriasis, la artritis y la ceguera, entre muchos trastornos comunes adicionales, de una lista que sigue creciendo. Varias enfermedades congénitas o heredadas también son causadas por una remodelación vascular anormal. Por el contrario, el crecimiento insuficiente de los vasos y la regresión anormal de ellos es causa de isquemia, de forma importante en el cerebro y el corazón. Estas alteraciones pueden conducir a neurodegeneración, hipertensión, preclamsia, dificultad respiratoria, osteoporosis y otros trastornos. Por lo que tanto la angiogénesis como el crecimiento capilar arterial son blancos para la terapia (1).

Angiogénesis y Cáncer

Al igual que los tejidos normales, los tumores necesitan de un suministro de sangre. Este lo consiguen a través de promover la formación de nuevos vasos sanguíneos que se extienden en el tumor (angiogénesis tumoral). Como consecuencia, los tumores crecen gracias a los nutrientes y factores de crecimiento que obtienen a través de los vasos cuya formación ellos mismos promovieron. Por lo tanto, en la búsqueda de nuevos enfoques para destruir a las células cancerosas, algunos medicamentos que inhiben la angiogénesis han sido exitosos y otros están bajo estudio.

Angiogenesis tumoral

La angiogénesis es esencial para el desarrollo y expansión del cáncer. Un tumor incipiente no puede crecer más allá de 1-2 mm a menos que junto con él se formen vasos sanguíneos que le permitan obtener nutrientes y oxígeno, así como eliminar CO₂ y metabolitos finales tales como urea y ácido láctico.(6).

Uno de los principales mecanismos mediante los cuales los tumores promueven la formación de nuevos capilares es a través de la señalización del VEGF. Este factor de crecimiento activa a receptores VEGFR2 presentes en células endoteliales. Este sistema ha sido caracterizado como la principal vía que activa la angiogénesis gracias a sus múltiples efectos en células

endoteliales, entre los que se incluyen promover la migración, proliferación y supervivencia, además de que causa un aumento en la permeabilidad vascular. La producción de VEGF y otros factores de crecimiento conduce en los tumores al proceso conocido como 'switch angiogénico', que resulta en una formación rápida de una nueva vasculatura hacia adentro y alrededor del tumor, lo que le permite crecer de forma exponencial (Fig.3) (7).

Los vasos tumorales que se forman bajo la influencia del VEGF distan de tener características normales, dando lugar a estructuras poco funcionales. Los vasos sanguíneos tienen una forma irregular, tortuosa, con extremos sin salida y fallas en la jerarquía estructural, puesto que no están organizados en vénulas, arteriolas y capilares. Esto puede derivar en fugas de carácter hemorrágico, lo que frecuentemente conduce a alta presión intersticial. Puesto que el flujo sanguíneo del tumor no es óptimo, se genera un estado de hipoxia que da lugar a una producción adicional de VEGF. Por lo tanto, se establece un bucle de retroalimentación positiva, por el cual el tumor sigue produciendo VEGF. Esto asegura que se mantenga la vasculatura del tumor inmadura, pero también significa que la vasculatura del tumor es consistentemente anormal. Este papel central del VEGF en la producción de la vasculatura del tumor lo ha convertido en un blanco racional para terapia contra el cáncer (8, 9).

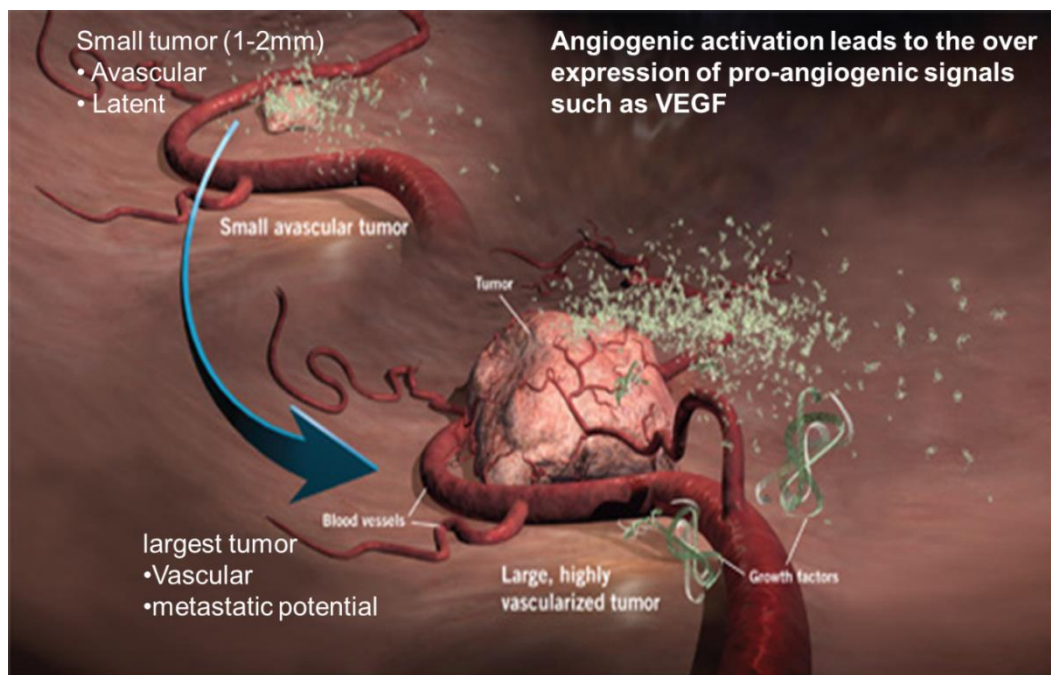


Fig. 3. Angiogenesis Tumoral

Switch angiogénico

El crecimiento rápido de vasos sanguíneos asociados a tumores, conocido como *switch* angiogénico depende de la expresión de genes pro-angiogénicos estimulada por la hipoxia, así como de la activación de oncogenes o mutación de supresores de tumores. El *switch* angiogénico puede ocurrir en diferentes etapas de la progresión del tumor, dependiendo del tipo de tumor y del microambiente tumoral.

Entre los factores que favorecen el *switch* angiogénico se encuentran diversos mediadores que activan la migración y proliferación de células endoteliales a través de receptores con actividad de tirosina cinasa. Ejemplos de ellos son el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF). Además, existen otros que activan a receptores de diversas familias, como los acoplados a proteínas G, tales como los de ácido lisofosfatídico (LPA).

Por el contrario, existen factores que inhiben el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos. El primer inhibidor angiogénico descrito es la trombospondina-1, ésta modula la proliferación de células endoteliales y la motilidad. Sorprendentemente, muchas moléculas inhibitorias, como "estatinas", se derivan de proteínas más grandes que no tienen efecto sobre la angiogénesis. Ejemplos de ello son la angiostatina (fragmento de plasminógeno que se une a ATP sintasa y anexina II), así como la endostatina, tumstatina y canstatina (fragmentos de colágenas que se unen a las integrinas). En general, los niveles de activadores e inhibidores dictan si una célula endotelial estará en reposo o en un estado angiogénico. Se cree que un desequilibrio hacia la predominancia de factores angiogénicos da lugar al *switch angiogénico* Tabla1 (9, 10).

Table I Endogenous regulators of angiogenesis

Activators	Inhibitors
Growth factors	
Vascular endothelial growth factor family	
Acidic and basic fibroblast growth factor	
Angiogenin	
Angiostatin	
Transforming growth factor	
Tumor necrosis factor- α	
Plated-delivered endothelial growth factor	
Hepatocyte growth factor	
Epidermal growth factor	
Placental growth factor	
Granulocyte colony stimulating factor	
Cytokines	
Interleukin-1	
Interleukin-6	Interleukin-10
Interleukin-8	Interleukin-12
Proteases and protease inhibitors	
Cathepsin	Tissue inhibitor metalloprotease
Gelatinase A, B	Prasminogen activator-inhibitor-1
Stromelysin	
Urokinase-type plasminogen activator	
Trace elements	
Copper	Zinc
Oncogenes	
c-myc ras	p53 Rb
c-src v-raf	
c-jun	
Endogenous modulators	
Alpha 5 Beta 3 integrin	Angiopoietin-2
Angiopoitin-1	Angiotensin
Angiostatin II (AT1 receptor)	Angiostatin II (AT2 receptor)
Endothelin	Caveolin-1, -2
Erythropoietin	Endostatin
Hypoxia	Interferon-alpha
Nitric oxide synthase	Isoflavones
Plated-activating factor Platerat factor 4	
Prostaglandin E	
Prolactin (16 kd fragment)	

Abbreviations: AT1, angiotensin-1; AT2, angiotensin-2.

(11)

El estudio de la angiogénesis tumoral ha sido considerado importante para establecer un posible papel pronóstico de la angiogénesis tumoral en la evaluación de cáncer, y fundamental para descubrir nuevas blancos farmacológicos para tratamientos de neoplasias malignas.

Mecanismos de angiogénesis

Los tumores pueden llevar a la formación de vasos sanguíneos a través de diversos mecanismos, no siempre derivados de los brotes de las células endoteliales. Las células tumorales pueden aprovecharse de los vasos preexistentes, o bien promover intususcepción, crecimiento microvascular, vasculogénesis posnatal, angiogénesis glomeruloide o vasculogénesis mimética (Fig.4) (12, 13).

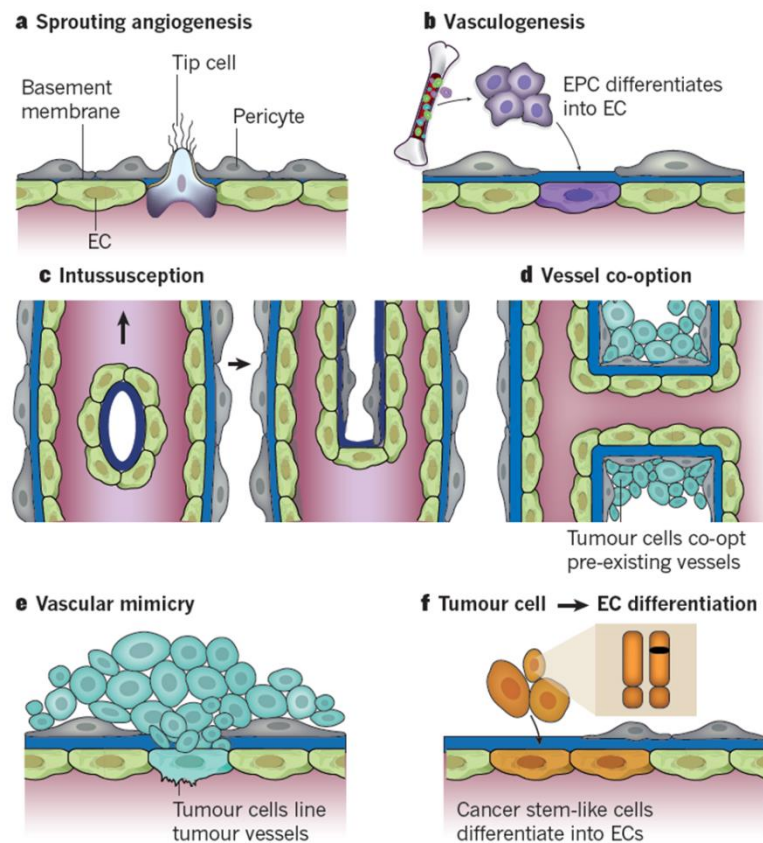


Fig. 4. Modos de formación de vasos.

Hay varios mecanismos conocidos de formación de vasos sanguíneos en los tejidos normales y en tumores. a-c, la formación de vasos puede ocurrir por brotación angiogénica (a), por reclutamiento de células progenitoras endoteliales derivadas de la médula ósea (EPC) que se diferencian en células endoteliales (EC, b), o por un proceso de división de vasos conocido como intususcepción (c). d-f, las células tumorales pueden cooptar con vasos preexistentes (d), o los vasos tumorales pueden ser revestidos por células tumorales (mimetismo vascular; e), o por las células endoteliales, con anomalías citogenéticas, posiblemente derivadas de células *stem* cancerosas (f). A diferencia de los tejidos normales, que utilizan brotes de angiogénesis, vasculogénesis y la invaginación intestinal (a-c), los tumores pueden utilizar los seis modos de formación de vasos (a-f) (13).

La hipoxia promueve la activación de la vía de señalización molecular hasta ahora mejor conocida que conduce la vascularización tumoral. Sin embargo, también un amplio y diverso espectro de aberraciones genéticas se asocia con el desarrollo del "fenotipo angiogénico." Con base a este conocimiento, se han

desarrollado diversas estrategias terapéuticas antivasculares en la última década. Estas terapias específicas consideran la etapa de progresión del tumor, el tipo de neovascularización del tejido canceroso y la maquinaria molecular responsable del proceso de neovascularización. Otro desafío es encontrar las combinaciones más adecuadas de terapias antivasculares que puedan contribuir a optimizar terapias tradicionales como la radioterapia y la quimioterapia.

Angiogénesis y transducción de señales en células endoteliales.

Las células endoteliales reciben de su entorno información compleja que eventualmente las lleva a progresar a lo largo de todas las etapas del proceso de formación de nuevos vasos. Diversas señales angiogénicas promueven proliferación de células endoteliales, aumento de la resistencia a la apoptosis, cambios en el equilibrio proteolítico, reorganización del citoesqueleto, migración y, por último, diferenciación y formación de una nueva luz vascular. Los principales receptores transmembranales que transducen señales angiogénicas son receptores con actividad de tirosina cinasa, receptores acoplados a la proteína G, receptores asociados-tirosina-cinasa y receptores con actividad de cinasa de serina-treonina. Las células endoteliales angiogénicas deben proliferar, producir moléculas capaces de degradar la matriz extracelular, cambiar sus propiedades adhesivas, migrar, evitar la apoptosis y, por último, se diferencian en nuevos tubos vasculares. Todos estos procesos están controlados por las señales recibidas por las células endoteliales de su entorno. Todas estas vías forman cascadas que conducen a la transcripción de genes y una red de señales cruzadas que determinan el comportamiento final de la célula. Las vías de transducción de señales entre los receptores de la superficie implicados en la angiogénesis y los efectores finales que determinan el comportamiento celular sólo se conocen parcialmente. Es importante mencionar que en varias vías de señalización angiogénicas, tales como las cascadas de las MAP cinasas o la vía PI3K/Akt, se comparten con las que conducen a la proliferación de células tumorales y la invasión. No debe sorprender que en un futuro los inhibidores angiogénicos capaces de interferir en alguna vía de señalización intracelular también presenten actividad antitumoral. Por otro lado, algunos de los mecanismos de

señalización implicados en la angiogénesis son compartidos por procesos de desarrollo. Este es el caso de Notch, Sonic Hedgehog, Wnt/Fzd/ β catenina o aquellos mediados por genes cluster Hox. Esta observación plantea interrogantes sobre la evolución de los mecanismos angiogénicos y sobre el origen mismo de la célula endotelial, un tipo de célula excepcional entre los metazoos. Es concebible que los mecanismos filogenéticamente primitivos de señalización que regulan los cambios entre fenotipos epiteliales y mesenquimales se han conservado evolutivamente y pueden dar cuenta de las diferencias pendientes entre la célula endotelial en reposo y la célula endotelial angiogénica (14).

Las vías de transducción de señales que rigen la angiogénesis tumoral son blancos lógicos para la manipulación farmacológica, dado el importante papel que desempeñan en el crecimiento y desarrollo de los cánceres. Las células tumorales son genéticamente inestables y biológicamente heterogéneas, lo que se ha considerado la causa principal del fracaso de las quimioterapias sistémicas. Por otro lado, se cree que las células endoteliales en el estroma del tumor son genéticamente estables, y que no generaran resistencia a los medicamentos en respuesta a la terapia anti-vascular, además de que se encuentran accesibles al estar formando el lumen de los vasos sanguíneos (15).

Como se ha mencionado, las células endoteliales son de gran importancia, ellas son las primeras que migran en respuesta a un estímulo angiogénico, se encuentran formando el lumen del vaso sanguíneo; además son células más estables, lo que las hace un blanco terapéutico atractivo.

La célula endotelial

Todo el sistema vascular se compone de una monocapa de células endoteliales. En un adulto, el endotelio se compone de aproximadamente 10^{13} células, formando casi 1 kg de "órgano". El endotelio vascular es versátil y multifuncional. Tiene muchas propiedades sintéticas y metabólicas, incluyendo la regulación de la trombosis y la trombólisis, la adhesión de plaquetas, la modulación del tono vascular y el flujo sanguíneo, y la regulación de las respuestas inmunes e inflamatorias mediante el control de leucocitos,

monocitos y linfocitos por medio de interacciones con la pared del vaso. Las perturbaciones de la estructura y la función endotelial pueden dar lugar a estados patológicos como la aterosclerosis, la disfunción hemostática, y una respuesta inflamatoria e inmune alterada (5, 16).

La célula en migración tiene una morfología asimétrica con un borde delantero y un borde trasero. El borde delantero forma proyecciones y se une al sustrato subyacente a través de nuevos contactos. La contracción y las fuerzas de tracción liberan el acoplamiento celular en el extremo distal, lo que lleva a su retracción.

Migración celular endotelial

Las células endoteliales migran durante la formación de vasos sanguíneos. La migración de células endoteliales es un proceso crucial durante toda la vida. Se inicia en el embrión temprano, donde la formación del sistema circulatorio precede a la de todos los otros sistemas de órganos. Después de que se ha formado una red vascular primitiva, la angiogénesis conduce a la formación de un sistema vascular funcional complejo. Esto requiere del movimiento y ajuste morfológico constantes de las células endoteliales. En el organismo adulto, las células endoteliales adquieren movilidad durante el proceso de angiogénesis que ocurre en situaciones fisiológicas y patológicas, incluyendo la cicatrización de heridas, la regeneración de tejidos y el desarrollo del cáncer.

Migración de células endoteliales durante la angiogénesis

La gran mayoría de las células endoteliales en los vasos sanguíneos son quiescentes con poca migración y actividad proliferativa. Cuando las demandas nutricionales y de oxígeno dentro de un tejido exceden la alimentación proporcionada por los vasos sanguíneos existentes, el tejido envía señales que estimulan la formación de nuevos vasos sanguíneos. Luego, las células endoteliales se transforman en un fenotipo 'activado' y comienzan a migrar y proliferar para formar nuevos vasos. Este proceso implica no sólo el desplazamiento celular sino también una dinámica constante en la forma de la célula hasta adquirir una forma tubular estable. Esta dinámica celular incluye morfogénesis de brotes, crecimiento por Intussuscepción, por división,

remodelación, estabilización y diferenciación en arteriolas, vénulas y capilares. La migración de células endoteliales en un brote angiogénico es guiada por un proceso directo y orientado por señales del medio ambiente local. Estas señales se proporcionan a menudo por las células circundantes (17).

La célula endotelial en migración dispone de mecanismos que conducen a la formación de adhesiones focales que dependen de la acción de integrinas, que son receptores que reconocen a proteínas de matriz extracelular. Todo este proceso requiere de la participación crucial de GTPasas pequeñas de la familia de Rho. La actividad de Rac, Cdc42 y Rho, los miembros más representativos de esta familia de GTPasas, está sujeta a la señalización de diversos grupos de receptores, incluidas las integrinas, que afectan a la polimerización de actina y la formación de protuberancias celulares.

La migración de células endoteliales requiere de la intervención de múltiples proteínas de transducción de señales que potencialmente podrían ser inhibidas con fines terapéuticos. Se ha postulado que la caracterización de las diferencias sutiles en la señalización migratoria de las células endoteliales puede permitir el desarrollo de fármacos antiangiogénicos que bloqueen la migración asociada a patologías como la angiogénesis tumoral, entre otras, pero que no interfieran con la función endotelial fisiológica (18).

Células endoteliales líderes (*Tip*)

La angiogénesis depende de la participación de varios tipos de células endoteliales especializadas, cada una con distintas especificaciones de destino celular, para construir una rama funcional. Particularmente destacan las células endoteliales líderes (*tip*), seguidas de las "*stalk*" y eventualmente "*phalanx*", teniendo cada una de ellas una función especializada en la ramificación del vaso y establecimiento de una nueva rama capilar (Fig.5) (19). La célula líder (llamada en inglés *tip cell*) conduce el camino generando filopodios que se extienden hacia el estímulo angiogénico (20). Esta célula se diferencia de sus vecinas en un capilar como consecuencia de la acción espacio-temporal de estímulos angiogénicos que detecta y ante los que responde reconociendo las señales de orientación en el microambiente, similar a la forma de un cono de crecimiento axonal en el sistema nervioso. Por ello no

es de extrañar que varias clases de moléculas, utilizados por la navegación de axones o células epiteliales, son evolutivamente conservadas y compartidas.

Las células "*stalk*" siguen a las células líderes, alargando el brote. Estas células proliferan, forman uniones, establecen la matriz extracelular, y forman el lumen. Las células "*phalanx*" son las células endoteliales más quiescentes, recubren los vasos una vez que las nuevas ramas se han consolidado. Están cubiertas por los pericitos, se pegan entre sí mediante uniones estrechas y están incrustadas en una membrana basal gruesa. Estas células se dedican a optimizar el flujo de sangre, la perfusión tisular, y la oxigenación (20-22).

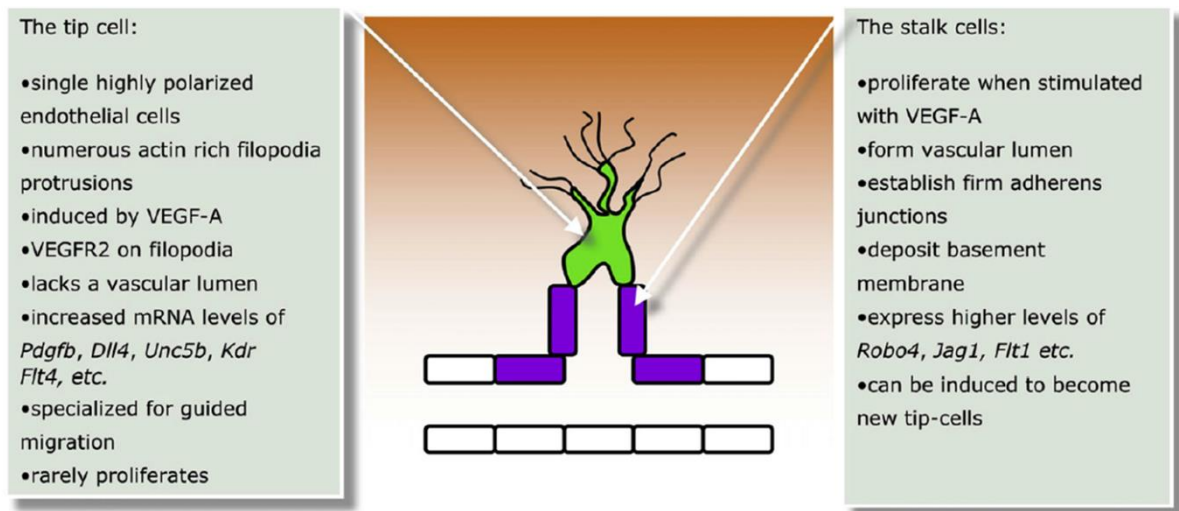


Fig.5 Diferencias moleculares fenotipos entre las células endoteliales *Tip* y *Stalk*

Celulas *Tip* o líder (verde) dirigen cada brote vascular siguiendo un gradiente extracelular de VEGF-A (naranja), y las células endoteliales siguientes son *stalk* (púrpura) que forman el lumen (23).

Rho GTPasas

Las GTPasas de la familia de Rho regulan procesos celulares fundamentales como el control del tamaño celular, proliferación, apoptosis/sobrevivencia, metabolismo de lípidos, migración, ajustes en la morfología y polaridad celulares, adhesión, tráfico vesicular y regulación transcripcional. Las Rho GTPasas son fundamentales para la migración celular, ya que regulan la fuerza motriz necesaria para que este proceso ocurra a través de la regulación

de la polimerización del citoesqueleto de actina y el ensamble de complejos contráctiles de actomiosina (24, 25).

La participación de las Rho GTPasas en la migración celular fue identificada por primera vez hace alrededor de 20 años. En todos los modelos animales probados está claro que las GTPasas de la familia de Rho juegan un papel fundamental en la migración de prácticamente todos los tipos celulares, particularmente cuando este proceso depende de la polimerización de actina, remodelado del citoesqueleto y contracción de fibras constituidas por actina y miosina. En el caso particular de la migración de células endoteliales, las GTPasas Rac1 y Cdc42 son importantes en la formación de brotes angiogénicos. Rac1 se requiere para los brotes de células endoteliales *in vitro* y la contractilidad actina-miosina suprime la brotación. El complejo ELMO/DOCK180 constituye un Rac GEF que actúa a través de Rac1 y PAK para proteger a las células endoteliales de la apoptosis y por lo tanto promueve indirectamente la formación de vasos sanguíneos.

Para sostener la estabilidad de las uniones adherentes entre las células que migran colectivamente, es importante mantener activa a Rac1 en la parte frontal de las células principales.

La GTPasa RhoJ resulta particularmente interesante porque se requiere para la angiogénesis tumoral en ratones. Actúa mediante la reducción de la actividad Rho/Rock. El poder localizar a la RhoGTPasa activa en tiempo real *in vivo* podría aumentar nuestra comprensión de cómo se regulan estos cambios dinámicos en la migración. Hasta ahora, la mayoría de los estudios sobre migración se han centrado en las proteínas Rho, Rac y Cdc42, y sabemos relativamente poco sobre cómo miembros atípicos de la familia de Rho contribuyen a la migración *in vivo* (26).

Las Rho GTPasas constituyen una familia dentro de la superfamilia de las GTPasas pequeñas relacionadas con Ras y se encuentran en todas las células eucariotas. En mamíferos, existen veintidós genes que codifican para Rho GTPasas. De acuerdo a sus homologías, estas GTPasas han sido clasificadas en varios subgrupos: tres isoformas Rho A, B, y C; tres isoformas Rac 1, 2 y 3; Cdc42, RhoD, Rnd1, Rnd2, RhoE / Rnd3, RhoG, TC10 (RhoQ) y TCL (RhoJ);

RhoH / TTF; Chp y Wrch-1; Rif, RhoBTB1, y 2; y Miro-1 y 2. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiene 5 proteínas Rho (Rho 1, 2, 3, y 4 y Cdc42), mientras que en los genomas de *C. elegans* y *Drosophila melanogaster* existen 10 y 11, respectivamente. Al igual que otras GTPasas fundamentales en diversos procesos de transducción de señales, las RhoGTPasas actúan como interruptores moleculares que oscilan entre un estado activo unido a GTP y un estado inactivo unido a GDP. Esta actividad está controlada por los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) que catalizan el intercambio de GDP por GTP para llevar a la GTPasa a un estado activo con afinidad por sus proteínas efectoras (27), por proteínas activadoras de la capacidad hidrolítica de la GTPasa (GAP) que estimulan la actividad GTPasa intrínseca para hidrolizar al GTP e inactivar a la GTPasa debido a una disminución en la afinidad por sus efectores; y por inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDIs) (Fig.6), cuyo papel es bloquear la activación espontánea (25, 28).

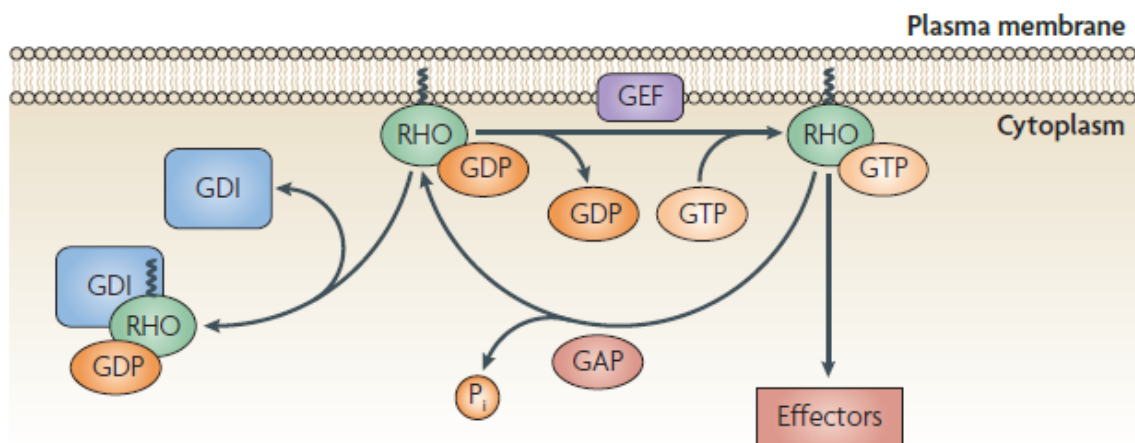


Fig. 6. Regulación de Rho GTPasas. Esta figura muestra una Rho GTPasa genérica anclada a la membrana con un grupo prenil cerca del extremo carboxilo terminal (línea en zig zag). La GTPasa incorpora GDP o GTP. Los factores de intercambio de nucleótidos guanina (GEFs) catalizan la liberación del GDP de la GTPasa, permitiendo al GTP unirse. Proteínas que promueven la actividad catalítica de la GTPasa (GAPs) causan que el GTP sea hidrolizado a GDP y fosfato (Pi). Los GEFs y GAPs suelen asociarse a membranas. Las proteínas Rho unidas a GDP pueden ser secuestradas por los inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina Rho (GDIs), que se unen al grupo prenil y de ese modo inhiben la unión de la GTPasa a la membrana. Las proteínas Rho que tienen GTP unido transducen señales mediante la interacción directa y activación de sus proteínas efectoras (28).

Las Rho GTPasas pueden ser reguladas por modificaciones postraduccionales tales como fosforilación o ubiquitinación; sin embargo, el grado en que estas

modificaciones covalentes participan en la fisiología normal no está claro. Es en el estado activo, unido a GTP, que las Rho GTPasas realizan su función de regulación a través de una interacción específica con proteínas blancos (efectores). Más de 50 efectores se han identificado hasta ahora para Rho, Rac, y Cdc42 que incluyen cinasas de serina/treonina, cinasas de tirosina, cinasas lipídicas, lipasas, oxidasas, y proteínas de andamiaje. De acuerdo al gran número de blancos que se han examinado estructuralmente, estos comúnmente existen en una conformación inactiva, cerrada, que cambia después de la unión a la GTPasa. Sin embargo, es posible que las GTPasas también pudieran servir para reclutar blancos a lugares específicos (29).

Citoesqueleto de actina

La activación de Rho, Rac o Cdc42 conduce el ensamble de filamentos de actina-miosina, protusiones como lamelipodios y filopodios (ricos en actina) (30). Estos efectos específicos sobre el citoesqueleto de actina, controlados por cada GTPasa, permiten tanto la formación (polimerización de la actina) y la organización (la agrupación de filamentos) de filamentos de actina por medio de una serie de vías de transducción de señales bien definidas. La polimerización de actina en las células eucarióticas ocurre a través de las actividades coordinadas de factores nucleadores que favorecen la polimerización de actina, como Arp2/3 y forminas. En tanto que el remodelado de las fibras es regulado por proteínas que cortan filamentos y proteínas que se unen a los extremos (proteínas de *capping*), o bien lateralmente.

Arp2/3

Aunque Rac y Cdc42 conducen a protuberancias morfológicamente distintas en la membrana plasmática (es decir, lamelipodios y filopodios respectivamente), ambas GTPasas inician la polimerización de actina periférica a través del complejo Arp2/3. Esta maquinaria de nucleación de actina, que se encuentra en todas las células eucariotas; se asocia lateralmente a filamentos de actina para generar ramificaciones (Fig.7). Ambas GTPasas activan indirectamente a Arp2/3 a través de los miembros de la familia de proteínas del síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP). La GTPasa, en su forma unida a GTP, se une directamente a N-WASP, para liberar la interacción auto-inhibitoria y

exponer el C-terminal donde está el sitio de activación para la unión de Arp2/3. La activación de Arp2/3 por Rac está mediada por proteínas de la familia WAVE (Fig.7), que aunque estructuralmente relacionadas con la N-WASP, no interactúan directamente con la GTPasa.

Forminas

El otro mecanismo importante para inducir la polimerización de actina en células eucariotas es a través de la familia de las proteínas forminas. En particular, Rho estimula la polimerización de actina en células de mamíferos a través de mDia1 (y posiblemente mDia2), proteínas relacionadas a la formina *Diaphanous*. La formina mDia es un blanco directo de Rho (29).

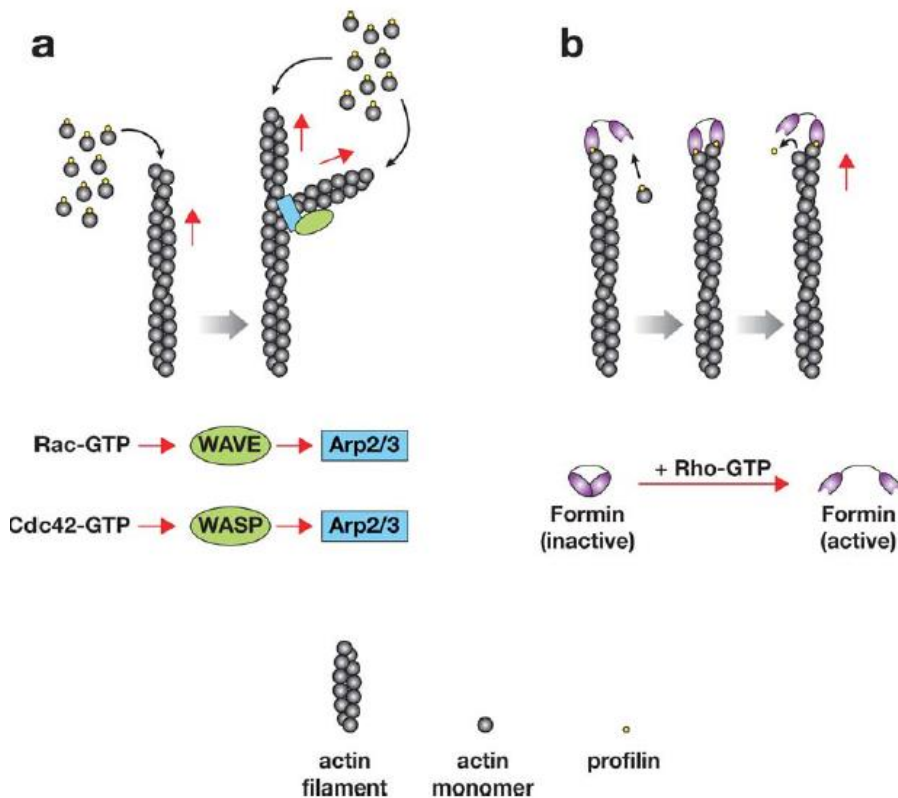


Fig. 7. Rho GTPasas regulan los dos principales modos de polimerización de la actina. (a) Rac y Cdc42 activan Arp2 / 3 a través de WAVE (proteínas de la familia WASP) y WASP, respectivamente, para iniciar una red de filamentos ramificados. (b) Rho activa forminas promover la elongación lineal de filamentos en los extremos de barbados(29).

RhoGTPasas en la polaridad celular

La migración celular direccional depende de la polaridad celular que influye en la formación de los bordes anterior y posterior de células. Una célula típica

polarizada migrando presenta protuberancias celulares, tales como filopodios y lamelipodios en la parte delantera y un complejo de adhesión focal en la parte posterior (Fig.8). La migración celular direccional se logra mediante la formación de protrusiones celulares polarizadas en la parte delantera y la contracción de las fibras de estrés en el borde posterior. Las GTPasas de la familia de Rho - RhoA, Rac1 y Cdc42 - juegan un papel crucial en el control de la polaridad celular. Estas tres Rho GTPasas regulan diferentes aspectos de la dinámica del citoesqueleto. Cdc42 se ha demostrado estar involucrada en el control del citoesqueleto de actina presente en protrusiones conocidas como filopodios. Rac1 promueve la formación de lamelipodios –protrusiones grandes, aplanadas y ruffles - mediante la regulación de la polimerización de actina. Las tres isoformas de Rho - RhoA, RhoB y RhoC - pueden inducir la formación de fibras de estrés. Un modelo general establece que en las células polarizadas las Rho GTPasas Rac1 y Cdc42 están activadas en la parte delantera, donde promueven la formación de protuberancias celulares, mientras que RhoA está activa en la parte trasera, donde controla la contracción celular. Además, se ha establecido una inhibición mutua entre Rac1 y RhoA. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que las tres GTPasas pueden ser activas en el frente de la migración de las células, donde RhoA tiene un papel en los acontecimientos iniciales de la protuberancia, mientras que Rac1 y Cdc42 están implicados en el refuerzo y estabilización de protrusiones recién expandidas. Además de su papel en la dinámica de la actina, las Rho GTPasas también controlan la adhesión polarizada al sustrato durante la migración direccional. Pequeñas estructuras de complejos focales se localizan en el lamelipodio de la mayoría de células que migran y son importantes para la unión del lamelipodio que se extiende a la matriz extracelular. Se ha demostrado que Rac se requiere para el ensamble del complejo focal. Complejos focales pueden ser desensamblados o pueden madurar y convertirse en adhesiones focales inducidas por RhoA. Para muchas células, la etapa final del ciclo de migración consiste en la retracción de la parte de atrás para avanzar. Esta contracción del cuerpo de la célula depende de la contractilidad actina-miosina y puede ser regulada por RhoA a través de ROCK (también conocida como cinasa-Rho) que afecta la

fosforilación de la cadena ligera de la miosina (MLC), mediante la inhibición de la fosfatasa MLC y por lo tanto la fosforilación de MLC (31).

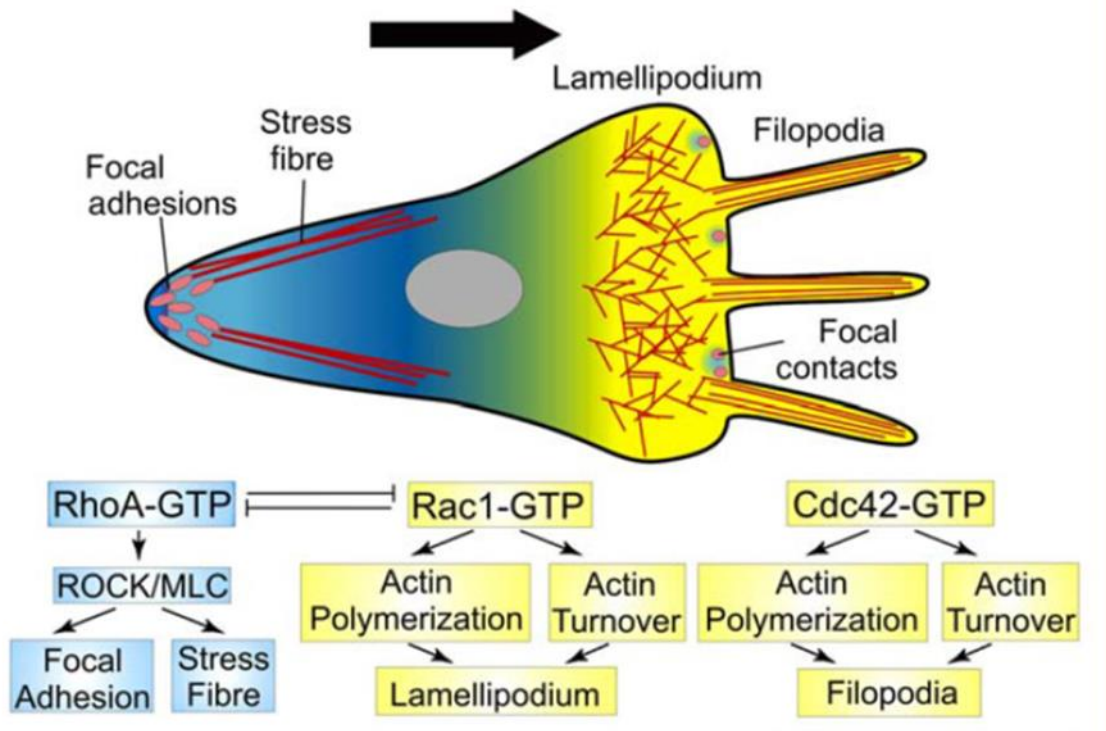


Fig. 8. RhoGTPasas y control de protrusiones celulares (31).

RhoGEFs

Las GTPasas pequeñas de la familia de Rho son activadas por factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) que promueven el intercambio de GDP, presente en estado inactivo, por GTP que conduce a la activación de la GTPasa. El primer GEF identificado en células de mamífero es conocido como Dbl (por sus siglas en inglés “*diffuse B-cell-lymphoma*”). Este GEF fue aislado como un oncogén en 1985 y se demostró que activa a la GTPasa Cdc42 humana (27, 32, 33).

Los GEFs proporcionan un enlace entre receptores de la superficie celular para diversas citocinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión y receptores acoplados a la proteína G y la activación de GTPasas de la familia

de Rho. Se ubican arriba de las proteínas Rho en las cascadas de transducción de señales de forma que la activación de Rho GEFs es esencial para coordinar el proceso migratorio.

Existen aproximadamente 80 RhoGEFs en el genoma humano, codificados por dos familias de genes no relacionados: la familia Dbl, que comprende 69 miembros y la familia Dock, con 11 miembros (Fig.9). La familia Dbl se caracteriza por la presencia de un dominio catalítico (DH) *Dbl homology*, seguido por dominio adyacente (PH) *pleckstrin homology*, en el C-terminal del dominio DH. El dominio DH consta de alrededor de 240 aminoácidos y el PH se compone de aproximadamente 100 aminoácidos. Juntos, en la mayoría de los casos, proporcionan la unidad mínima estructural que se requiere para catalizar la reacción de intercambio de nucleótidos de guanina *in vivo* (34, 35). En la mayoría de los GEFs, los dominios DH-PH están flanqueados por una diversa gama de dominios de interacción proteína-proteína e interacción proteína-lípidos. Estos dominios ayudan a regular la actividad catalítica intrínseca de cada Rho GEF, su localización intracelular, y su asociación con otras proteínas.

El número RhoGEFs existentes es aproximadamente cuatro veces mayor que el número de Rho GTPasas. Esto significa que una sola GTPasa puede ser activada por múltiples GEFs, lo que indica cierta superposición o redundancia en sus funciones. Además, varios RhoGEFs pueden activar a más de una GTPasa, por lo que el número efectivo de RhoGEFs que puede actuar sobre una sola Rho GTPasa es aún mayor. Hay por lo menos 25 RhoGEFs que pueden activar a cada una de las principales proteínas Rho: RhoA, Rac1 y Cdc42. Este número es probablemente subestimado, ya que las características específicas de muchos RhoGEFs no han sido completamente estudiadas. Dado que la mayoría de RhoGEFs se expresa ampliamente, los diferentes tipos celulares cuentan en cualquier momento con un número importante de RhoGEFs para cada una de las GTPasas. La diversidad en la estructura de dominios presentes en los diversos RhoGEFs permite que estos puedan ser regulados por diferentes vías de señalización, llevando a que diferentes estímulos puedan conducir a la activación de una o varias GTPasas a través

de la intervención de varios GEFs con una misma especificidad o bien de un GEF con actividad sobre varias GTPasas (36).

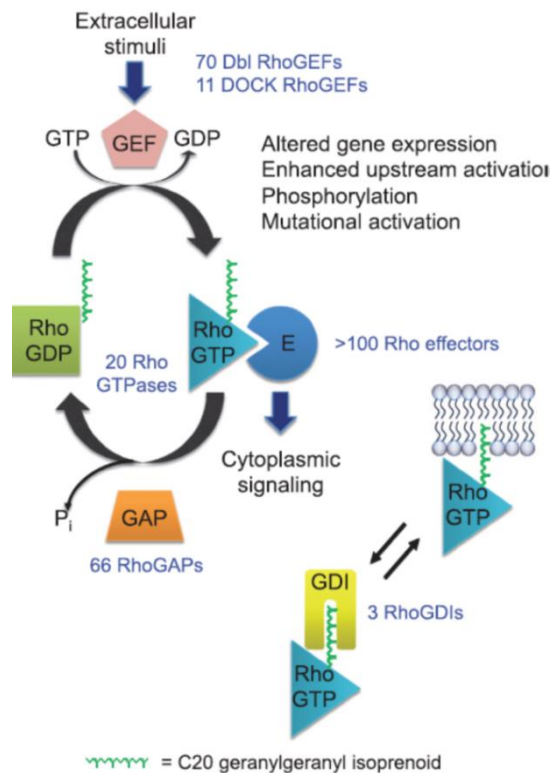


Fig. 9. Rho GTPasas. En humanos, la familia de GTPasas de Rho está compuesta por 20 miembros. La mayoría ciclan entre los estados inactivo, unido a GDP, y activo, unido a GTP. A diferencia de RhoGEFs y RhoGAPs que poseen dominios compartidos y secuencias de identidad, lo que permite la determinación precisa del número codificado en el genoma humano, la mayoría de los efectores de las Rho GTPasas carecen de un dominio/motivo reconocimiento bien definido. La información que aquí se ilustra aplica principalmente a RhoA, Rac1, Cdc42 y isoformas relacionadas. No todas las GTPasas Rho están reguladas por GEFs, GAPs y/o GDIs. No todas son modificadas postraduccionalmente por un lípido isoprenoide geranylgeranyl, y algunos no tienen elementos blanco conocidos en la membrana (35).

Un análisis bioinformático de la estructura de todos los RhoGEFs, tanto humanos como sus homólogos de ratón, muestra que el 40% contiene un motivo putativo de unión a PDZ en el carboxilo-terminal. La familia de Dock también contiene dominios de unión a PDZ. Los dominios PDZ son dominios de interacción proteína-proteína que actúan como proteínas de andamiaje (*scaffolds*) para concentrar moléculas de señalización en regiones especializadas de la célula. Se ha propuesto que la interacción entre RhoGEFs y proteínas con dominios PDZ es un mecanismo general que controla la localización y activación de los RhoGEFs, ayudando a restringir y concentrar la señalización de diversas RhoGTPasas en destinos subcelulares apropiados. Esta interacción es importante en la regulación de los RhoGEFs (37-39).

Mecanismo General de los GEFs

La mayoría de las proteínas G pequeñas tienen una afinidad comparable tanto por GDP como por GTP, ubicada en el orden nanomolar. La consecuencia directa de esta alta afinidad es una tasa lenta de disociación de nucleótidos, con una vida media del orden de una o más horas. Debido a que el intercambio de GDP por GTP y, por tanto, la activación de las proteínas G en los procesos biológicos ocurre a mucho mayor velocidad, en un lapso de minutos o incluso menos, el intercambio de GDP por GTP requiere ser catalizado de forma dependiente de la actividad de GEFs, esto para llevarlo a velocidades biológicamente relevantes. De hecho, los GEFs aceleran la reacción de intercambio en varios órdenes de magnitud. Los GEFs son a menudo el blanco de señales biológicas que promueven, inhiben o modulan su actividad catalítica. Los GEFs catalizan la disociación del nucleótido de la proteína G. Esto ocurre mediante la modificación estructural del sitio de unión, de tal forma que se reduce la afinidad y, por lo tanto, se libera el nucleótido que es inmediatamente reemplazado. En general, la afinidad de la proteína G por GTP y GDP es similar, así que el aumento resultante de GTP unido a la GTPasa, en lugar de GDP, se debe a la mayor abundancia de GTP celular en comparación con GDP, que es aproximadamente diez veces mayor. Por lo tanto, la interacción de un GEF debilita la afinidad de la GTPasa por el nucleótido, y viceversa, el nucleótido debilita la afinidad por el GEF. En el curso de la reacción de intercambio, el GEF desplaza el nucleótido unido, y posteriormente un nuevo nucleótido desplaza el GEF (40-42).

Respecto a cómo funciona el GEF para debilitar la afinidad de los nucleótidos, se sabe que el nucleótido unido a la proteína G se intercala en un nicho flanqueado por dos asas, conocidas como switches (1 y 2). En esta unión es importante la participación del ion de magnesio. Varios estudios enfocados en aspectos estructurales han establecido un modelo para la acción del GEF sobre la proteína G. Estos han revelado que los dominios catalíticos de las distintas familias de GEFs no necesariamente están estructuralmente

relacionados y hay ejemplos en que estos se acercan a las proteínas G desde diferentes ángulos. Sin embargo, todos ellos utilizan principios similares para deformar el sitio de unión de nucleótidos. La unión del GEF induce cambios conformacionales particularmente en las regiones de los switches y en una sección conocida como el bucle P, de forma que el resto de la estructura queda en gran medida sin perturbar (43). De acuerdo a estos estudios, la interacción del GEF ocluye estéricamente el sitio de unión de magnesio, esto perturba la superficie de interacción en la unión a fosfato, dejando la región de unión sin inmutarse. Como consecuencia de ello, los grupos fosfato del nucleótido de guanina se liberan después de la unión del GEF, y la base del nucleótido entrante se une por primera vez cuando se empieza a desplazar al GEF.

Regulación de los GEFs

Casi todos los GEFs son proteínas multidominio reguladas de una manera muy compleja. Entre los mecanismos descritos se incluyen aquellos que dependen de interacciones proteína-proteína o lípido-proteína, la unión de segundos mensajeros y modificaciones postraduccionales (33). Estas interacciones y modificaciones inducen uno o más cambios principales: una translocación a un compartimento específico de la célula donde se encuentra la proteína G pequeña, la liberación de un mecanismo de autoinhibición por un dominio o región de flaqueo que cubre la superficie de unión para la proteína G pequeña, o bien la inducción de cambios alostéricos en el dominio catalítico (43).

Regulación por interacciones proteína-proteína

Ejemplos destacados de la activación alostérica de un RhoGEF por una interacción proteína-proteína lo constituyen los RhoGEFs regulados por proteínas G heterotriméricas del grupo de G13. Estos RhoGEFs: p115-RhoGEF, PDZ-RhoGEF y LARG se activan en las cascadas de señalización de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y conducen a la activación de la GTPasa Rho. Estos RhoGEFs contienen un dominio RGS (regulador de la señalización de la proteína G) que se une a las subunidades $G\alpha_{12}$ y $G\alpha_{13}$ de las proteínas G heterotriméricas. Esta interacción induce la actividad de RhoGEF y al mismo tiempo estimula la actividad GTPasa de la subunidad $G\alpha$.

Otro ejemplo: Tiam1, un GEF para la familia de Rho, contiene un dominio RA, que se une específicamente a Ras GTP y por lo tanto vincula la señalización Ras a la señalización de Rac (44-46).

Regulación por Segundos Mensajeros

Existen varios ejemplos de GEFs que son regulados directamente por segundos mensajeros comunes, tales como cAMP, Ca^{2+} , y diacilglicerol (DAG). Como se ha indicado, la mayoría de los Rho GEFs cuenta con una región catalítica de consta de un dominio conservado en tándem DH/PH (33). El dominio DH interactúa con la proteína G y media la actividad de GEF. La función del dominio PH, comúnmente considerado como un dominio de unión lípidos del grupo del fosfato fosfatidilinositol, es divergente entre distintos grupos de GEFs. De hecho, el análisis estructural ha demostrado que la orientación relativa del dominio PH hacia el dominio DH es completamente diferente en diversos GEFs (33). Como consecuencia, el dominio PH tiene diferentes funciones. Por ejemplo, en Sos el dominio PH tiene una función de autoinhibición, mientras que en Dbs y PDZ-RhoGEF el dominio PH interactúa con la proteína G y mejora la actividad catalítica. El grado en que la unión de fosfato de fosfatidilinositol (PIP) influye en la actividad catalítica del dominio PH o contribuye al anclaje a la membrana, no está totalmente claro y puede ser diferente para los dominios PH individuales. En el caso de Sos, éste se regula moderadamente por PIP3, mientras que Intersectina, Dbs, y Tiam1 no fueron sensibles a la influencia del PIP. De hecho, los residuos que participan en la interacción de dominios PH de unión a lípidos son muy poco conservados en los dominios DH y PH (47, 48).

Modificación postraducciona

Varios RhoGEFs se caracterizan por tener una región de autoinhibición en el N-terminal que bloquea al dominio DH. Tales GEFs resultan en variantes activas cuando el N-terminal es removido (27). En este sentido, uno de los ejemplos mejor caracterizados es Vav, un GEF para la GTPasa Rac. Este se compone de tres regiones, una región autoinhibitoria en el N-terminal con un dominio de homología a calponina (CH), una región ácida (Ac) con tirosinas conservadas, una región catalítica central con un módulo DH-PH y una región

con un dominio de dedos de Zn en el C-terminal, una secuencia rica en prolina, y un módulo de SH3-SH2-SH3. La conformación inactiva de Vav tiene una forma cerrada, con el dominio CH-Ac cerca del dominio DH, en el sitio de unión para Rac. Esta interacción inhibitoria es perturbada por una fosforilación en tirosina, liberando de este modo el sitio catalítico. Esta fosforilación está mediada por cinasas del grupo de Src. Vav es reclutado como adaptador de proteínas fosforiladas en tirosina a través de su dominio SH2. Curiosamente, el dominio de dedos de Zn sirve como un sitio de acoplamiento para las proteínas Rho (40).

RhoGEFs en las uniones intercelulares

Las Rho GTPasas tienen un papel fundamental en la formación de uniones intercelulares. Son activadas por RhoGEFs específicos que regulan la adhesión celular. Se ha reportado que los RhoGEFs Syx (Synectin-binding RhoA exchange factor) y TEM4 (Tumor endotelial marcador 4, también llamado ARHGEF17) son específicos para activar a la GTPasa RhoA. El RhoGEF Syx (PLEKHG5) es esencial en el mantenimiento de las uniones intercelulares y en la función de barrera de las células endoteliales. Este RhoGEF está involucrado en procesos de migración endotelial y la angiogénesis en modelos de pez zebra y ratón. A nivel celular, este RhoGEF es reclutado a los contactos celulares por su sitio de unión a PDZ que se encuentra en su c-terminal, esta región interacciona con Mupp1 (esta proteína contiene varios dominios PDZ) y Crumbs formando un complejo de polaridad. Cuando se utilizó shRNA para Syx en células Huvec, esto produjo una reducción de impedancia trans-endotelial y alteraciones en la localización de la actina cortical, VE-cadherina y ZO-1. Consistente con estas observaciones, el *knockout* de Syx (PLEKHG5) en ratón presenta fugas en los capilares, lo que sugiere que este RhoGEF tiene un papel determinante en la estabilidad de las uniones y la permeabilidad de los vasos tanto *in vivo* como *in vitro* (49, 50). Mientras que la localización de TEM4 en las uniones intercelulares requiere del dominio N-terminal y la interacción con el complejo cadherina-catenina. Estos hallazgos evidencian la existencia de mecanismos independientes que promueven la participación de RhoA en la formación y mantenimiento de uniones intercelulares. También sugieren que el acoplamiento selectivo de la

activación de RhoA a Día 1 y/o ROCK es fundamental para determinar la integridad de las uniones endoteliales y tiene un papel en la regulación de la migración celular endotelial (51).

El RhoGEF β -PIX (también llamado ARHGEF7), es un GEF para Rac y Cdc42 que se une a Scribble y Shank, dos proteínas con dominio PDZ. Estas proteínas se unen al motivo de unión a PDZ de β -PIX reclutándolo a la membrana plasmática. En este caso, tales interacciones tienen un papel en la regulación de diferentes procesos celulares como exocitosis y endocitosis mediada por receptor. Además, β -PIX se une a Rac y a Cdc42 activando a PAK (37).

GEFs de la familia de Dock

La familia de GEFs Dock (*dedicator of cytokinesis*, también conocida como Zizimin o CZH) ha sido caracterizada más recientemente. En mamíferos, los 11 miembros de la familia de Dock han sido implicados en procesos de migración celular y fagocitosis y parecen desempeñar un papel destacado en la invasión de células tumorales. Las proteínas Dock no son homólogas a los RhoGEFs de la familia de Dbl, por lo que su función como GEFs tiene bases estructurales completamente distintas y su especificidad está restringida hacia Rac y Cdc42, sin ser capaces de estimular a RhoA. Los GEFs DOCK se caracterizan por la presencia de un dominio catalítico conservado, conocido como región de homología a Dock (*Dock Homology Region 2*, DHR2), sin homología con dominios DH, y un dominio de unión a fosfolípidos: C2-Dock-B, C y D (DHR1), que puede anclar a estos GEFs a la membrana (36).

Las proteínas Dock se dividen en cuatro subfamilias. Dos de las cuales, Dock-A y Dock-B, actúan específicamente en Rac y pueden ser moduladas por ELMO, una proteína de andamiaje. Las proteínas Dock-D solamente actúan sobre Cdc42, mientras que los miembros Dock-C muestran especificidad dual. Los GEFs Dock1, Dock2 y Dock3 son específicos para Rac1, mientras que Dock9 (que también se conoce como zizimin1) es específico para Cdc42 (33). Curiosamente, ninguna proteína Dock ha mostrado hasta ahora actividad hacia Rho. La actividad de GEF de los miembros de la familia de Dock reside en el dominio DHR2, una región de alrededor a 400 aminoácidos ubicada hacia la

región C-terminal de la proteína. Los dominios DHR2 no muestran homología de secuencia con los dominios DH de cualquier otro GEF para las GTPasas pequeñas. Además, tampoco muestran parecido estructural, según se aprecia en el análisis de la estructura del dominio DHR2 de DOCK9. En esencia, la formación de complejos entre los GEF y el GDP unido a la GTPasa induce cambios conformacionales alrededor del sitio de unión de nucleótidos. Estos cambios conformacionales, junto con la pérdida de magnesio, promueven la liberación del GDP y la formación de un complejo estable GTPasa-GEF. Subsecuentemente, la unión de GTP revierte los cambios conformacionales inducidos por el GEF, quedando la GTPasa en su conformación activa, unida a GTP. Esta reacción se produce en múltiples pasos reversibles en los que el complejo trimérico transitorio de GTPasa-nucleótido-RhoGEF se sustituyen por un binario de GTPasa libre de nucleótido GEF y viceversa (Fig.10) (52).

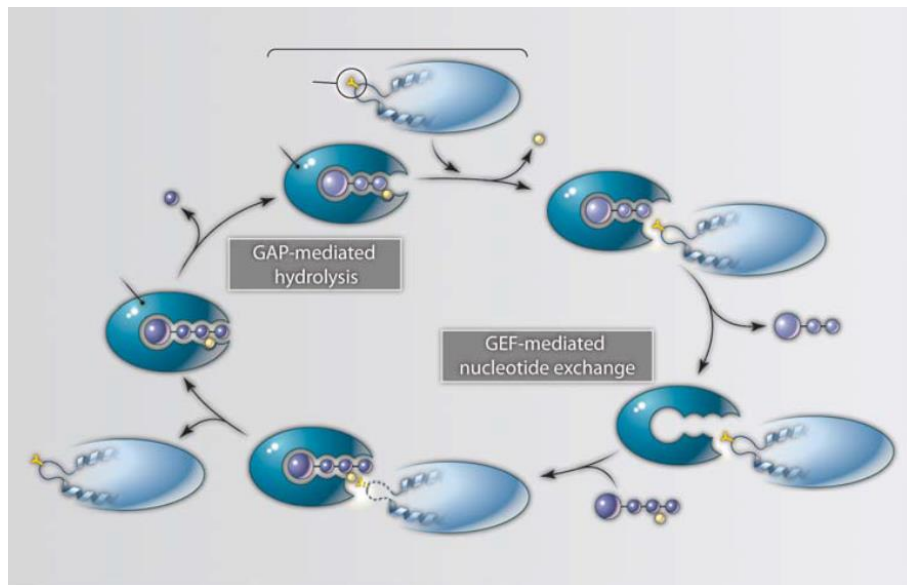


Fig. 10 Esquema de las GTPasas y la familia de GEFs Dock (52)

RhoGEFs en la formación de vasos sanguíneos

Los GEFs regulan varios pasos específicos de la cascada angiogénica como la formación de un brote vascular que depende de la migración de células endoteliales y funciones de las células de músculo liso. Un ejemplo es Fgd5, un GEF para Cdc42 que disminuye la angiogénesis *in vitro* e *in vivo*. El knockdown de Fgd5 resulta en un aumento en la angiogénesis en células

endoteliales vasculares *in vitro*. Aparentemente Fgd5 se expresa exclusivamente en células endoteliales. Se ha demostrado que Fgd5 se encuentra en la cascada de señalización de VEGF, conduciendo a la activación de Cdc42 (53, 54). Vav2 es un GEF ampliamente expresado que activa a Rac en las células endoteliales. Vav3 es un GEF para Rac1 estrechamente relacionado. Las células endoteliales deficientes de Vav2/3 muestran menos migración *in vitro*. Por el contrario, cuando estos GEFs se sobreexpresan conducen a un aumento en la activación de Rac1 y de la migración celular. Estos mecanismos también se han demostrado *in vivo* y son relevantes en entornos tumorales donde se ha visto que la deficiencia de Vav2/3 conduce a una menor densidad de los vasos del tumor y a crecimiento tumoral en modelos de tumores murinos con aloinjerto. Vav2 participa en la señalización VEGFR-2 y Ephrin-A1 que conduce a la activación de Rac1. Esto es esencial para la formación de un brote vascular en la angiogénesis (55).

RhoA es un regulador funcional importante tanto de la angiogénesis como de la función vascular. Por ejemplo, el GEF ARHGEF15 (también conocido como Vms RhoGEF) está altamente expresado en las SMC vasculares en varios órganos. Durante la embriogénesis, también se expresa en las células endoteliales (56).

En la vasculatura, la estimulación mecánica que actúa sobre las células endoteliales regula tanto la morfogénesis como la remodelación de vasos en procesos fisiológicos y patológicos. Los GEFs son un vínculo importante entre la dinámica de la red de microtúbulos (MT) y las Rho GTPasas. A diferencia de las propias GTPasas, los GEFs pueden unirse directamente a los microtúbulos y actuar como adaptadores de proteínas Rho en MTs. El GEF para RhoA conocido como GEF-H1 es el homólogo humano del Lfc murino e interactúa con los MT. El GEF-H1 es un eslabón en la dinámica de acoplamiento de MT a la reorganización del citoesqueleto de actina. En base a esta característica, el GEF-H1 está vinculado a la regulación de la permeabilidad endotelial dependiente de RhoA. El GEF-H1 sólo estimula a RhoA cuando no está unido a los microtúbulos; por lo tanto, su localización subcelular determina su función. *In vitro*, el knockdown de GEF-H1 conduce a un aumento en la permeabilidad endotelial y la formación de fibras de estrés de actina, lo que

indica que GEF-H1 es necesario para mantener el equilibrio entre la permeabilidad endotelial y la integridad de la barrera (57-59).

Tiam1 es un GEF específico para Rac1. Tras la estimulación con PAF (Factor activador de plaquetas) (60), Tiam1 induce un aumento en la permeabilidad de la barrera endotelial por el debilitamiento de las uniones intercelulares entre las células endoteliales. Además, promueve la migración de células, dependiente de Rac1. La expresión de Tiam1 se correlaciona con la densidad microvascular linfática (45). Otro GEF que presenta una localización subcelular específica es ITSN2L. ITSN2L es un GEF específico para Cdc42, que regula la endocitosis de las caveolas e interactúa con la red de actina en células endoteliales. El knockdown de ITSN2L en células endoteliales disminuye la remodelación de la red de actina (61-63). El GEF Asef es necesario para la angiogénesis inducida por bFGF y VEGF. Este GEF es activado en la vía de la PI3K y la proteína supresora de tumores APC (poliposis adenomatosa coli). Varios ligandos extracelulares desencadenan vías que convergen en Asef tales como HGF y EGF. En ratones Asef $-/-$ se observa una disminución de la angiogénesis tumoral y un deterioro del crecimiento tumoral (64, 65). El GEF P-Rex1, específico para Rac1, es un integrador de señal relevante en las células endoteliales. Este GEF participa en la señalización de GPCRs, receptores para factores de crecimiento y otro tipo de Receptores como el de TNF- α . Un elemento común en la señalización que activa a este GEF es la PI3K (34, 66).

El GEF p115-RhoGEF se ha visto implicado en la permeabilidad endotelial. La trombina altera la barrera endotelial vía las proteínas heterotriméricas G12/13 a través de la vía p115-RhoGEF-RhoA-ROCK. Además, los GEFs son influenciados por la interacción con otras proteínas reguladoras (67).

El GEF ECT2 es un GEF para RhoA que contiene una secuencia de localización nuclear y está implicado en la regulación del ciclo celular, la polaridad celular y otras funciones celulares básicas. ECT2 puede tener actividad oncogénica. Este GEF interactúa con la proteína KLEIP, perteneciente a la familia de proteínas BTB-Kelch, de forma necesaria para la activación de RhoA inducida por VEGF y los subsecuentes brotes de angiogénesis *in vitro* (68, 69). Otro ejemplo de la regulación adicional de las

vías de GEFs es el complejo ELMO1/Dock180. Este complejo ha sido identificado como un regulador esencial de la angiogénesis en el pez cebra. La netrina-1 se une a Unc5B y activa Rac1 vía ELMO1/Dock180 que es crucial para la morfogénesis vascular en el pez cebra (34, 70, 71).

Los GEFs son necesarios para la angiogénesis y la función vascular

La angiogénesis es un proceso complejo que involucra a las Rho GTPasas como reguladores maestros de la angiogénesis. Los GEFs que activan a tales GTPasas integran la información de diversas señales extracelulares y vías celulares logrando una regulación específica que responde a condiciones espacio-temporales particulares. En consecuencia, varios GEFs son necesarios para la formación correcta de vasos sanguíneos *in vitro* e *in vivo*. Aparte de desarrollo vascular, las Rho GTPasas influyen en la función vascular. Al contribuir a la proliferación de SMC y la migración, controlan procesos como arteriogénesis o engrosamiento de la pared del vaso.

Limitaciones y perspectivas de investigación actual

Pocos RhoGEFs se han investigado de forma explícita en cuanto a sus funciones en la biología vascular. Pocos datos *in vitro* están disponibles y aún menos datos *in vivo*. En el futuro, se necesitarán modelos *knockout* específicos endoteliales condicionales para dilucidar el papel de diferentes RhoGEFs en la angiogénesis y la fisiología vascular. Algunos RhoGEFs son necesarios para el desarrollo vascular embrionario, sin embargo más adelante pueden jugar un papel diferente. Es deseable tener modelos *knockout* inducibles para algunos RhoGEFs y probarlos en etapas adultas. Hay algunas limitaciones de la investigación actual sobre RhoGEFs. Un ejemplo es la falta de información primaria sobre la localización, estado de activación e interacciones relevantes arriba de éstos. Otra limitación es la complejidad y redundancia de las redes de señalización de las cuales los RhoGEFs forman parte. Ellos mismos están influenciados por diversos estímulos, por ejemplo hipoxia, cinasas, otras proteínas, o incluso otras Rho GTPasas. Su estado de activación depende del efecto neto de múltiples estímulos y transmisión de la señales. Dos enfoques diferentes son necesarias para comprender estas redes intrincadas: obviamente, las partes individuales de cascadas de señalización de los GEFs

tienen que ser caracterizadas bioquímicamente. Sin embargo, la experiencia previa con algunos RhoGEFs muestra que no siempre podemos predecir su comportamiento en ambientes fisiológicos por medio de experimentos bioquímicos *in vitro*. En consecuencia, la investigación bioquímica convencional no es suficiente en un entorno tan extenso y redundante de señalización. En los últimos años, un número considerable de herramientas están disponibles para describir este tipo de redes, por ejemplo los modelos computacionales de redes biológicas, que deben aplicarse a la señalización de los RhoGEFs.

Implicaciones clínicas

Aunque las Rho GTPasas son reguladores clave de procesos clínicamente relevantes, no son blancos atractivos de drogas. Tanto RhoA como Rac1 y Cdc42 se expresan en diversos tejidos y órganos, por lo tanto, modular directamente su función con fines terapéuticos podría tener efectos negativos. En oposición a esto, el papel único de los diversos RhoGEFs como activadores directos de diversas Rho GTPasas en un contexto específico tiene un mayor grado de posibilidades de acercamiento terapéutico. A medida que adquiramos una mejor comprensión de estos mecanismos, los RhoGEFs pueden surgir como blancos farmacológicos potenciales. Clínicamente, diversas funciones en que los RhoGEFs están implicados podrían ser explotadas. Existen hallazgos que demuestran que la interferencia farmacológica en la activación de RhoGEFs podría ser posible bajo circunstancias específicas. Una posibilidad es inhibir su expresión mediante siRNA, pero esto todavía no está disponible en la farmacología clínica (34). Este amplio potencial farmacológico de los RhoGEFs deberá ser sustentado por estudios básicos en los que se caracterice su expresión y mecanismos de regulación en un contexto patológico como la angiogénesis tumoral. Es por ello que en este trabajo nos enfocamos precisamente en investigar la expresión de RhoGEFs en células endoteliales normales y aisladas de tumores, así como el efecto del factor de crecimiento de endotelio tumoral en su expresión.

JUSTIFICACIÓN

La migración celular juega un papel clave en el proceso de angiogénesis tumoral. El interés de nuestro laboratorio se centra en determinar los mecanismos moleculares que regulan la migración polarizada de células endoteliales y células endoteliales progenitoras, fundamentales para la formación de vasos sanguíneos tumorales. El descubrimiento de elementos moleculares capaces de impedir la migración de células endoteliales y células precursoras de vasos sanguíneos posee un gran potencial para el diseño de terapias anti-angiogénicas, útiles para prevenir el crecimiento de tumores que dependen del suministro sanguíneo. En particular, nos interesan los elementos capaces de ensamblar complejos de transducción de señales, en especial los RhoGEFs, requeridos para el movimiento celular polarizado como mediadores de la activación de GTPasas de la familia de Rho en las cascadas de transducción de señales angiogénicas.

HIPÓTESIS

Existe una expresión diferencial de RhoGEFs relacionadas al proceso de migración endotelial y angiogénesis tumoral.

OBJETIVO

Caracterizar la expresión de RhoGEFs en células endoteliales normales, tumorales y bajo la influencia de estímulos asociados al proceso de migración celular vinculada a la angiogénesis tumoral

OBJETIVOS PARTICULARES

- ✧ Determinar el perfil de expresión de RhoGEFs en células endoteliales y el efecto del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) en la expresión de tales RhoGEFs en células endoteliales.
- ✧ Determinar la expresión de RhoGEFs en endotelio tumoral
- ✧ Determinar la expresión de los RhoGEFs atípicos (no considerados por la base de datos SMART) y los GEF no convencionales (Dock) en células endoteliales HMEC
- ✧ Determinar la influencia de estímulos angiogénicos y medios condicionados de células tumorales en la expresión de RhoGEFs

Estrategia experimental

El objetivo central de este trabajo fue caracterizar la expresión de RhoGEFs endoteliales. Nos enfocamos en este grupo de proteínas por considerarlas clave en la activación de GTPasas de la familia de Rho, fundamentales en procesos de migración y polarización celular indispensables en eventos de angiogénesis tumoral. Hicimos un análisis exhaustivo incluyendo a todas aquellas proteínas que en su secuencia tuvieran un dominio que caracteriza a los RhoGEFs (el DH, dominio catalítico), seguido de un dominio PH u otro dominio que lo localice en la membrana como el dominio BAR, para activar a la GTPasa. O bien un dominio de homología con Dock. Utilizando el programa Cn3D, analizamos las estructuras que se encuentran en bases de datos públicas, en las que se ha revelado las bases de la interacción entre RhoGEFs y GTPasas. Identificamos los aminoácidos que participan en la interacción y cuáles de esos aminoácidos se conservan. Establecimos, por RT-PCR, el perfil de expresión de RhoGEFs en células endoteliales humanas y de ratón. Establecimos el efecto del VEGF en la expresión de RhoGEFs en células HMEC. Por otro lado, con perlas magnéticas aislamos células endoteliales de tumores de ratón con cáncer de Lewis (LLC), y estudiamos en ellas la expresión de RhoGEFs por RT-PCR. Finalmente, realizamos experimentos preliminares (mostrados en el apéndice 1) de expresión de RhoGEFs en células endoteliales estimulando a diferentes receptores (FGFb; TGF β y SDF-1), en ayuno, con suero y en situación de hipoxia, estimulando con medios condicionados de diferentes tipos de cáncer próstata(PC-3), colon (HT29) y mama (MDA-MB-231). Generamos diferentes herramientas para valorar la expresión de RhoGEFs a nivel de proteína, para lo cual infectamos a células endoteliales HMEC con lentivirus con el shRNA-ARHGEF7(β -PIX) para inhibir su expresión, mismo que usamos para explorar el papel de ARHGEF7(β -PIX) en la organización de citoesqueleto de actina de células endoteliales microvasculares. Clonamos al RhoGEF ARHGEF7 en un vector que contiene un epítopo fluorescente (pCEFL-EGFP) para observar su localización al transfectar células endoteliales microvasculares y estimular a diferentes receptores. Estas herramientas se podrían utilizar para valorar la participación de los RhoGEFs, después de analizar y filtrar los diferentes

resultados de expresión de RhoGEFs en células endoteliales de diferentes organismos y con diferentes estímulos, en situación de hipoxia y en presencia de medios condicionados de diferentes tipos de cáncer. La estrategia experimental estuvo conformada por cinco etapas:

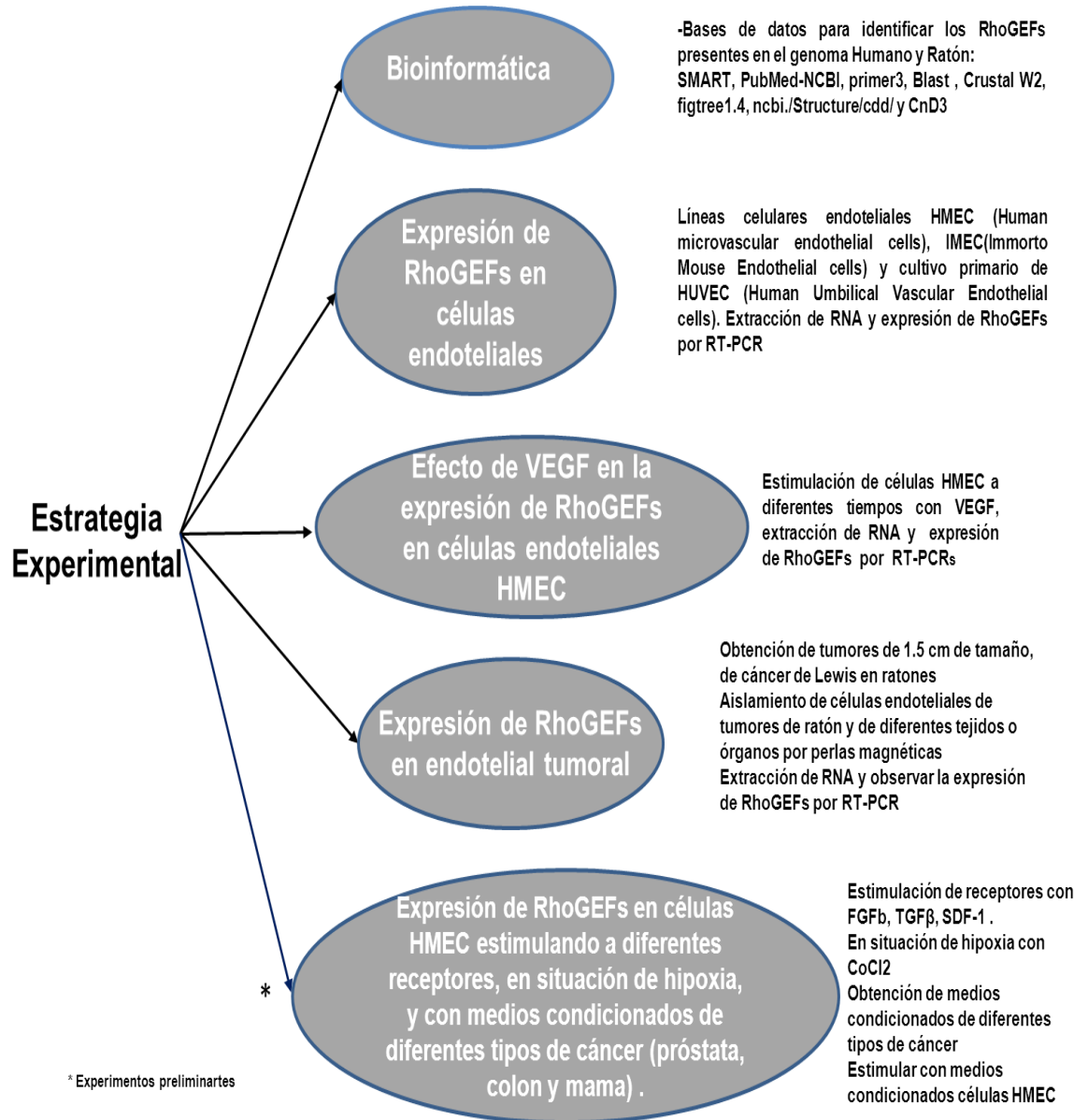


Fig.11. Protocolo de estrategia experimental

1. **Bioinformática** en donde nos apoyaremos en las páginas de internet:

- **SMART** a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains, en esta página identificamos el número de RhoGEFs por su dominio DH característico de cada RhoGEF

<http://smart.embl-heidelberg.de/smart/>

- **NCBI National Center for Biotechnology Information (NCBI)** es parte de la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos (*National Library of Medicine*), una rama de los Institutos Nacionales de Salud (*National Institutes of Health* o NIH). En esta página identificamos la secuencia completa y codificante de todos los RhoGEFs presentes en el genoma Humano y de ratón

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

- **Cn3D** es una aplicación que permite ver las estructuras en 3 dimensiones de la base de datos Estructura de Entrez del NCBI. Cn3D muestra simultáneamente estructura, secuencia y la alineación, y ahora cuenta con potentes funciones de anotación y edición de alineación.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>

- **Primer3** Es una herramienta gratuita en online, que sirve para analizar y diseñar primer para PCR, PCR en tiempo real, también para diseñar oligonucleótidos para sondas de hibridación.

<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>

- **Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*)** es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN, ARN o de proteínas. El programa es capaz de comparar una secuencia problema (también denominada en la literatura secuencia *query*) contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en una base de datos.

- **Fig-tree 1.4** Es un Visor gráfico de arboles filogenéticos el cual utilizamos para editar los alineamientos de los dominios DH de los RhoGEFs obtenidos del ClustalW2

<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

- **Clustal W2** Es un programa de alineamientos múltiples de secuencias, tanto de ADN como de proteínas, además de proponer un árbol guía de acuerdo a sus relaciones evolutivas de las secuencias que se alinean.

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

2) Expresión de RhoGEFs

- Extracción de RNA de células endoteliales humanas HMEC, HUVEC y endoteliales de ratón (Immorto).
- Expresión de RhoGEFs en células endoteliales humanas (HMEC, HUVEC) y de ratón IMEC
- Curso temporal (0, 1, 3 y 12 horas) estimulando con VEGF células endoteliales Humanas (HMEC).
- Aislamiento de células endoteliales tumorales de ratón de cáncer LLC, extracción de RNA y RT

- Curso temporal (0, 1, 3 y 12 horas) estimulando con VEGF células endoteliales Humanas (HMEC).
- Extracción de RNA de células endoteliales HMEC estimulado diferentes receptores, en situación de Hipoxia y estimulando con sobrenadantes de líneas de cáncer.

Diseño de primers para las PCRs de todos los RhoGEFs identificados en el SMART, atípicos y convencionales.

1.- Primero se identificó su número de unigen, que es el número que lo identifica en el Genoma Humano, es una forma de integrar todos los nombres de la misma proteína. Utilizando la base de datos de NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene/>

2.- Una vez identificado se obtuvo la secuencia codificante de la proteína de interés. Diseñamos los primers para observar la expresión del RNAm que codifica para esa proteína. En base a la secuencia de cada RhoGEF se diseñaron los primers específicos para su amplificación utilizando la página de Internet Primer3:

<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>

En la casilla correspondiente se colocó la secuencia del RhoGEF, en formato de FASTA, y se presionó: “pick primers”

Ejemplo: ARHGEF7 (β -PIX, Cool-1 etc.)

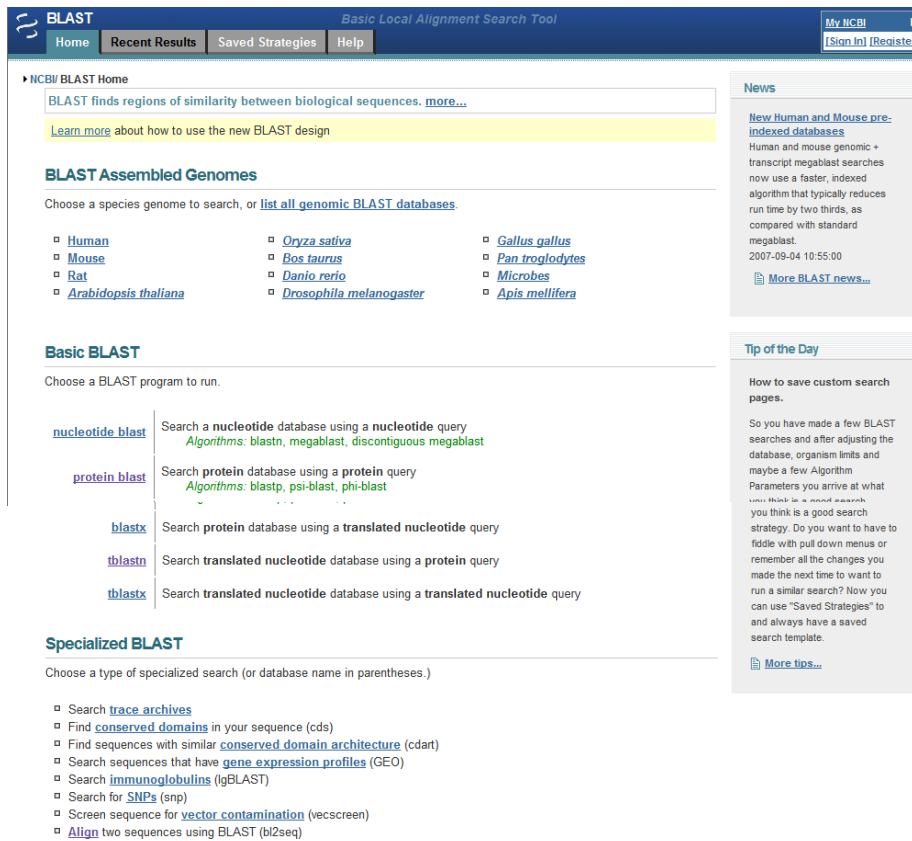
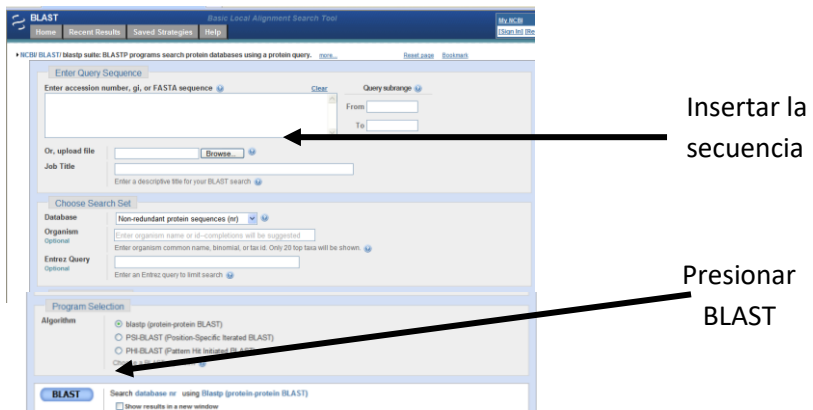


Fig. 12. Pantalla principal de BLAST. Blast es un método que compara una secuencia con un banco de secuencias, identificando a la proteína o nucleótido y el organismo. Para proceder a la comparación se selecciona si es de nucleótidos o proteína, después se inserta la secuencia en la casilla correspondiente y se selecciona el tipo de organismo con el que se quiere comparar, presionar BLAST.



Aparece un bosquejo de la proteína pero no es el resultado final

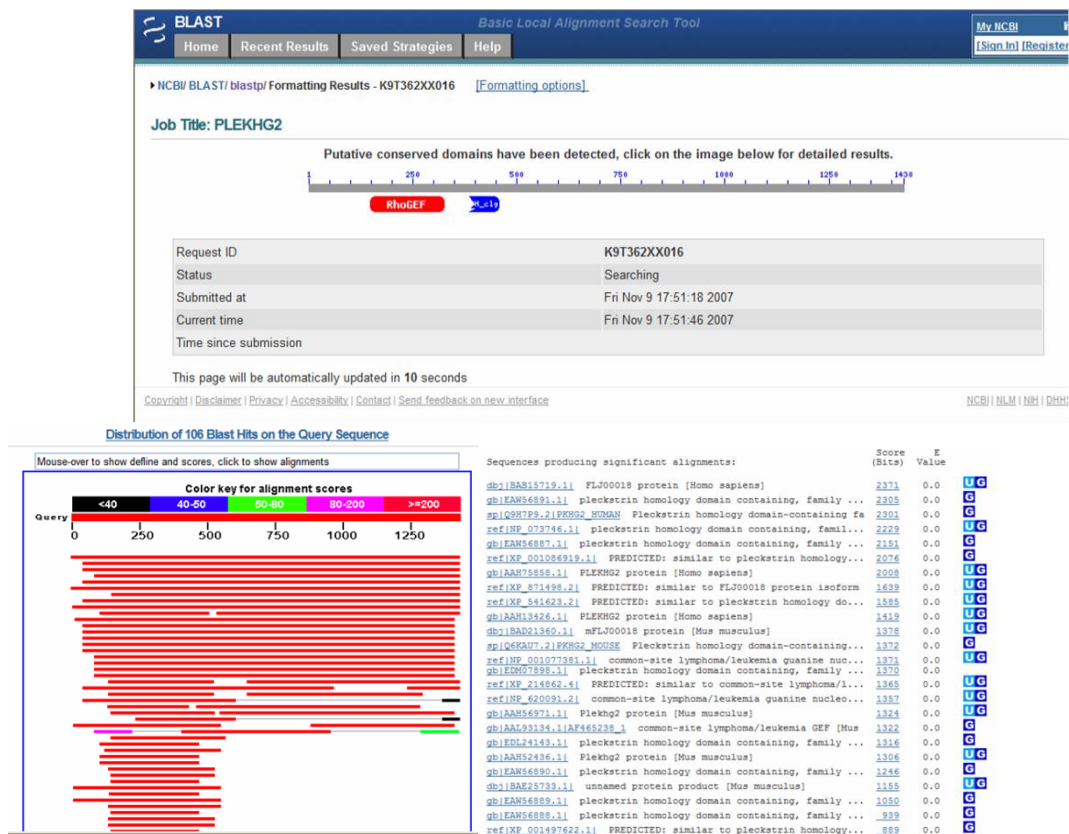


Fig. 13. Resultados del BLAST. Identificación de una secuencia de aminoácidos.

En la Figura 13 (imagen izquierda) se muestra el parecido de la secuencia de interés con proteínas que se encuentran en la base de datos. En la imagen de la derecha se encuentra el indicador del parecido de la secuencia con aquellas de la base de datos, mientras más se acerca a cero el indicador (E value) es más parecida. Además proporciona, en la mayoría de los casos, el número de unigen y la liga directamente con la referencia donde describe por primera vez a la proteína.

Análisis estructural

Para analizar de manera tridimensional la estructura de la región de interacción entre GTPasas y RhoGEFs e identificar los aminoácidos requeridos para tal interacción, se utilizaron herramientas bioinformáticas disponibles en internet. Utilizamos el programa Cn3D, el cual se encuentra disponible en la página del NCBI (*Nacional Center for Biotechnology Information*: <http://ncbi.nlm.nih.gov/>).

1. Primero realizamos una búsqueda de la estructura de la GTPasa con el GEF en la base de datos PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>), en donde seleccionamos la

opción de *Structure* y colocando el nombre de la GTPasa o el nombre del GEF en el recuadro de búsqueda.

2. Aparecen diferentes opciones dependiendo del nombre de la GTPasa que colocamos en el recuadro de búsqueda.
3. Elegimos las opciones que tenían unido la estructura de la GTPasa con el GEF
4. Una vez que elegimos la opción se selecciona descargar el programa de Cn3D que se encuentra del lado derecho (Download Cn3D) y después ver la estructura (*View structure*), que despliega dos ventanas: una permite visualizar la estructura tridimensional y la otra el alineamiento de las secuencias de las estructuras que están presentes en la interacción
5. Se pueden seleccionar los aminoácidos por un doble click con el mouse en la estructura y se marca de color amarillo en la estructura y en la ventana donde está la secuencia correspondiente, con un click sobre el aminoácido en la secuencia también se selecciona de amarillo el aminoácido correspondiente en la estructura.
6. Ctrl y con el mouse para elegir el tamaño de la estructura
7. Shift y con el mouse para centrar la estructura
8. Se selecciona la secuencia manteniendo oprimido ctrl y seleccionando la secuencia de la GTPasa o el GEF con el mouse.
9. En la ventana de la estructura, en la parte posterior se encuentra un menú; se da click en select , despliega otro menú donde se elige Select by Distance, abre una ventana donde se elige la distancia en Angstrom. Nosotros elegimos 3A y seleccionamos las opciones: *Select protein residues* y *select other molecules only*: presionamos OK. Se seleccionaron los aminoácidos que están interaccionando con la secuencia que seleccionamos. Realizamos lo mismo para la otra secuencia para identificar aminoácidos que participan en la interfase de la interacción.
10. Tiene un menú en el cual podemos editar la presentación de la estructura seleccionando Style.

Análisis de la expresión de RhoGEFs en células endoteliales microvasculares humanas (HMEC).

En paralelo se obtuvo RNA total de células HMEC estimuladas a diferentes tiempos con 100ng/ml de VEGF. Para estos experimentos las células fueron ayunadas en medio sin suero durante 12 horas, para después ser estimuladas con VEGF durante 0, 1, 3 y 12 horas tal como se muestra en el siguiente protocolo:

Curso temporal de estimulación con VEGF.

Para este experimento se utilizaron placas de 10cm con cultivos celulares de HMEC al 100% de confluencia, los cuales fueron ayunados durante 12 horas con medio MCDB131 con suero al 0.1% y sin antibiótico, posteriormente estimulamos con 100 μ g/ml de VEGF y lisamos a diferentes tiempos de estimulación (0, 1, 3 y 12h). Los lisados fueron utilizados para la extracción de RNA total y su posterior RT-PCR. Todo de acuerdo al protocolo extracción de RNA por método de trizol (Figura 14).

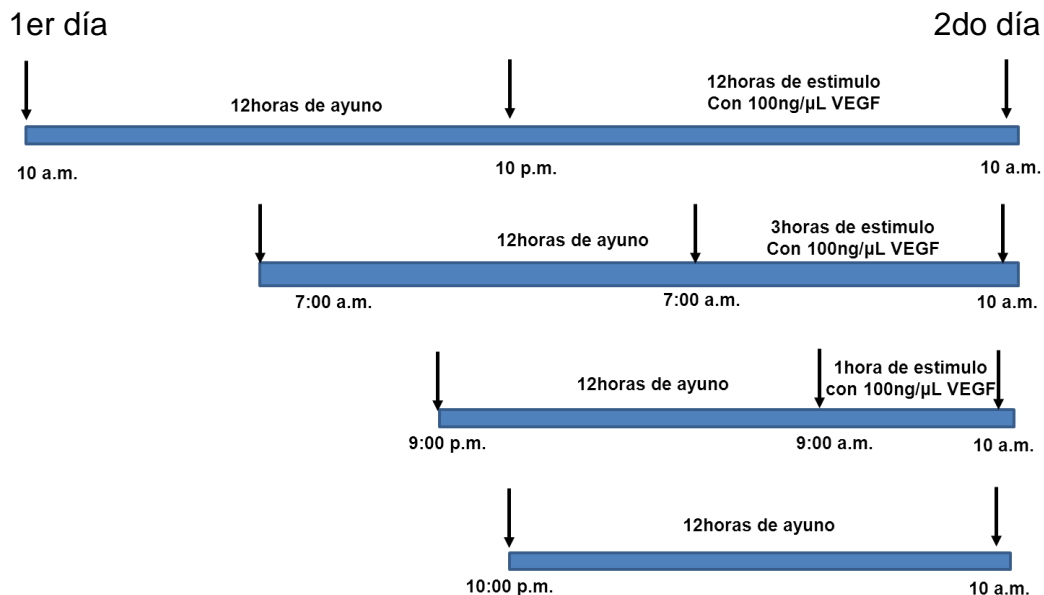


Fig.14 Curso temporal de células HMEC estimuladas con VEGF.

Extracción de RNA total por el método de trizol

1.- Homogenización : A partir de cultivo celular confluyente en monocapa: se lisaron las células directamente en la caja de cultivo de 10 cm, añadiendo 1ml de TRIzol (Invitrogen, Cat.15596-026), pasando varias veces el lisado celular a través de una pipeta (5 min).

2.-Separación de fases: El homogeneizado se pasó a tubos eppendorf e incubó por 5min a temperatura ambiente (de 15 a 30°C) para permitir la completa disociación de nucleoproteínas. Se adicionó 0.2 ml de cloroformo por cada ml de Trizol. Se taparon bien los tubos y se agitaron vigorosamente con la mano durante 15 seg. Se incubó a temperatura ambiente por 2 a 3 min. Se centrifugó a 13200 rpm durante 15 min a una temperatura de 2 a 8°C después de la centrifugación la mezcla se separó en 3 fases: roja abajo, una interfase de fenol-cloroformo, y una capa acuosa incolora arriba. El RNA se encuentra exclusivamente en la capa acuosa.

3.-Precipitación del RNA: Se transfirió la fase acuosa a otro tubo. Se precipitó el RNA añadiendo isopropanol (2-propanol). Se utilizó 0.5 ml de isopropanol por cada ml de TRIzol usado para la homogenización inicial. Se incubaron los tubos a -20 °C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugaron a 13500 rpm por 10 min a una temperatura de 2 a 8°C. El RNA puede o no formar una pastilla en el tubo, se continuó en ambos casos.

4.-Lavado de RNA: Se removió el sobrenadante. Se adicionó 1ml de etanol al 75% por cada ml de TRIzol. El etanol debe ser preparado con agua de DEPC. Las muestras se agitaron vigorosamente en el vortex y posteriormente se centrifugaron a 8000 rpm por 5 min a una temperatura de 2 a 8°C.

5.-Resuspension del RNA: Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla de RNA a temperatura ambiente. El RNA se disolvió en agua DEPC (30µL) y se incubó a 55-60°C durante 10 minutos.

1. Finalmente se almacenó a -70°C

Retrotranscripción del RNA total

Para poder determinar la expresión de los RhoGEFs se requirió de retrotranscribir el RNA total a cDNA y lo utilizamos para amplificar por PCR de forma específica los RhoGEFs.

Se utilizó el kit superscript RTII (Invitrogen, Cat. 18080-051)

1. Se ajustó la concentración del RNA total extraído para que todas las muestras tuvieran la misma cantidad de RNA total, la concentración fue de 2.5µg.
2. Se utilizó DNAsa I para garantizar que el RNA extraído no estaba contaminado con DNA. En las siguientes condiciones:

2.5µg de RNA de células HMEC

0.5µ de DNAsa I

0.5µl de buffer 10x de superscrit RTIII

El volumen no debe exceder de 8µl

Se incubó a 25°C por 25min para activar a la DNAsa I

Después 15min a 68° C.

3. Se preparó la siguiente mezcla:

Reactivo	Volumen
RNA total	X, depende la concentración, sin exceder de 8µl.
Oligo dt	1 µl
dNTPs 10mM	1 µl

Esta mezcla se depositó en un tubo de PCR

4. Se incubó a 65°C por 5 minutos, después 1 minuto en hielo.
5. Se preparó la siguiente mezcla en un volumen de 10µl.

Reactivo	Volumen
RT buffer10x	2µl
MgCl ₂ 25mM	4 µl
DDT 0.1M	2µl
RNAse Out (40u/µl)	1µl
superscriptII RT (200u/µl)	1µl

Se adicionaron los 10 µl de la mezcla, a la primera se mezcló y se puso en el termociclador (PERKIN ELMER GeneAmp PCR System). Se programó de la siguiente forma:

50 minutos	50°C
10 minutos	25°C
50 minutos	50°C
5 minutos	85°C.

6. Para terminar se agregó 1µl de RNAsa H a la reacción y se incubó a 37°C por 20 minutos. El cDNA recién sintetizado se guardó a -70°C.

Reacción en cadena de la Polimerasa PCR

Se utilizó el kit de JumpStart™ RED Taq ReadyMix PCR Reaction Mix Cat-027K6036 SIGMA.

1. Mezcla de la PCR

Reactivo	Volumen
H ₂ O (Pisa)	8.25 µl
MixRed	12.5µl
DMSO	1.25µl
Primer 5´	1µl
Primer 3´	1µl
cDNA	1µl

Todo en un tubo para PCR.

Las condiciones a las que se ajustó el termociclador fueron las siguientes:

Se calentó a 94°C por 5 minutos

Desnaturalización	94°C por 30 segundos	} 30 y 35 ciclos
Hibridación	61°C por 30 segundos	
Extensión o elongación	72°C por 1 minuto	

y mantener a 4°C

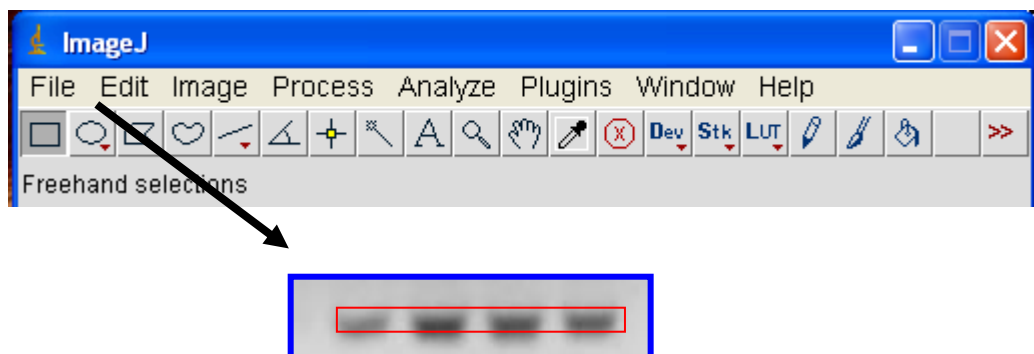
Electroforesis en geles de agarosa

1. La dureza del gel de agarosa fue de 2% en TAE 1X (40mM Tris, 20mM Acetato y 2mM EDTA (cat: # 161-0743).
2. Se pesó 2g de agarosa y disolvió en 100ml de TAE 1X, se calentó unos segundos hasta que se observó transparente y sin grumos.
3. Se dejó enfriar un poco hasta que la temperatura fue soportable al tacto y se le agregó 10 μ l de bromuro de etidio, inmediatamente se vació en el molde de la cámara de electroforesis y se colocó el peine, se dejó gelificar.
4. Después de que el gel solidificó, se colocó en la cámara de electroforesis, se agregó TAE 1X hasta cubrir completamente el gel, sin tirar de la cámara.
5. Se cargaron las muestras sin buffer de muestra debido a que el RedMIX ya contiene un buffer con color apropiado.
6. Se cargó un marcador de peso molecular.
7. El gel se corrió a 70mA, hasta una distancia de 5cm para que se haya separado la muestra.
8. Como registro, se tomó foto del gel en el BioDoc-It imaging system.

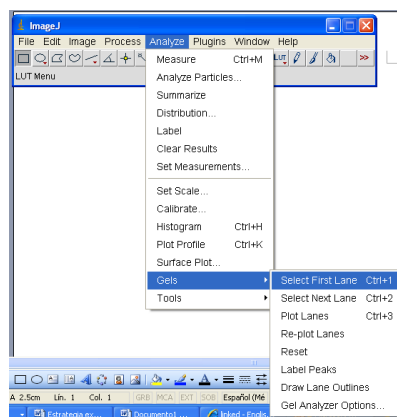
Análisis de geles en el programa ImageJ

Los productos de PCR fueron cuantificados de acuerdo a la intensidad de las bandas teñidas con bromuro de etidio. Para ello se empleó el programa **ImageJ** como se describe a continuación.

1.- Se usó la herramienta de selección rectangular para seleccionar el área donde se encontraban los carriles.



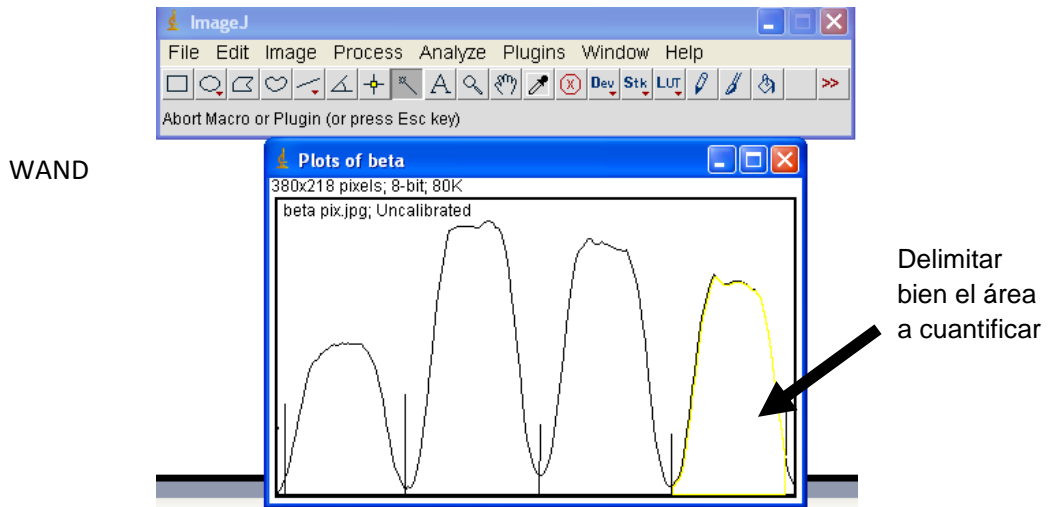
2.- Se seleccionó *Analyzer/Gels/Select First Line* (o presionar 1) y el carril 1 seleccionado aparecerá en la barra de status.



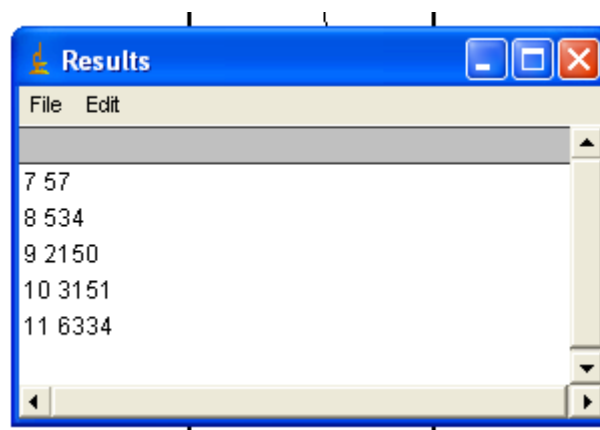
3.- Se ajustó la área de selección rectangular, que cubriera exactamente el área de las manchas por cuantificamos.



4.- Seleccionar la opción *Analyze/Gels/Plot Lines* o presionar 3 para generar los perfiles de las áreas bajo la curva de las manchas.



Para cada pico se mide el área cerrada utilizando la herramienta “wand”.
5.- Seleccionar el menú *Analyze /Gels/Label Peaks* para marcar la medición del área como un porcentaje del área total medida en todos los picos.



Ejemplo que presenta los resultados como áreas bajo la curva “integrales”. A todos los geles de los RhoGEFs se les aplicó este protocolo. Con estos datos y normalizándolos con el resultado obtenido de la amplificación del cDNA de actina se graficaron los datos.

Protocolo de obtención de tumor de LLC (carcinoma de pulmón de Lewis) en ratones desnudos

1. Se inyectaron 5×10^5 células de carcinoma de pulmón de Lewis muy bien disgregadas en 100µl de medio DMEM sin suero y sin antibiótico; en el flanco derecho del ratón desnudo.
2. Se observó al animal hasta que en el día 16 después de su inoculación con las células LLC, el tumor alcanzó un volumen de 1cm.
3. Se durmió al ratón que tenía el tumor de carcinoma de pulmón de Lewis (LLC), en una cámara de CO₂.
Se prosiguió a marcar el endotelio o los vasos sanguíneos de ratón con el tumor con 100µl de lectina-biotinilada (Biotinylated Lycopersico Esculentum (tomato) lectin cat-B1175 vector lab). Para ello se inyectó por la vena caudal de la cola y dejó que circulara por 3 minutos. Es importante que el ratón siga vivo para que llegue la lectina-biotinilada a todos los vasos.
4. Después se abrió el ratón y se perfundió el corazón en el ventrículo izquierdo a una presión constante de 100psi. Se cortó la aurícula derecha para desechar las células que se encontraran en el torrente sanguíneo, tales como eritrocitos y otros tipos celulares. Para ello se aplicó PBS1x estéril tibio hasta observar que el hígado y pulmón cambian de color.
5. Después se procedió a extraer el tumor



Fig. 15 Protocolo para la obtención de tumores de carcinoma de pulmón de Lewis

Aislamiento de células endoteliales tumorales (LLC) de ratón

1. Realizamos la extracción de tumor, el cual fue cortado en pequeñas porciones con una navaja estéril de cirugía hasta obtener una pequeña masa.
2. Se depositó en un tubo estéril de 15ml con medio DMEM sin suero y antibiótico e incubamos con colagenasa tipo I al 0.5% por 15 minutos a 37°C en movimiento constante con un agitador magnético.
3. Revisamos al microscopio que no hubiera cúmulos celulares.
4. Después agregamos medio completo para inactivar la colagenasa y centrifugamos por 2 min a 1000rpm, decantamos el medio.
5. Realizamos 2 lavados con medio DMEM sin suero.
6. Agregamos 100µl de Dynabeads M-280 Streptavidin (cat. 11205D Invitrogen) e incubamos por 15 minutos, en el sube y baja.
7. Después pasamos la suspensión de perlas y células por una columna que tiene adaptado un imán, en donde se quedaron atrapadas las Dynabeads unidas a las células endoteliales marcadas con una lectina-biotinilada.
8. Realizamos 3 lavados con medio DMEM sin suero y realizamos la extracción de RNA por el kit Qiagen.

Obtención de lisados de células HMEC

1. Se ayunaron las cajas de 10cm de células HMEC por 12 horas (T0) con medio con suero al 0.1% sin antibiótico y se estimularon por 3 horas (T3) con 100ng/μl de VEGF
2. Para lisar se lavaron las células con PBS 1X (1 ml por caja).
3. Se lisaron con buffer de lisis frío 10min (1ml por caja), sobre hielo.
4. Los lisados, se transfirieron a tubos eppendorf, previamente rotulados.
5. Después se centrifugó a 14 000 rpm, durante 10min y a 4°C.
6. Se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos.
7. De ahí se agregó 300μL de buffer de muestra 4X.
8. Se hirvieron 5 minutos, después se centrifugó 5 minutos a máxima velocidad y se congelaron a -20°C.

Western blot

1. Se corrió el gel de SDS-PAGE al 10 %, a 35 mAmps utilizando buffer de corrida SDS-PAGE 1X.
2. Se transfirió a una membrana de Immobilon (previamente sumergida en metanol al 100%) durante 3 hrs a 320 mA. Utilizamos buffer de transferencia a pH 8.3.
3. La membrana se bloqueó con leche al 5% en TBS-T 0.05% durante 1 hr a temperatura ambiente a una agitación de 30 rpm.
4. Se realizaron una serie de lavados con agua bidestilada hasta que ya no se observaron restos de leche.
5. Se realizaron 4 lavados con TBS-T 0.05% durante 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Para la detección de la proteína de interés se utilizó un anticuerpo primario dependiendo de la cantidad de proteína y la calidad del anticuerpo.

Anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Clave y marca	Concentración anticuerpo primario-tiempo	Concentración anticuerpo secundario-tiempo
LARG-ARHGEF12	LARG (H-70): sc-25638 SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.	1/1000 en leche en tbs-tween al .05% por O/N	Anti-Rabbit 1/20000 en leche contbs-tween al .05% por 1 hora
p115-ARHGEF1	RhoGEF p115/Lsc (H-165): sc-20804 SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.	1/1000 en leche en tbs-tween al .05% por O/N	Anti-Rabbit 1/10000 en leche con TBS-tween al .05% por 1 hora
TRIO	Trio (H-120): sc-28564 SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.	1/3000 en leche en tbs-tween al .05% por O/N	Anti-Rabbit 1/20000 en leche con TBS-tween al .05% por 1 hora
β-PIX-ARHGEF7	Anti-β-PIX- ARHGEF7 Catalog Number AB3829 Chemicon International	1/5000 en tbs- tween al .05% por O/N	Anti-Rabbit 1/10000 en leche con TBS-tween al .05% por 1 hora
GEF-H1-ARHGEF2	Lfc (K-17): sc-9334 SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC	1/5000 en tbs- tween al .05% por O/N	Anti-Goat 1/5000 en leche con TBS-tween al .05% por 1 hora
PREX-1	Anti-PREX1 antibody produced in rabbit <i>HPA001927 SIGM A</i> Sigma-Aldrich	1/5000 en tbs- tween al .05% por O/N	Anti-Rabbit 1/20000 en leche con TBS-tween al .05% por 1 hora
ITSN1L	Anti-Intersectin 1 antibody ab118262 Rabbit polyclonal to Intersectin 1 Abcam	1/3000 en tbs- tween al .05% por O/N	Anti-Rabbit 1/3000 en leche con TBS-tween al .05% por 1 hora
VAV2	Vav2 (C64H2) Rabbit mAb #2848 Cell Signaling Technology	1/5000 en tbs- tween al .05% por O/N	Anti-Rabbit 1/10000 en leche con TBS-tween al .05% por 1 hora
PKBa/AKT1	Monoclonal Anti- protein Kinase Ba clone PKB-175 Mouse Ascites Fluid Product Number P2482	1/10000 en TBS- tween al 0.05% por O/N	Anti-mouse 1/10000 en leche con TBS- Tween al 0.05% por 1 hora
actina	Producido en Biología celular	1/5000 en leche con TBS-tween por O/N	Anti-mouse 1/10000 en leche con TBS- tween al 0.05% por 1 hora
GFP	GFP (B-2): sc-996 SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC	1/200000 en leche con TBS al 0.05% por O/N	Anti-mouse 1/10000 en leche con TBS- tween al 0.05% por 1 hora

7. Al siguiente día se realizaron 3 lavados con TBS-T 0.05%.
8. Después se adicionó el segundo anticuerpo (dependiendo del origen del primario).
9. Se realizó un lavado rápido, seguido de cuatro lavados de 5 minutos cada uno con TBS-T 0.05%.
10. Se realizó un último lavado de 5 minutos a temperatura ambiente con TBS 1X.

Revelado del western blot

11. Se reveló el WB con el sustrato Millipore (WBCLS0500) a una dilución 1/1 (v/v) de los reactivos 1 y 2.
12. Incubar la membrana con el sustrato durante dos minutos.
13. Envolver en Clint film, montar en el casete para autoradiografía, asegurándose de que no queden burbujas.
14. Exponer 30 seg, 1 min y 5 min en la misma placa.
15. Revelar.

Resultados

Expresión de RhoGEFs endoteliales

Identificación de proteínas con dominio DH característico de los RhoGEFs homólogos a *Dbl* y proteínas con dominios DHR2

Para analizar la expresión de RhoGEFs en células endoteliales, primero identificamos las secuencias que codifican para proteínas con un dominio conservado conocido como DH (homólogo a *Dbl* o dominio de RhoGEF) existentes en el genoma humano y de ratón. Para esto utilizamos la base de datos SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Cabe mencionar que esta base de datos identifica a 4128 dominios presentes en 3997 proteínas, que van desde los primeros organismos hasta organismos más complejos, como los mamíferos. En esta base de datos se identificó a 63 proteínas humanas con dominio RhoGEF y 61 proteínas de ratón con este dominio. También se realizó una búsqueda en la literatura donde se identificaron 7 RhoGEFs adicionales que no están considerados en la base de datos de SMART, a estos los llamamos RhoGEFs atípicos. Por otra parte, existen además otras proteínas que funcionan como GEFs de GTPasas de Rho, pero que no están relacionadas con los RhoGEFs que poseen dominios DH, estas proteínas tienen un dominio DHR2 (Dock homology región 2) (72) y se les conoce como la familia de DOCK, la cual tiene 11 miembros, varios de los cuales requieren de las proteínas Elmo para funcionar. Existen 3 proteínas Elmo que sirven como proteínas de andamiaje (*scaffold*). (73)

En concreto, identificamos las siguientes proteínas: 63 RhoGEFs humanos, 61 RhoGEFs de ratón, 7 RhoGEFs atípicos, 11 Dock y 3 Elmo.

Diseño de primers de RhoGEFs

Una vez identificadas las proteínas, obtuvimos del número de unigen en el genoma humano y de ratón en la base de datos NCBI. El número de unigen se utiliza como criterio unificador de los diferentes nombres que tiene una misma proteína. Obtuvimos su secuencia codificante en formato Fasta y con el sistema primer3 diseñamos los primers para cada cDNA. Para confirmar la especificidad de los primers, una vez que teníamos las secuencias, realizamos un análisis comparativo de cada una de ellas, (secuencias de 21 nucleótidos)

en la una base de datos de la página: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Con esto comprobamos que cada secuencia identificara sólo al RhoGEF deseado. Como controles, diseñamos primers para β -actina, mismos que empleamos para garantizar la calidad del cDNA utilizado y para ajustar las concentraciones empleadas de forma que fueran comparables. Así como primers para PDGFRb como control de que el cDNA obtenido fuera específico de células endoteliales y no estuviera contaminado con otro tipo celular y primers para CD31 como marcador de células endoteliales, Tabla (2).

Expresión de RhoGEFs en células HMEC

Analizamos la expresión de los 63 RhoGEFs en células HMEC (*human microvascular endothelial cells*) por RT-PCR a 30 ciclos de amplificación en el termociclador, mostramos el gel representativo Fig. 16.

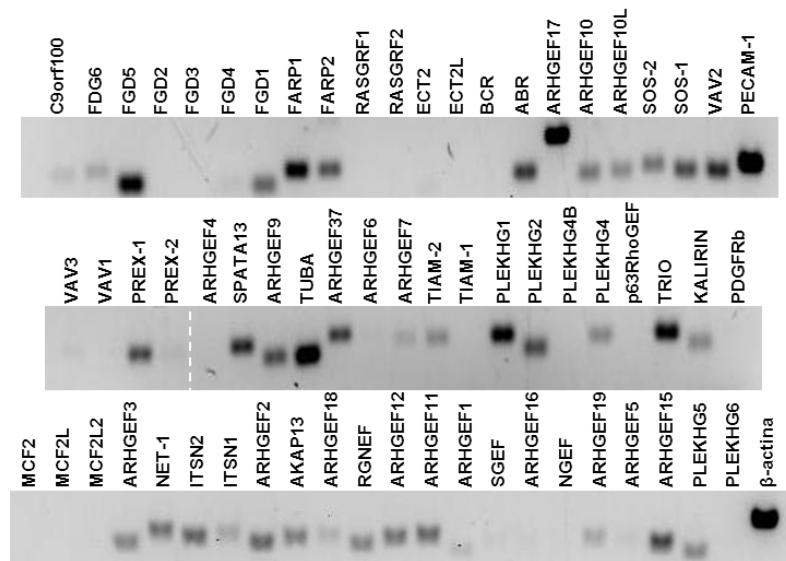


Fig. 16. Expresión de RhoGEFs en células HMEC. Se extrajo el RNA de células HMEC y se realizó RT-PCR para detectar la expresión de los RhoGEFs empleando 30 ciclos de amplificación.

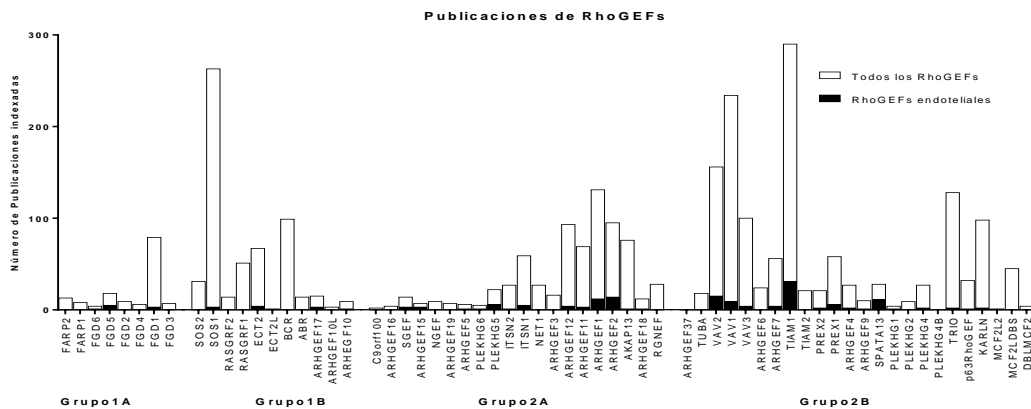


Fig. 17. Numero de publicaciones indexadas de RhoGEFs y RhoGEFs endoteliales. En barras blancas todas las publicaciones de cada RhoGEFs y en barras negras publicaciones de cada RhoGEF en células endoteliales.

Análisis bibliográfico de RhoGEFs en publicaciones indexadas.

Con el fin de resaltar la importancia reconocida de los distintos RhoGEFs o bien identificar RhoGEFs que de acuerdo a nuestros estudios estuvieran bien expresados en células endoteliales pero de los cuales hubiera poca información, de forma que pudieramos destacar aquellos que de acuerdo a estos criterios pudieran resultar particularmente interesantes para estudios futuros, decidimos correlacionar los resultados de expresión con las evidencias en la literatura sobre estudios referentes a cada GEF. Para ello se realizó una búsqueda en PubMed de publicaciones de RhoGEFs en general o restringidos a estudios en células endoteliales. Encontramos poca información de distintos RhoGEF que detectamos bien expresados en células endoteliales, muchos de los cuales prácticamente no han sido estudiados en este tipo celular. En la gráfica de la figura 17 mostramos el número de publicaciones que existen en la base de dato de PubMed, de todos los RhoGEFs y cuáles de esos RhoGEFs han sido relacionados con una función en células endoteliales. Cabe destacar que la mayoría de los RhoGEFs no han sido estudiados en células endoteliales.

Análisis estructural de la interacción entre el dominio DH de los RhoGEFs y la GTPasa

Para identificar las regiones estructuralmente importantes en la interacción entre RhoGEFs y GTPasas, y distinguir las particularidades en la secuencia de distintos RhoGEFs que eventualmente pudiera destacar la importancia funcional de la elevada diversidad de RhoGEFs en células endoteliales, analizamos la estructura de la interacción de los dominios DH-PH con la GTPasa, utilizando el programa Cn3D (Fig.18). En la página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure>, identificamos la estructura de 9 complejos cristalizados en los que se muestra la interacción del RhoGEF con su GTPasa correspondiente: MCF2L-RhoA, p63RhoGEF-RhoA, TIAM-Rac, Akap13-RhoA, ARHGEF9-Cdc42, ARHGEF12-RhoA, ITSN1-Cdc42, ARHGEF11-RhoA y VAV1-Rac. Realizamos un alineamiento de todos los dominios DH de los RhoGEFs e identificamos los aminoácidos del RhoGEF que están participando en la interacción con la GTPasa. Con ayuda del Cn3D identificamos los residuos que se ubican a 3Å de distancia entre el complejo DH-PH y la GTPasa, los cuales mostramos en la Fig. 18.

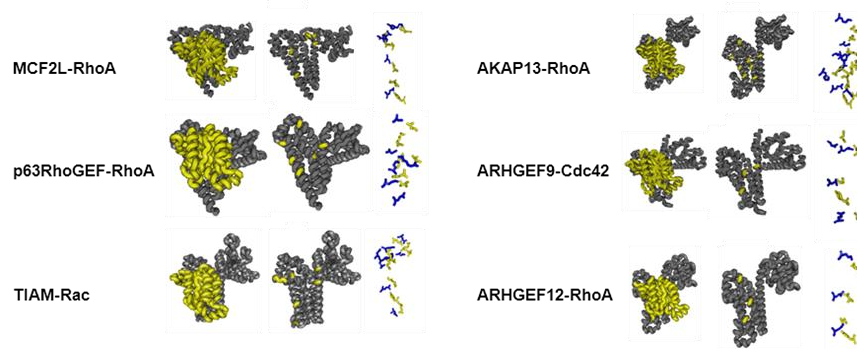
ITSN2	YIHELIQTEE	RYMADLQLVV	--GAALLOQK	-ASDPRCK--	----GMPLSS	FLIKPMQRIT	RYPLLIRESIL	RABELCSQVN	E
ITSN1	YIHELIQTEE	RYMADLQLVV	--GAALLOQK	-AMDPRCK--	----GMPLSS	FLIKPMQRIT	RYPLLIRESIL	RABELCSQVN	E
NET1	AIYEMSRGBO	DLIEDLKLAR	--AKALLOQK	-LESPPFSR--	----KLDLWS	FLDIPRSRLV	KYPLLLKREIL	IIQGVLSIDN	L
ARHGEF3	-IHELSQGE	DLIEDLKLAK	--AKALLOQK	-LESPPFSR--	----KLDLWN	FLDIPRSRLV	KYPLLLKREIL	IIQGVVAEIN	T
ARHGEF12	VINELFYTER	AHVRTLKVLQ	--ALEMLTKR	-ESNPFPCR--	----RLQLKD	IIPPTMQRIT	KYPLLLDNLIA	HCRQILKYVN	Q
ARHGEF11	VINELFYTEA	SHLRTLKVLQ	--ALEMLTKK	-ESHFPCR--	----RLQLRD	LIISEMQRIT	KYPLLLSEII	OCREILKYVN	E
ARHGEF1	VISELIVTEA	AHVRLKVLH	--ALEQLKAK	-ESRPRCR--	----RLQLKD	MIPTMQRIT	KYPLLLQSIG	CCREILHRVN	Q
ARHGEF2	VINELIQTEL	EHVRTLKIMT	--AIKLYKEL	-TRPAVLK--	----RHGVQK	CILLVTCRIT	KYPLLLSRIL	LVRKELSNVE	E
AKAP13	VINELMQTEF	EHVRTLKIMS	--SVNYFSDI	-MSSSVVQI	----RLGIFE	CILLVTCRIT	KYPLVLFQKIL	LVRDVIQAVD	S
ARHGEF18	VISELHQTEV	EHVRTLKIML	--AVSHYKLL	-GNFSIVR--	----RLGVQK	CILLVTCRIT	KYPLVVERII	LIKDIIISQVC	A
RGHEP	VISELHQTEM	HEIQTLFMS	--AIIIVDTY	-NSNLLAR--	----RRCIFE	CILLVTCRIT	KYPLVVERII	LIKDIIATVD	L
ARHGEF37	AVSHLIDTEV	SYLHMLQICA	--AIIIVDTY	-VPGASS--	----GLSP	LLNVTPLQRIT	KYPLLLQKIL	ALQDVTNIN	E
TUBA	VISELIQTER	DYIRDLENCI	--AIIALEIY	-YNEWGCTN--	----YINLGS	FLIKPVQRVM	KYPLLLMELL	AVKVINININ	E
VAV2	CLSHIQTEA	KYRRTLESIE	--AQNTINQL	-TLKVDG--	----KFKLQD	LLMVPQRVL	KYHLLKELL	AMQDLAMYN	E
VAV1	CLSHIQTEE	KYRDTLSIQ	--ASKHLDRV	-SQRANNG--	----RFTLRD	LLMVPQRVL	KYHLLQELV	AMRDLAGCVN	E
VAV3	CLSHIQTEE	KYRRTLESIE	--AIIISLDYI	-SKRANNG--	----KFTLRD	LLMVPQRVL	KYHLLQELV	AMRDLAGCVN	E
ARHGEF6	VLNILIDTEK	EYAKELQSLI	--AVNVLTL	-QGASSPC--	----ILILIT	NLSKPFMRLE	KYVTLQEL	AFKTLMSQCC	D
ARHGEF7	VLNILILETEN	EYSKELQTVL	--AVNVLTL	-KGASSPC--	----ILVLIT	GLSKPFMRLE	KYPTLLKELE	AFKNLSAQCC	E
TIAM1	VICQLLETER	TYVKDLNCLM	--VQKVLVKA	-ONPKQKH--	----SSTLES	YLIKPVQRIL	KYPLLLKELF	TNKNVASHIN	E
TIAM2	VICQLVDTEK	SYVKDLNCLP	--VQKVLERA	-RNPTKQH--	----SSTLES	YLIKPVQRIL	KYPLLLKELV	AMKAVASHIN	E
PREX2	VLSHLQKTER	DYVGTLEPLV	--ACKLLELE	LLGGRKNT--	----DVPLEG	YLVTPQRIC	KYPLLLKELL	AMKAVCSNIN	E
PREX1	VLNHLGTER	DYVGTLRPLQ	--ALRLLVLEL	LLGGRKTT--	----DIPLEG	YLLSPQRIC	KYPLLLKELA	AMKAVCSNIN	E
ARHGEF4A5E	VINHLSTER	DYIKHLRQIC	--ACVELSRL	LL--QQMI--	----DISLDG	FLITPVQRIC	KYPLQLAELL	AMQNVACLIN	E
ARHGEF9	VINHLMSTER	HYIKHLRQIC	--ACMELSKL	LL--QQMI--	----DIAIDG	FLITPVQRIC	KYPLQLAELL	VGRNVTOQLN	E
SPATA13	VINHLMSTER	HYIKHLRQIC	--ACLELANL	LL--QQMI--	----DIAIDG	FLITPVQRIC	KYPLQLAELL	AMQNVACLIN	E
PLEKHG1	VVQHLLETER	TYVQDLRSIV	--SVAVLTEC	-ROETLKH--	----SLPLGS	YLLKPVQRIL	KYHLLHEIE	TMQRVASHIN	D
PLEKHG2	VANHLVETER	AYVRDLRSIV	--SIALLELQ	-RQAQLRH--	----SLPLQS	FLIKPVQRIL	KYHLLQELG	SMQVAVKYN	D
PLEKHG4	VLANHIVATER	EYVRALEYTM	--SDALMSY	-KQALGCD--	----HLDLAS	YLLKPVQRMG	KYALLQLELA	LVPQLRHGN	D
PLEKHG4B	VLANHIVATER	EYVRCLEGYVI	--SDALLSSH	-KQRELCD--	----KMDLAS	YLLKPVQRVA	KYALLQDQLL	VVCPQLRHGN	D
TRIOa	IMHQLIQTEK	AYVRLRQCV	--STQLLLEH	-IQQRHGL--	----ANSISS	YLIKPVQRIT	KYQALLKELL	VMLSVPKKAN	D
TRIOa	VLSHLVETER	DYVVDLGVVV	--SEHIVSEY	-LKQRLGCH--	----RLQLTD	LLIKPVQRIM	KYQALLKDFL	VMCIVPRKCN	D
SLC26A10	VLSHLVETER	DYVVDLGVVV	--SEHVVSSEF	-LQQLGCH--	----RLQLND	LLIKPVQRIM	KYQALLKDFL	VMCIVPRKCN	D
KARLN	IMHQLIQTEK	AYVRLRQCV	--SNQLLLEH	-IQQRHGL--	----ANSISS	YLIKPVQRIT	KYQALLKELL	VMLSVPKKAN	D
MCF2L2	IIRHDLLETER	IYIKELKSI	--ARAIWQEC	-CQRQLDH--	----NLPFK	YLLKGPSORLI	KYQALLKGLL	VIEDLKSCE	L
MCF2LDBS	VMSHLIDTER	AYVEELLCVL	--SBSLWQEC	-CQRKLDH--	----KLSLDS	YLLKPVQRIT	KYQALLKEML	SILGLKAVN	D
DBMCF2	VINHLIQTER	VVRELYTVL	--SETLWRKY	-CQRKLEH--	----RLRLDS	YLLKPVQRIT	KYQALLKELL	AMIDLKSNV	D

Fig. 18. Identificación de aminoácidos del RhoGEF que participan en la interacción con su GTPasa correspondiente. En rojo se señalan los RhoGEFs cristalizados y seleccionados en negro los aminoácidos que participan en la interacción con la GTPasa. Los asteriscos señalan los aminoácidos que se conservan en la interacción con la GTPasa.

Identificación de aminoácidos conservados que participan en la interfase de interacción entre el RhoGEF y la GTPasa

Se analizó la estructura tridimensional de los 9 complejos hasta ahora cristalizados de los dominios DH-PH con su GTPasa con énfasis en destacar los aminoácidos presentes en la zona de interacción. Seleccionamos tres ejemplos de interacción de GTPasa y RhoGEF diferentes que pudieran ser representativos de estos complejos, ya que incluyen a las GTPasas más estudiadas (RhoA, Rac1 y Cdc42): ITS1-Cdc42 (74), ARHGAP11/RhoA (75) y VAV1-Rac1 (76). En la Fig. 19A observamos la estructura de los dominios DH-PH, en las que seleccionamos los aminoácidos que participan en la interacción, mostramos el número de aminoácido de la proteína, la forma tridimensional de estos aminoácidos cuando están interaccionando con los aminoácidos de la GTPasa. Identificamos también a los aminoácidos conservados del dominio DH que participan en la interacción con la GTPasa que son: para ITS1-E-1244 y --N-1421; para ARHGAP11-E741 y-N-921; por último para VAV1-E201 y-N371. Podemos observar que hay una mayor cantidad de aminoácidos participando en la interacción de ARHGAP11-RhoA que en los otros dos ejemplos. Además que la interfase de interacción es más distante entre ITS1-Cdc42 y VAV1-Rac con respecto a ARHGAP11-RhoA, Fig. 19(B).

A



B

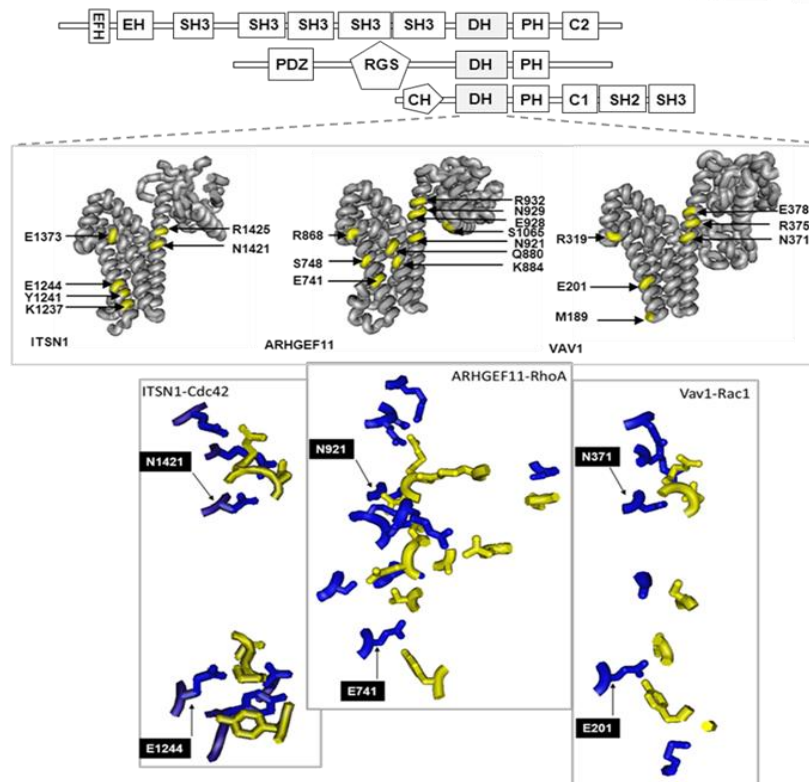


Fig. 19 Análisis estructural de la interacción de RhoGEF-GTPasa

A. Estructura del RhoGEF en gris y la GTPasa en amarillo, los sitios resaltados en amarillo en el dominio DH corresponden a aminoácidos que participan en la interacción con la GTPasa; a la derecha se muestra la estructura en azul de aminoácidos del RhoGEF y en amarillo aminoácidos de la GTPasa tal y como se organizan en la zona de interacción. B. Ejemplo de estructura de los RhoGEFs ITSN1, ARHGEF11 y VAV1, cuyos dominios DH-PH fueron cristalizados con su GTPasa. En la siguiente imagen se muestra los aminoácidos en amarillo corresponden a aquellos que participan en la interacción. En la siguiente imagen se muestra un acercamiento en el que se seleccionaron y destacan los aminoácidos presentes en la zona de interacción, en azul vemos a los aminoácidos del RhoGEF y en amarillo a los aminoácidos de la GTPasa. El recuadro negro indica a los aminoácidos conservados filogenéticamente y que se ubican en la zona de interacción entre RhoGEF u GTPasa.

Árbol filogenético de RhoGEFs humanos

Con el fin de sistematizar el análisis de expresión de RhoGEFs en células endoteliales, tomando en consideración las relaciones filogenéticas entre los distintos RhoGEFs, de forma que el análisis tuviera la connotación implícita a las relaciones evolutivas, decidimos organizar a los RhoGEFs en grupos de acuerdo a la homología de sus dominios DH. Para ello se realizaron alineamientos múltiples del dominio DH (domino catalítico) de los RhoGEFs humanos e hicimos un árbol filogenético para presentar los datos ordenados de acuerdo a las relaciones evolutivas de los distintos RhoGEFs. Realizamos el alineamiento de estos dominios en la plataforma ClustalW2, y por último generamos un árbol utilizando el software Figtree 1.4. En el árbol filogenético de RhoGEFs humanos destaca la existencia de 2 ramas, o grupos principales, los cuales se dividen en dos subgrupos y cada uno cuenta con varias ramificaciones más pequeñas. Los subgrupos fueron nombrados 1A, 1B, 2A y 2B. Utilizamos esta organización para estudiar sistemáticamente a los RhoGEFs en la línea celular endotelial HMEC (*Human Microvascular Endothelial Cells*), en el cultivo primario HUVEC (*Human Umbilical Vascular Endothelial Cells*), que son células humanas e IMEC (*Immorto Mouse Endothelial cells*) células endoteliales aisladas de ratones conocidos como *Immortomice* y células endoteliales de ratón aisladas de tumores de carcinoma de pulmón de Lewis, las cuales llamamos TEC (*Tumor Endothelial Cells*). Los resultados de expresión de RhoGEFs en células HMEC obtenidos por RT-PCR a 30 ciclos de amplificación fueron representados en el árbol, indicando con letras negritas a los GEFs cuya expresión fue detectada en estas células y con diferente tamaño de letra representamos el grado de expresión. En tanto que los RhoGEFs cuya expresión no fue detectada se indican en el árbol con letras grises figura 20.

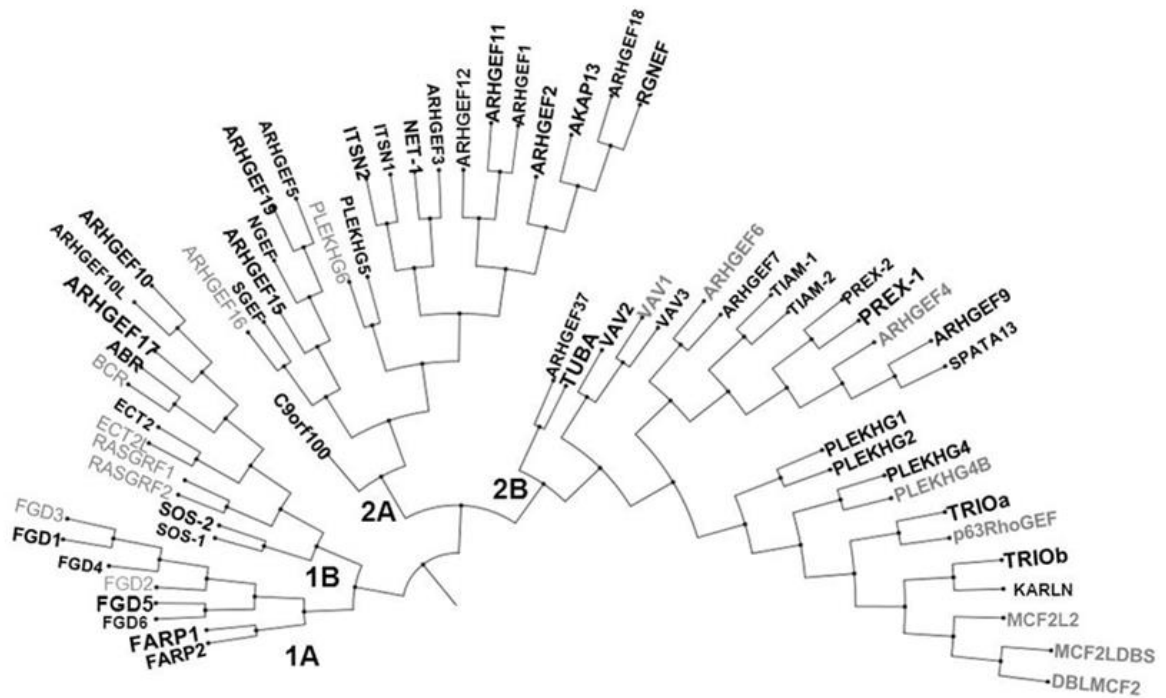


Figura 20 Arbol filogenético de RhoGEFs humanos. La expresión de estos en células endoteliales HMEC se indica en letras negras de diferente tamaño, de acuerdo al nivel de expresión. Los RhoGEFs fueron detectados por RT-PCR a 30 ciclos de amplificación. En letras grises se indican los RhoGEFs cuya expresión no fue detectada.

Expresión de RhoGEFs en diferentes tipos de células endoteliales

Una vez que obtuvimos todos los primers de los RhoGEFs presentes en el SMART. Se realizaron las PCRs para detectar a todos los RhoGEFs cuyo RNA estuviera expresado. Para cada experimento cuantificamos la expresión de los distintos RhoGEFs usando el programa Image J y presentamos los datos normalizados de acuerdo a cada subgrupo. Los resultados se muestran en las figuras 21, 22, 23 y 24.

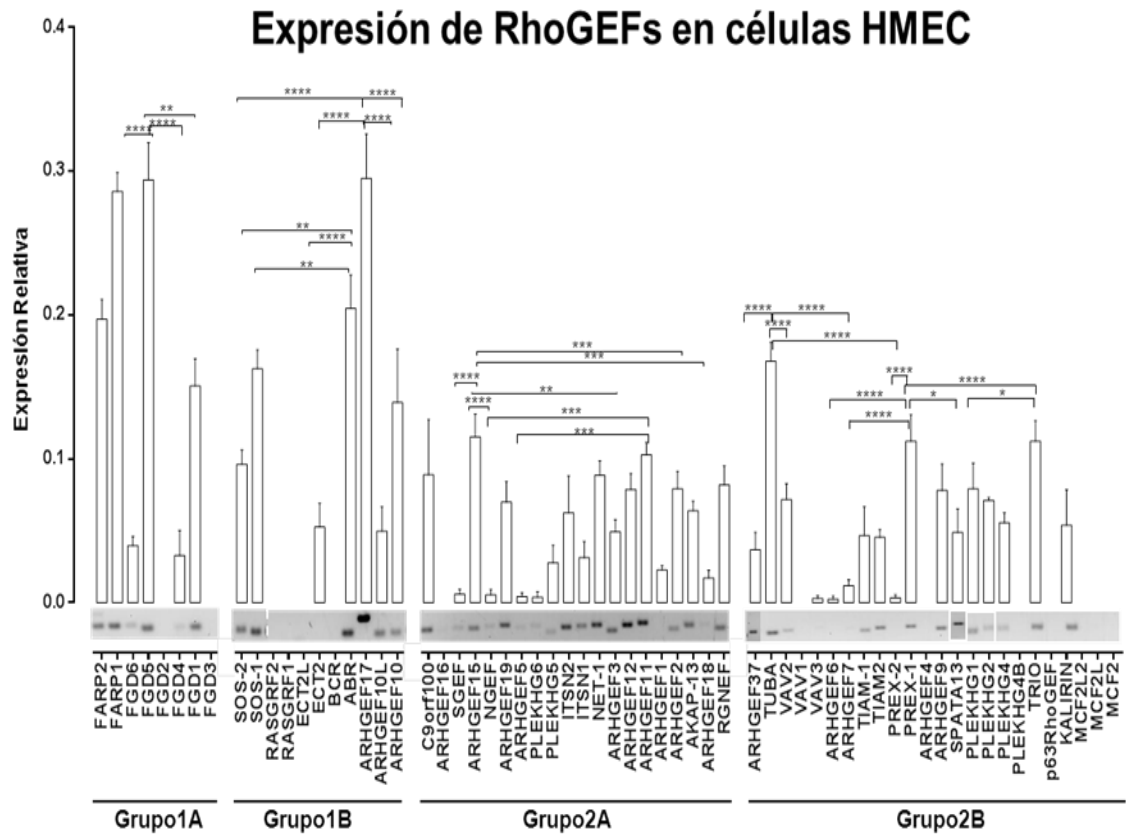


Fig 21 Expresión de RhoGEFs en células endoteliales HMEC. El análisis se hizo por RT-PCR a 30ciclos de amplificación.

Se detectó la expresión de 47 RhoGEFs como habíamos mencionado anteriormente. Se detectó el RNAm de RhoGEFs pertenecientes a todos los subgrupos de acuerdo al árbol filogenético. El grupo 1A tiene 8 RhoGEFs de los cuales se detectaron 6; el grupo 1B tiene 11 RhoGEFs de los cuales se observaron 9, el grupo 2A tiene 20 RhoGEFs y se detectaron 19 y el último grupo, 2B, tiene 24 RhoGEFs y se expresaron 18. Podemos observar que en cada grupo hay una expresión diferencial de RhoGEFs relacionados, destacando FARP1 y FGD6 en el grupo 1A, ARHGEF17 y ABR en el grupo 1B; ARHGEF15 y ARHGEF11 en el grupo 2A y TUBA, PREX-1 y TRIO en el grupo 2B, Fig. 22.

Expresión de RhoGEFs en células HUVEC

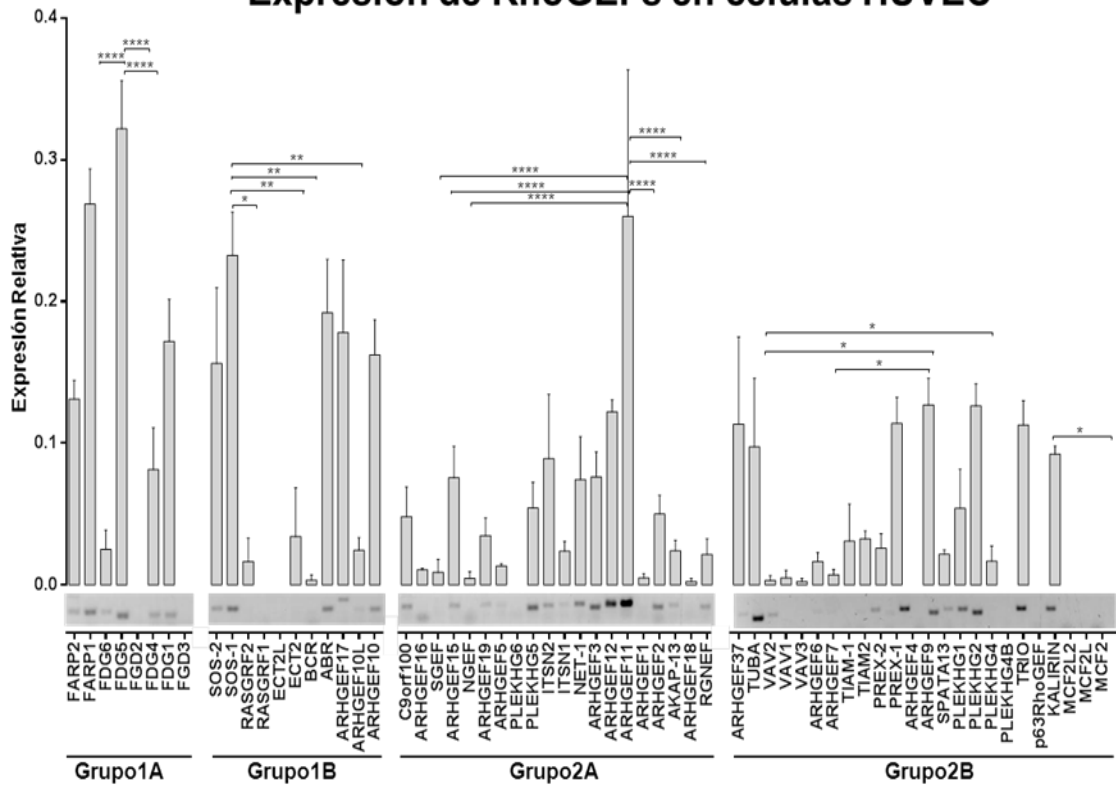


Fig. 22. Expresión de RhoGEFs en células HUVEC. El análisis se hizo por RT-PCR a 30 ciclos de amplificación.

En células HUVEC se detectó la expresión de 52 RhoGEFs. En este caso destacaron FARP1, FGD5 y FGD3 en el grupo 1A; SOS1, ABR y ARHGEF17 en el grupo 1B; ARHGEF11 y ARHGEF12 en el grupo 2A y ARHGEF9, PLEKHG2, TRIO y KARLN en el grupo 2B.

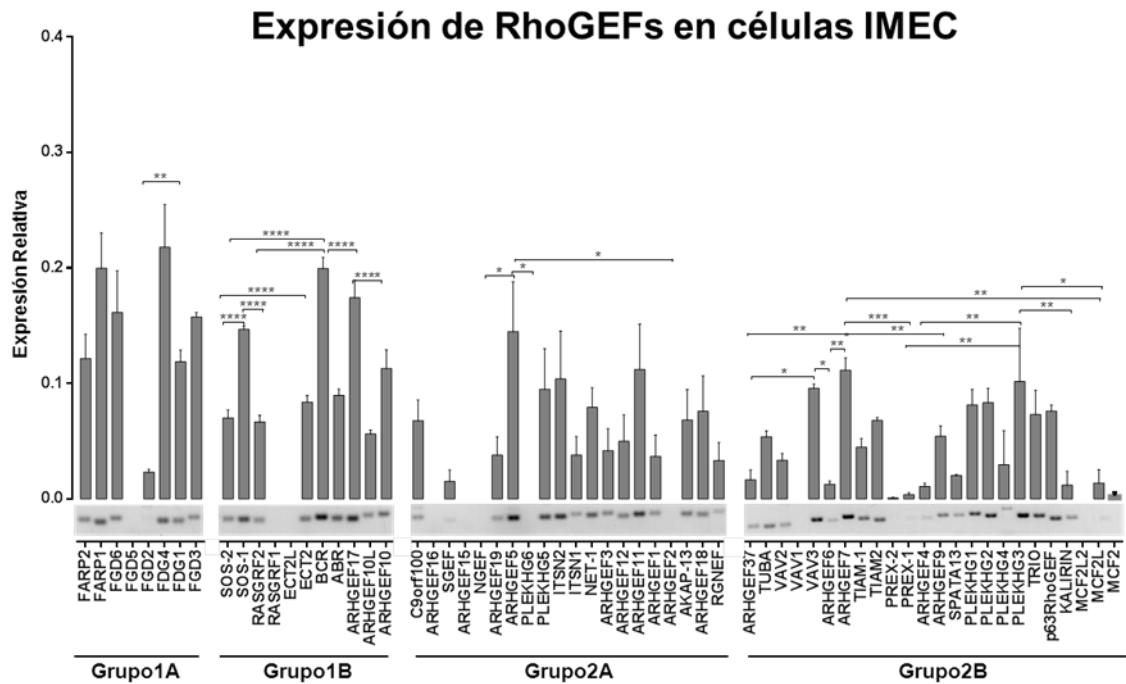


Fig. 23 Expresión de RhoGEFs en células endoteliales de ratón IMEC 30 ciclos

En células endoteliales de ratón IMEC se detectaron 53 RhoGEFs. Destacando en este caso FARP1, FGD4 y FGD6 en el grupo 1A; SOS1, BCR y ARHGEF17 en el grupo 1B; ARHGEF5 y ARHGEEF11 en el grupo 2A y PLEKHG3, ARHGEF7, y VAV3 en el grupo 2B, Fig.23.

Aislamiento de células endoteliales tumorales de carcinoma de pulmón de Lewis (LLC) de ratón

Para realizar el aislamiento de células endoteliales de tumores de LLC, se utilizó el protocolo de la página (57). Se observó el crecimiento del tumor de LLC hasta tener un tamaño de 1.5 cm. Los tumores alcanzaron este tamaño Entre los 14 y 16 días después de ser inoculados con 5×10^5 células (LLC), Fig. 24.



Fig 24 Tamaño de los tumores de LLC

Para extraer los tumores, se realizó una cirugía y las muestras fueron procesadas para el aislamiento de las células endoteliales y la extracción de RNA de acuerdo a los protocolos de las páginas (56 y 49).

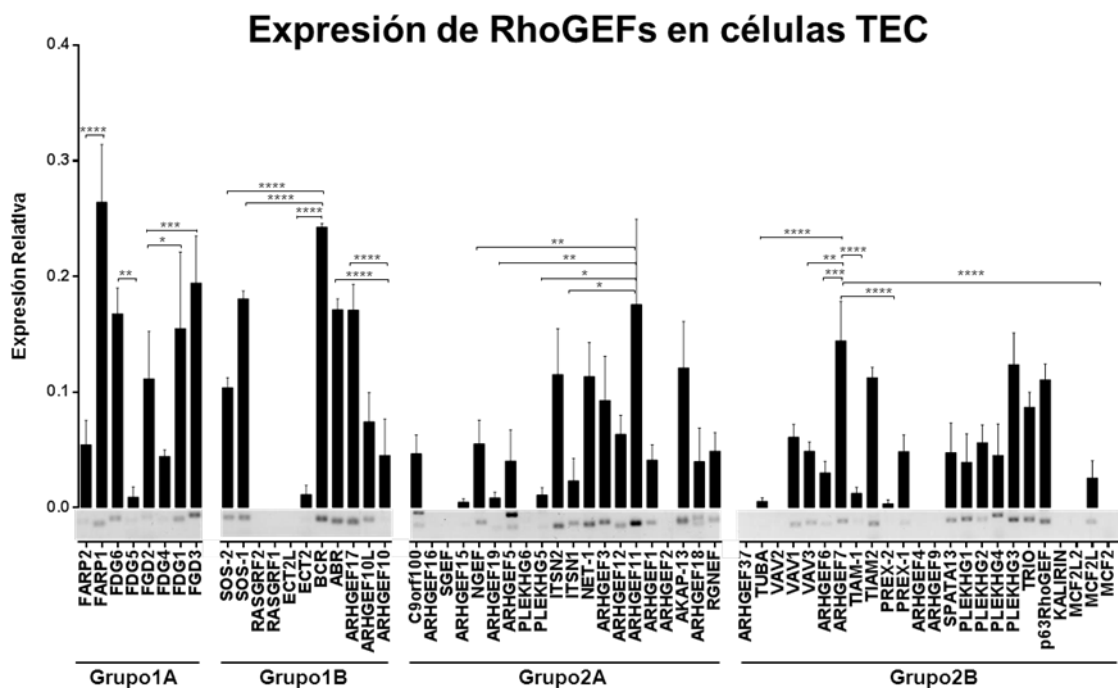


Fig 25 Expresión de RhoGEFs en células endoteliales aisladas de tumores de carcinoma de pulmón de Lewis (TEC)

En las células endoteliales aisladas de tumores (TEC) se detectó la expresión de 49 RhoGEFs: 8 del grupo 1A, 8 en el 1B, 16 en el 2A y 17 en el 2B. Destacaron en el grupo 1A: FARP1, FGD3 y FGD6; en el grupo 1B: BCR, ABR y ARHGEF17; en el grupo 2A: ARHGEF11, ITSN2, AKAP13 y NET1 y en el grupo 2B: PLEKHG3, ARHGEF7, p63RhoGEF, TRIO y TIAM2.

Comparación de la expresión de RhoGEFs en diferentes tipos celulares endoteliales

Con el fin de enfocarnos en un análisis comparativo de la expresión de RhoGEFs en células endoteliales, de forma que pudieramos destacar diferencias, particularmente respecto a las células endoteliales aisladas de tumores y además teniendo en cuenta sus características estructurales, presentamos los datos normalizados para cada subgrupo de RhoGEFs junto con la representación esquemática de la estructura de cada uno de ellos. Respecto al grupo1A, que como dijimos tiene 8 miembros, en la figura 26, estos, de acuerdo a su estructura pueden dividirse en dos subgrupos; en el primero se ubican FARP1 y FARP2, quienes tienen 6 dominios, tres de ellos específicos para este subgrupo: B41 considerado importante para localización a la membrana, FERM-C para unión a la membrana y FA que contiene sitios de fosforilación que podrían regular los dominios FERM, además del módulo DH PH característico de los RhoGEFs, seguido en estos dos casos de un PH adicional.

Grupo1A RhoGEFs Endoteliales

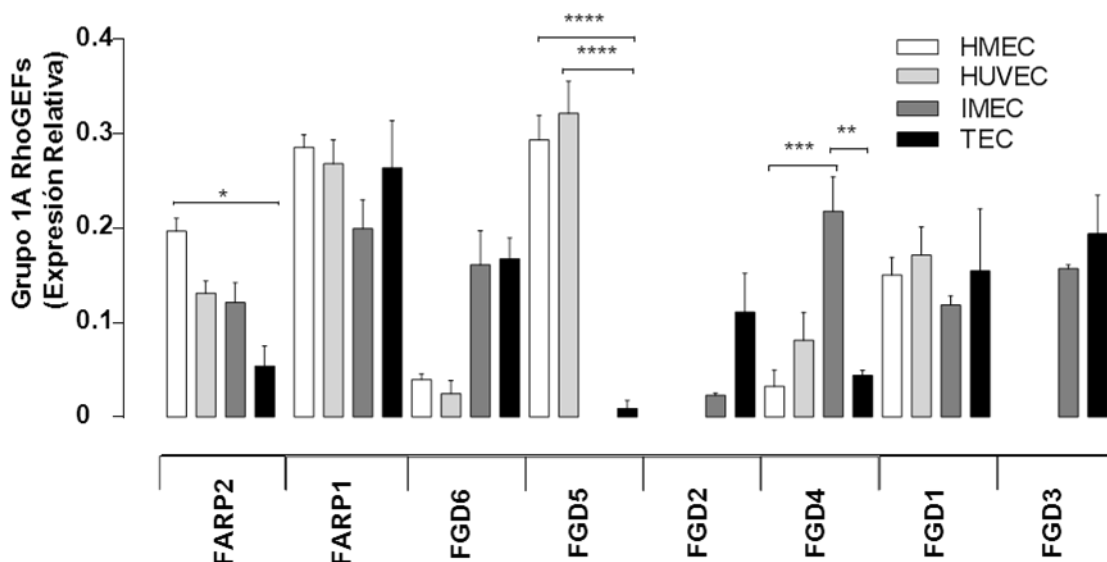
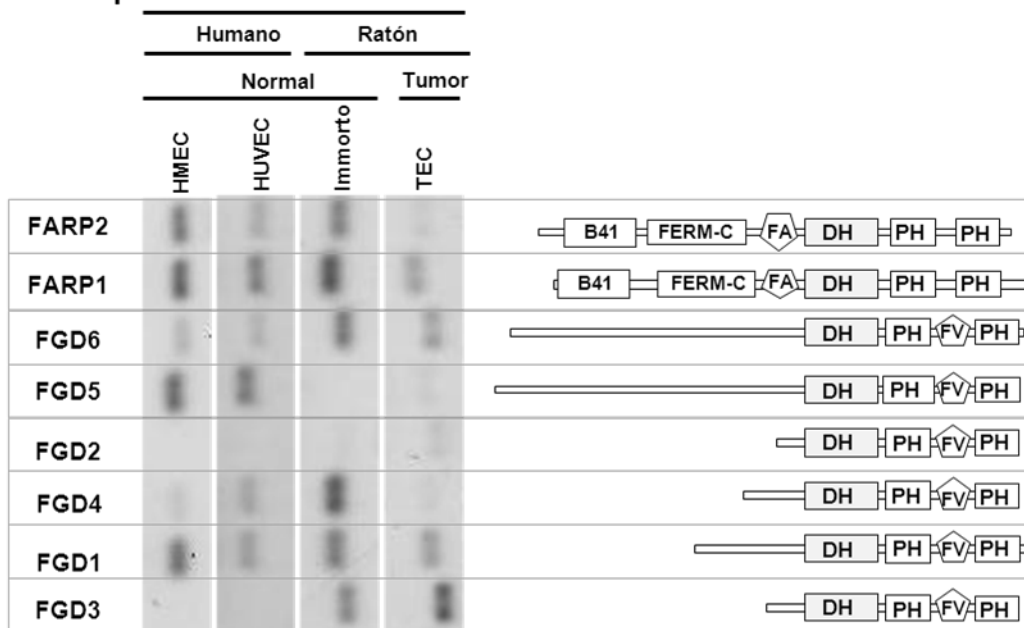


Fig 26 Expresión de RhoGEFs del grupo1A en diferentes tipos celulares endoteliales

La expresión de FARP1 fue constante en todos los tipos de células endoteliales, en tanto que FARP2 vio aumentada su expresión en células endoteliales HMEC comparada con los demás tipos de células endoteliales. En el segundo subgrupo se incluyen 6 GEFs con una estructura similar constituida por 4 dominios: DH, PH, FV (comúnmente implicado en el reclutamiento a la membrana ya que reconoce fosfatidil-inositol-3 fosfato) y un segundo dominio PH. De estos, FGD6 fue menos abundante en células endoteliales humanas, en contraste con FGD5 que tuvo un perfil de expresión inverso. FGD2 no se expresó en células endoteliales humanas y se expresó en células endoteliales

de ratón IMEC y fue mayor su expresión en células endoteliales de ratón TEC. FGD4 se expresó en todos los tipos celulares endoteliales teniendo mayor expresión en las células endoteliales de ratón IMEC. FGD1 se expresó de manera similar en todos los tipos celulares endoteliales. FGD3 solo se expresó en células endoteliales de ratón IMEC y TEC.

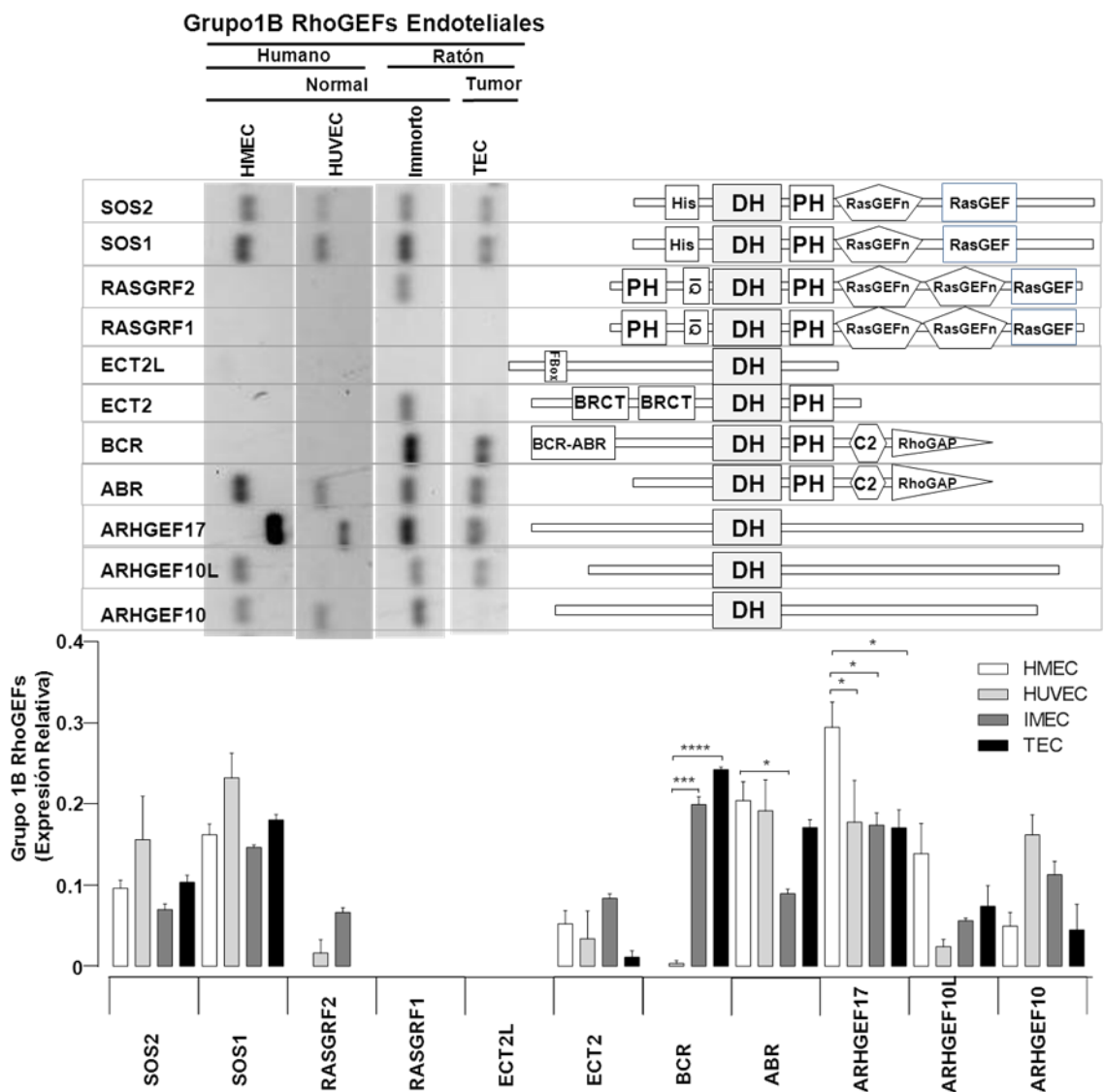


Fig. 27 Expresión de RhoGEFs del grupo1B en diferentes tipos celulares endoteliales

El grupo 1B tiene 11 miembros y podemos dividirlos en cuatro subgrupos considerando sus dominios Figura 27. El primer subgrupo está constituido por SOS1 y SOS2 quienes tienen dominios His, DH, PH, RasGEF_n y RasGEF y RASGRF1 y RASGRF2, con dominios PH, IQ, DH, PH, dos dominios RasGEF_n y RasGEF. SOS1 y SOS2 se expresaron en todos los tipos celulares endoteliales, tuvieron una mayor expresión en células endoteliales HUVEC. Respecto a RasGRF2, su expresión fue muy baja en células endoteliales HUVEC y células endoteliales de ratón IMEC y RasGRF1 no se expresó.

El segundo subgrupo, que incluye a ECT2L con dominios f-Box y DH y el GEF ECT2 con dos dominios BCRT, conocidos como dominios de unión a proteínas fosforiladas. ECT2L no se expresó en células endoteliales y ECT2 se expresó en todos los tipos celulares endoteliales, pero en menor grado en células endoteliales aisladas de tumores (TEC). El tercer subgrupo incluye a BCR, con un dominio Bcr-Abr, DH, PH, C2 (motivo de unión a calcio) y dominio RhoGAP: activador de la GTPasa. ABR con los mismos dominios excepto el bcr-abr. La expresión de BCR fue muy abundante en células endoteliales de ratón IMEC y TEC, pero en células endoteliales humanas sólo se detectó en HUVEC y con una expresión muy baja. ABR se expresó en todos los tipos celulares endoteliales, pero más en las células humanas. En el cuarto subgrupo están ARHGEF17, ARHGEF10 y ARHGEF10L que sólo cuentan con un dominio DH. ARHGEF17 se expresó en todos los tipos celulares endoteliales, fue más abundante en células endoteliales HMEC. ARHGEF10L se expresó en todos los tipos celulares endoteliales, aunque particularmente menos en Huvec. ARHGEF10 se expresó en todos los tipos celulares endoteliales, de forma más abundante en HUVEC y IMEC.

Group2A Endothelial RhoGEFs

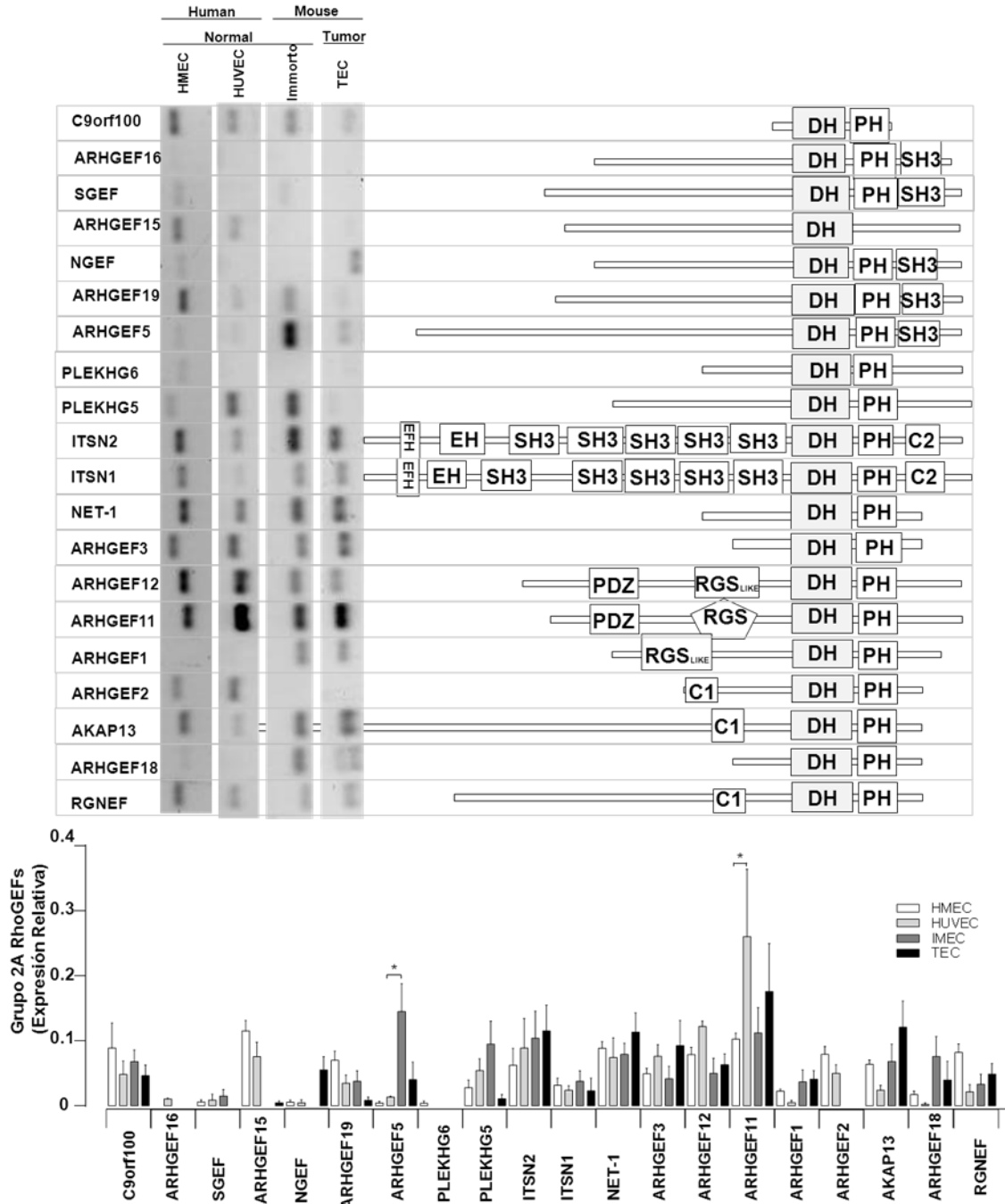


Fig 28 Expresión de RhoGEFs del grupo2A en diferentes tipos celulares endoteliales

El grupo 2A tiene 20 miembros que podemos dividir en 6 subgrupos tomando considerando los dominios de su estructura, Fig. 28. El primer subgrupo los que tienen solo en complejo de dominios DH y PH. C9orf100 se expresa en todos los tipos celulares endoteliales muy similar. PLEKHG6 se expresa muy

bajo en células endoteliales HMEC. PLEKHG5 se expresa en todos los tipos celulares endoteliales, se encuentra un poco más expresados células endoteliales de ratón IMEC y tiene muy baja expresión en células endoteliales de ratón TEC. NET1 y ARHGEF3 se expresan de forma similar en todos los tipos celulares endoteliales. ARHGEF18 se expresa en todos los tipos celulares endoteliales, tiene muy baja expresión células endoteliales HMEC. Segundo subgrupo son los que tienen dominios DH, PH y SH3: dominio que está implicado en interacciones proteína–proteína a través de regiones ricas en prolina. ARHGEF16 se expresó en células endoteliales HUVEC con muy baja expresión. SGEF su expresión fue muy baja y no se expresó en células endoteliales de ratón TEC. NGEF expresión similar y baja en células endoteliales HMEC y HUVEC. ARHGEF19 se expresó en todos los tipos celulares endoteliales, con más alta expresión en células endoteliales HMEC y baja expresión en células endoteliales de ratón TEC. ARHGEF5 se expresó en todos los tipos celulares endoteliales, con alta expresión en células las endoteliales de ratón IMEC, muy baja expresión en células endoteliales de humanas HMEC y HUVEC. El tercer subgrupo solo tienen el dominio DH, y es un solo RhoGEF: ARHGEF16 se expresa muy bajo en células endoteliales HUVEC. El cuarto subgrupo son dos RhoGEFs muy complejos ITSN1 y ITSN2 con dominios EFH: son motivos de unión a calcio, EH: dominio de unión a proteínas predominantemente hidrofóbicas como motivos Ser-Trp-Gly o motivos Phe-Trp (FW), Trp-Trp (WW). También reconocen secuencias consenso como Pro-Phe Asn. Después continúa el RhoGEF con 5 dominios SH3, DH, PH y C2: dominio de unión a proteína con motivos de unión Calcio. Se expresan en todos los tipos celulares endoteliales, ITSN2 su expresión es abundante en células TEC y ITSN1 su expresión es muy similar en todos tipos celulares endoteliales. En el quinto subgrupo es la familia de los RGS-RhoGEFs está constituido por tres RhoGEFs, ARHGEF12 (LARG), ARHGEF11 (pdzRhoGEF) y ARHGEF1 (p115RhoGEF). La actividad de estos RhoGEFs está regulada por Galpha12/13 a través de sus dominios RGS.

ARHGEF12 en el amino terminal tiene un dominio PDZ: es un dominio de unión a proteínas, Algunos PDZs se ha demostrado que se unen a polipéptidos C-terminal; otros parecen unirse polipéptidos internos (no-C-terminal). Los

dominios PDZs poseen diferentes especificidades de unión. Seguido de un dominio RGS: (Regulator of G Protein Signalling) regulador de señalización de la proteína G, promueven la velocidad de hidrolisis de GTP por lo tanto la actividad de GTPasa. Continuando con el complejo DH-PH. ARHGEF11 tiene los mismos dominios que el anterior RhoGEF. ARHGEF1 no tiene dominio PDZ, tiene el dominio RGS-like y el complejo DH-PH. ARHGEF12 se expresa en todos los tipos celulares endoteliales, con mayor expresión en células HUVEC. ARHGEF11 se expresa en todos los tipos celulares endoteliales, pero se observa una abundante expresión en células HUVEC y TEC. ARHGEF1 se expresa en todos los tipos celulares, con muy baja expresión en células HUVEC. El sexto subgrupo son los RhoGEFs que tienen un dominio C1: participa en traducción de señales intracelulares. Seguido del complejo DH-PH. ARHGEF2 se expresa solo en células endoteliales humanas HMEC y HUVEC. AKAP13 se expresa en todos los tipos celulares endoteliales, de manera abundante en células endoteliales de ratón TEC. RGNEF se expresa en todos los tipos celulares endoteliales, es más abundante en células endoteliales HMEC.

El grupo 2B tiene 24 miembros que dividimos en 9 subgrupos de acuerdo su estructura, Fig. 29. El primer subgrupo lo componen ARHGEF37 y TUBA que se caracterizan por tener un dominio BAR: las funciones del dominio BAR se han definido como un motivo de dimerización y como censando e induciendo la curvatura de la membrana. ARHGEF37 tiene el dominio DH seguido del dominio BAR y dos repeticiones del dominio SH3. TUBA tiene cuatro repeticiones SH3, seguido del dominio DH, BAR y dos repeticiones del dominio SH3. La expresión de ARHGEF37 en células HUVEC fue abundante y no se expresó en células endoteliales de ratón TEC. TUBA se expresó en todos los tipos celulares endoteliales, fue muy abundante en células endoteliales humanas y muy baja su expresión en células TEC. El segundo subgrupo incluye a los RhoGEFs que forman la familia de VAV, todos los miembros tienen un dominio CH, seguido del complejo DH-PH, C1, SH3, SH2 (que reconoce tirosinas fosforiladas) y otro dominio SH3. VAV2 se expresa abundante en células endoteliales HMEC e IMEC y no se expresa en células

TEC. VAV1 se expresa abundante en células TEC y muy bajo en células

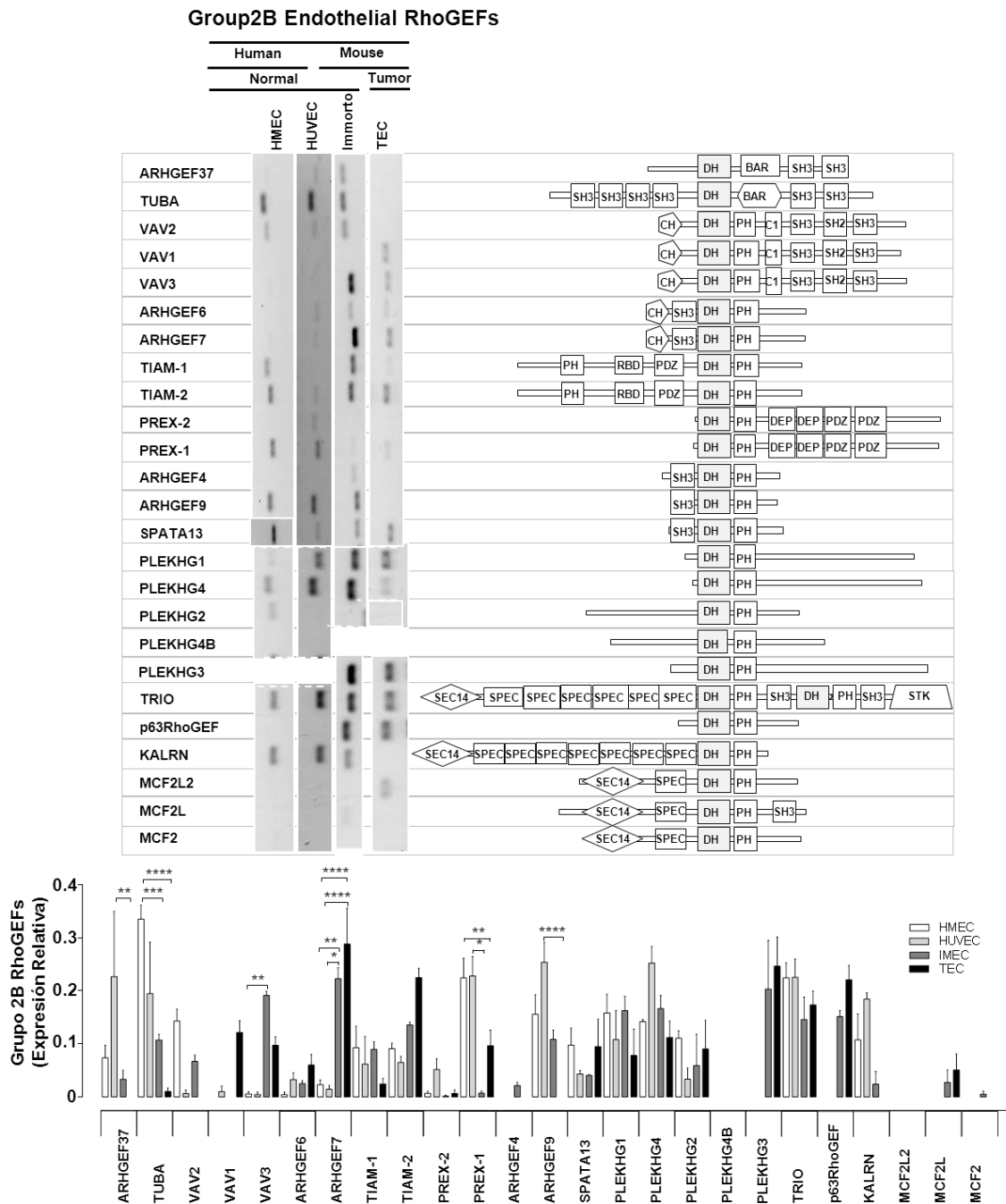


Fig 29 Expresión de RhoGEFs del grupo2B en diferentes tipos celulares endoteliales

HUVEC. VAV3 se expresa en todos los tipos celulares endoteliales, pero es más abundante en las células endoteliales de ratón IMEC y TEC.

El tercer subgrupo incluye a ARHGEF6 y ARHGEF7, los dos tienen un dominio CH, luego un SH3, seguido del complejo DH-PH. ARHGEF6 se expresa en todos los tipos celulares endoteliales, es más abundante en células

endoteliales de ratón TEC. ARHGEF7 se expresa en todos los tipos celulares endoteliales, es muy abundante en células endoteliales de ratón, sobre todo en las células TEC. El cuarto subgrupo lo conforman TIAM2 y TIAM1, tienen dominios PH en la región amino, un dominio RBD de unión a Ras, seguido de un dominio PDZ y el complejo DH-PH. TIAM1 se expresa en todos los tipos celulares endoteliales, es muy baja su expresión en células TEC. TIAM2 se expresa en todas las células endoteliales, es muy abundante su expresión en células endoteliales de ratón, sobre todo en las células TEC. El quinto subgrupo son los RhoGEFs PREX1 y PREX2, tienen el complejo DH-PH seguido de dos repeticiones DEP, seguido de dos repeticiones PDZ. PREX2 se expresa muy poco en todos los tipos celulares endoteliales, solo en células HUVEC la expresión es mayor. PREX1 se expresa en todos los tipos celulares endoteliales, es más abundante en células humanas y tiene una expresión media en células TEC de ratón. El sexto subgrupo incluye a tres RhoGEFs: ARHGEF4, ARHGEF9 y SPATA13, caracterizados por presentar un dominio SH3 seguido del módulo DH-PH. ARHGEF4 se expresa muy poco en células IMEC de ratón y está ausente en el resto. ARHGEF9 se expresa muy abundante en células HUVEC y no se detecta en células TEC (endoteliales tumorales). SPATA13 se expresa en todos los tipos celulares endoteliales, con mayor expresión en células HMEC y TEC. El séptimo subgrupo tiene a 6 RhoGEFs cuya estructura sólo cuenta con el módulo DH-PH. PLEKHG1 se expresa en todos los tipos celulares endoteliales de manera similar. PLEKGH4 se expresa en todos los tipos celulares y es muy abundante en células HUVEC. PLEKHG2 se expresa a niveles muy bajos en todos los tipos celulares endoteliales, su expresión es particularmente baja en HUVEC. PLEKHG4B corresponde a un RhoGEF cuyo gen existe en el genoma humano pero no en el de ratón, éste no se detectó expresado en células endoteliales humanas. Lo contrario aplica para PLEKHG3, el cual de acuerdo al SMART no existe en el genoma humano, pero sí en el de ratón; en este caso su expresión fue muy similar en células endoteliales IMEC y TEC. El GEF p63RhoGEF sólo se detectó en células IMEC y TEC (endoteliales de ratón) mostrando niveles de expresión similares. El octavo subgrupo incluye a dos RhoGEFs: Trio y KARLN, estos tienen un gran número de dominios. Inician con un dominio SEC14 (considerado de unión a lípidos), seguido de seis dominios SPEC

(estos se encuentran en proteínas implicadas en la estructura del citoesqueleto), luego el módulo DH-PH, un SH3, otro complejo DH-PH, otro SH3 y un dominio STKc: dominio catalítico de cinasa de serina /treonina. Trio se expresa en todas los tipos celulares endoteliales, es más abundante en las células endoteliales humanas. KARLN tiene dominios SEC14, siete repeticiones SPEC y el complejo DH-PH. KARLN se expresa de forma similar en células endoteliales humanas y a niveles muy bajos en células endoteliales IMEC de ratón. En el noveno subgrupo están tres RhoGEFs: MCF2L2, MCF2L y MCF2, estos tienen dominios SEC14, luego SPEC y el módulo DH-PH; en el caso de MCF2L además se incluye un dominio SH3. De este grupo sólo se detectó a MCF2 a niveles muy bajos en células endoteliales IMEC de ratón y MCF2L se expresó a niveles muy bajos en células endoteliales de ratón IMEC y TEC.

Expresión de RhoGEFs atípicos

Hasta aquí mostramos los resultados de los datos de expresión de los 63 RhoGEFs que incluye la base de datos de SMART. Además, decidimos analizar la expresión de otros RhoGEFs que la literatura ha reportado como tales (77) (aún cuando la base de datos SMART no los registra). En esta situación se incluyen 7 proteínas que de acuerdo a la literatura tienen un dominio DH, los identificamos aquí como RhoGEFs atípicos. Identificamos la secuencia de cada uno de ellos en las bases de datos del NCBI y de acuerdo a esta información ubicamos el dominio DH correspondiente. En este caso usando la plataforma de NCBI que predice la existencia de dominios conservados. Hicimos un alineamiento de los dominios DH con el programa Clustal-Omega y obtuvimos un árbol filogenético con Figtree 1.4, figura 20, que tomamos como base para ordenar los RhoGEFs atípicos. De acuerdo a la literatura existe poca información de estos RhoGEFs y hasta ahora no habían sido estudiados en células endoteliales. En la figura 30 mostramos la expresión y características estructurales de este conjunto de RhoGEFs atípicos. Por su abundancia destacan ARHGEF40/solo y ALS2, Con una expresión media encontramos a PLEKHG3 y con muy baja expresión a los GEFs ARHGEF33 y ARHGEF38; en tanto que PLEKHG7 y Obscurin no fueron detectados. En cuanto a la estructura de los RhoGEFs atípicos que sí fueron detectados en

células endoteliales destaca ALS2 por ser el único GEF que cuenta con dominios Morn, a los que se ha atribuido una posible función como vínculo para la unión a membrana. En tanto que ARHGEF38 también resulta peculiar por contar con un dominio BAR y dos SH3, lo que lo relaciona claramente con Tuba y ARHGEF37, del subgrupo 2B del grupo inicial de 63 RhoGEFs reconocidos por la base de datos SMART.

RhoGEFs atípicos

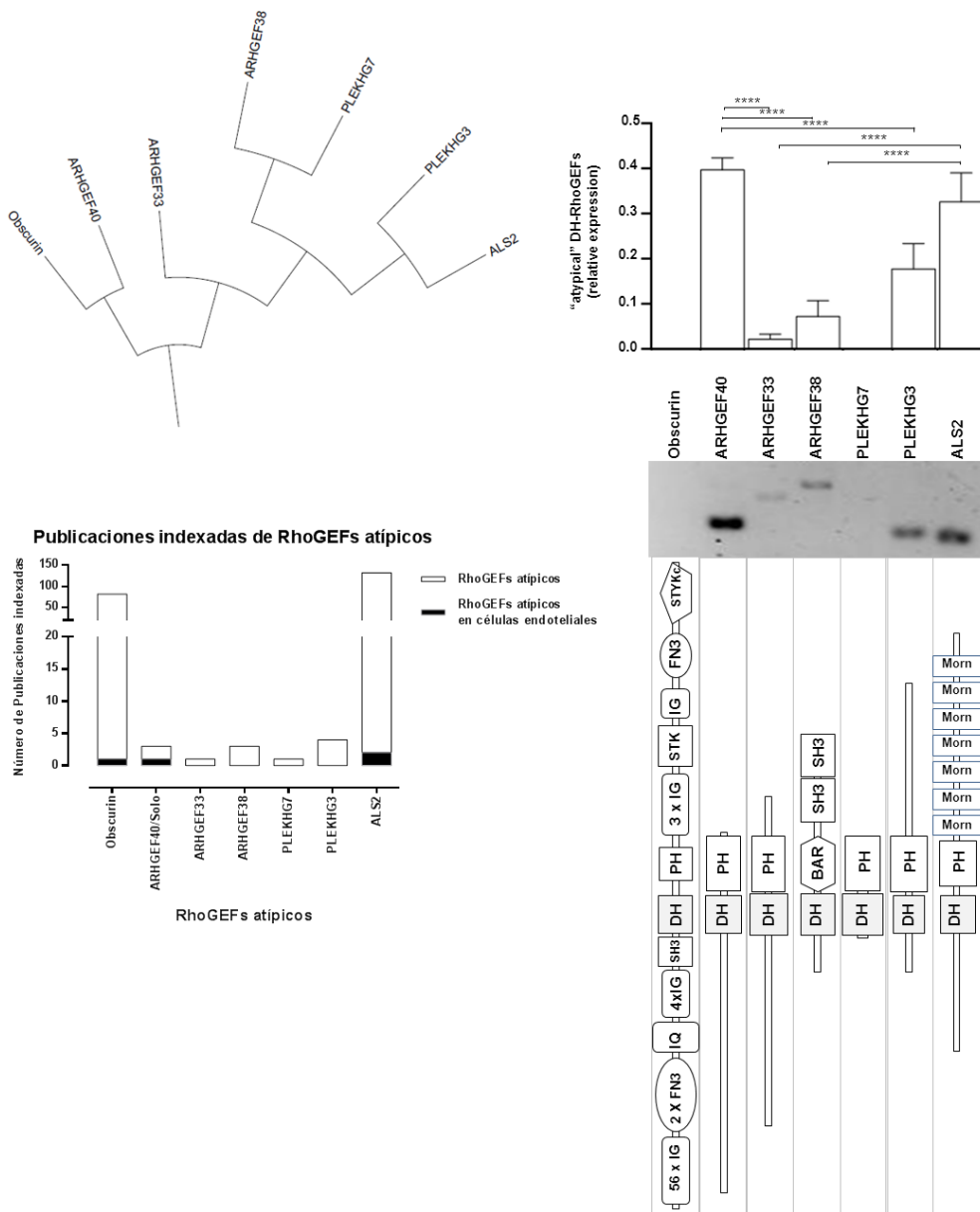
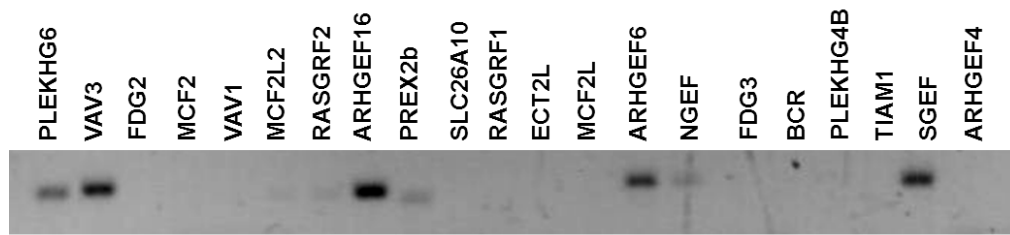
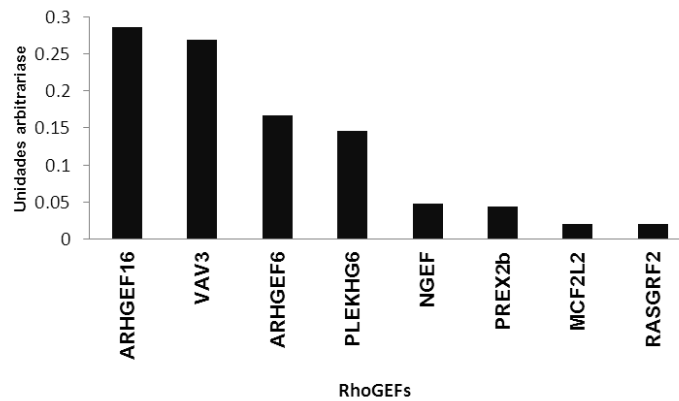


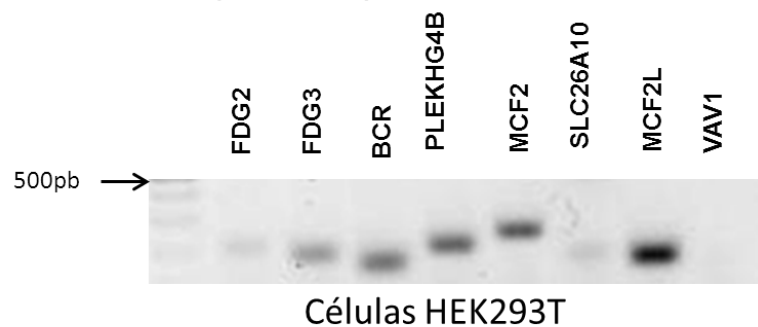
Fig 30 Caracterización de RhoGEFs atípicos en células endoteliales HMEC



Expresión de RhoGEFs a 35 ciclos



RhoGEFs que no se expresan en células endoteliales



Células HEK293T

Fig. 31 Análisis de la expresión de RhoGEFs endoteliales empleando RT-PCR a 35 ciclos de amplificación y uso de RNA total de células HEK293T como control positivo para analizar de la expresión de RhoGEFs que resultaron ausentes en células endoteliales.

Análisis de la expresión de RhoGEFs endoteliales empleando RT-PCR a 35 ciclos de amplificación

Puesto que en el primer análisis de expresión de RhoGEFs en células endoteliales HMEC utilizamos RT-PCR y 30 ciclos de amplificación, obteniendo como resultado que varios RhoGEFs no fueron detectados, consideramos que esto podría deberse a que efectivamente estuvieran ausentes, a que se expresaran a niveles no detectables en tales condiciones o bien a que los primers no hubieran sido efectivos. Para descartar estas alternativas se hicieron análisis a 35 ciclos de amplificación para los RhoGEFs que

inicialmente no fueron detectados en células endoteliales HMEC y además se utilizó RNA de células HEK293Tm, a 30 ciclos. Con este análisis encontramos detectamos a varios GEFs que se expresan poco en células endoteliales: PLEKHG6, VAV3, ARHGEF6, NGEF, P-REX2B, MCF2L2 y RASGRF2, en tanto que FGD2, FGD3, BCR, PLEKHG4B, MCF2, SLC26A10 y MCF2L efectivamente estuvieron ausentes en la células endoteliales HMEC y fueron detectados efectivamente en las HEK293T, usadas en este caso como control. El único caso que no fue detectable fue VAV1, el cual según la bibliografía se expresa exclusivamente en células del sistema inmune.

Efecto del VEGF en la expresión de RhoGEFs en células HMEC

Normalización de cDNA de células endoteliales HMEC

Con la finalidad de analizar el efecto VEGF en la expresión de RhoGEFs en células HMEC, realizamos un curso temporal a 0, 1, 3 y 12 horas estimulando a células endoteliales HMEC con 100ng/ml de VEGF. Como controles utilizamos primers para VEGFR2, VEGFR1 y VEGFR3. Como se esperaba de acuerdo a la literatura, el receptor que más se expresa en células HMEC es el VEGFR2 seguido de VEGFR1 y muy poca expresión el VEGFR3, que es considerado específico de células endoteliales linfáticas. Mostramos aquí como ejemplo el RNA utilizado para estos experimentos, en la figura 32 se observa la buena calidad del RNA obtenido por el método de trizol (pag.52). Para optimizar las condiciones y asegurar que en cada caso se usara una concentración equivalente de cDNA se realizó la retro-transcripción (pag.53) y se ajustó la concentración de cDNA obtenido considerando como base la expresión de β -actina, considerada una proteína ubicua. Se realizaron diferentes diluciones para garantizar que la cantidad de cDNA estaba calibrada y que daría lugar a resultados en los que diferencias entre mensajeros específicos se hicieran evidentes. Se observó una amplificación comparable del cDNA de β -actina entre las diferentes preparaciones obtenidas a partir de RNA extraído después de los tiempos indicados de estimulación con VEGF. Ademásm para comprobar que el VEGF efectivamente estuviera activando cascadas de señalización en las células endoteliales que llevaran a una

expresión controlada de genes, se investigó el efecto de este factor de crecimiento en la expresión de HLX-1, un gen cuya expresión aumenta en respuesta a VEGF.(78)

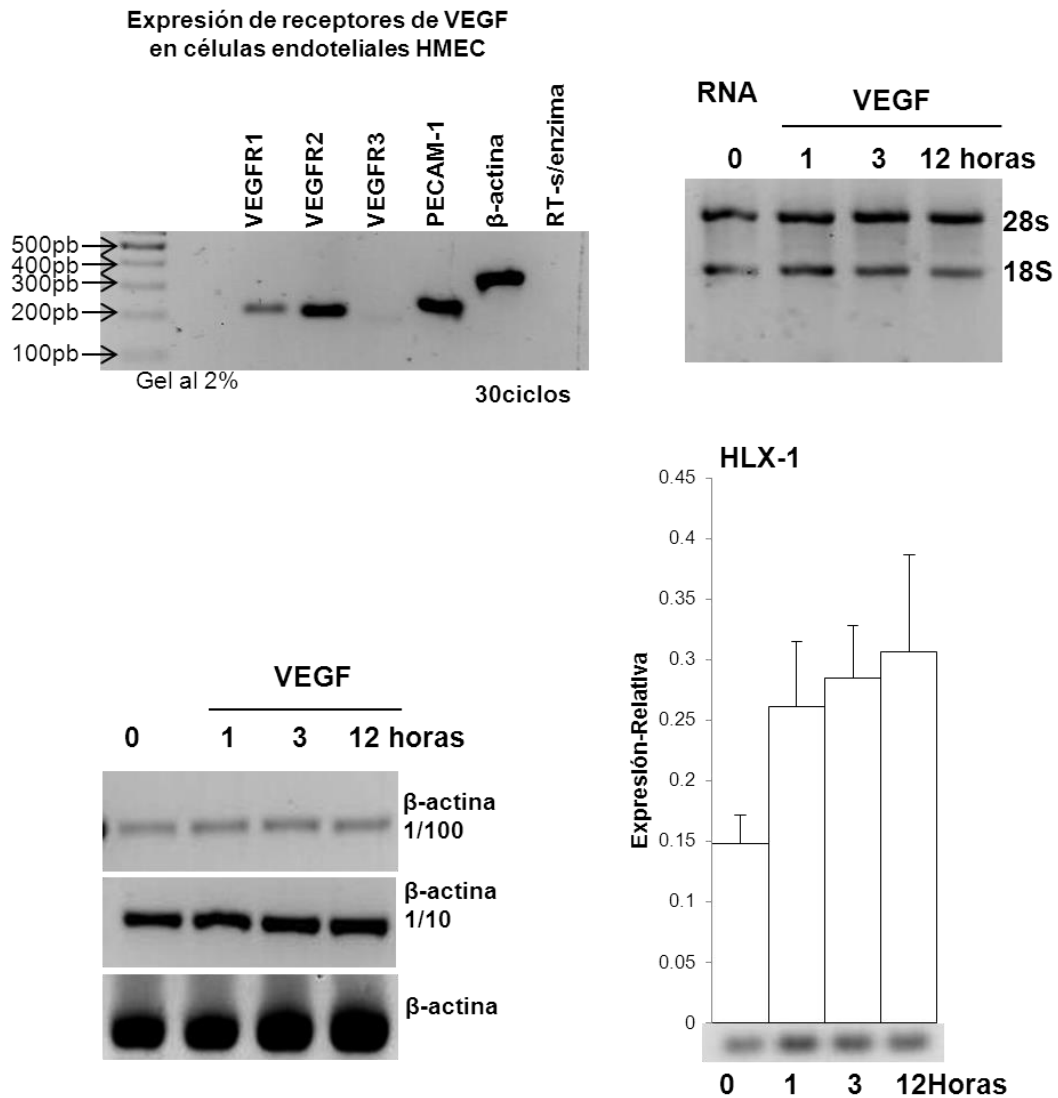


Fig 32 Caracterización y normalización del cDNA de células endoteliales estimuladas a diferentes tiempos con VEGF.

Una vez normalizado el cDNA se analizó la expresión de todos los RhoGEFs. El VEGF promovió la expresión de 11 RhoGEFs del grupo inicial de 63 Fig. (33). De estos 11, sólo en los casos de RASGRF2 y PREX2 la expresión aumentó más de dos veces en respuesta a VEGF. En tanto que FGD5, ITSN1, AKAP13, VAV3, ARHGEF6, TIAM1, ARHGEF7, PREX1 y PLEKHG1 mostraron

un incremento menor, pero reproducible y significativo, en su expresión en células endoteliales estimuladas con VEGF, Fig. 33.

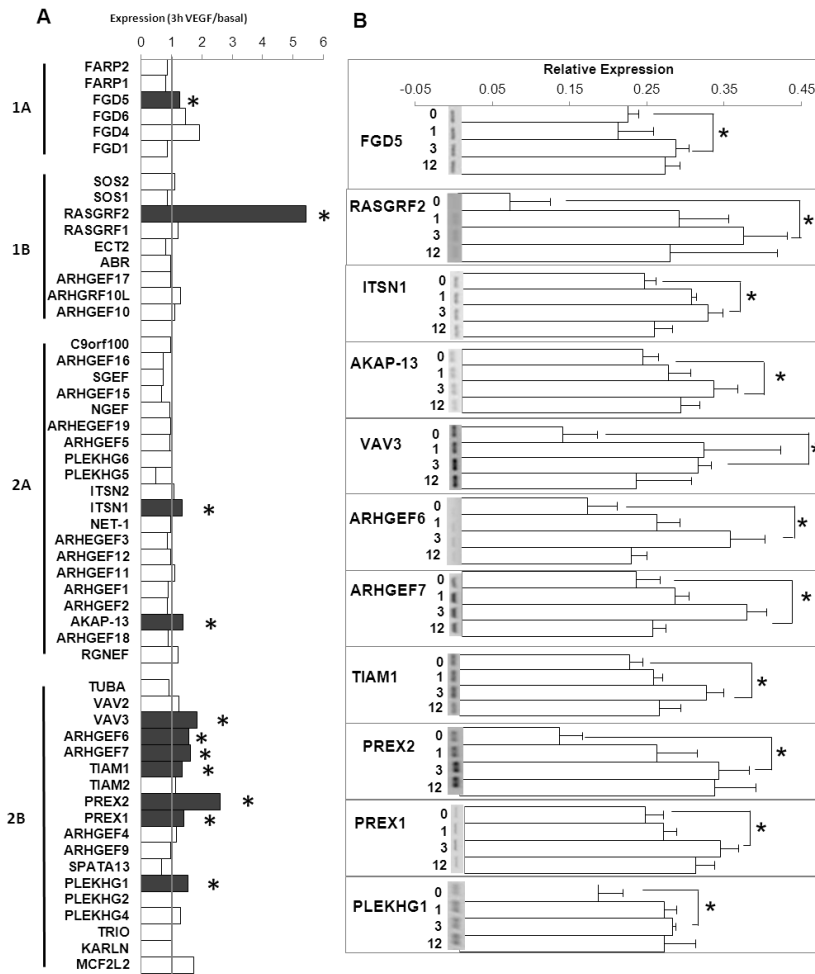


Fig. 33 RhoGEFs inducibles por VEGF en células endoteliales HMEC

- A) Número de veces que aumentaron los RhoGEFs en células endoteliales estimuladas con VEGF durante 3 horas. B) Representación de los niveles de expresión de los RhoGEFs que son inducibles 3 horas de estímulo con VEGF.

Análisis a nivel de proteína de la expresión en células endoteliales de RhoGEFs seleccionados

Habiendo demostrado la expresión de múltiples RhoGEFs, a nivel de RNA mensajero, en diferentes tipos celulares endoteliales, y que la expresión de algunos de ellos aumenta en respuesta a VEGF, decidimos analizar a nivel de proteína la expresión de algunos de ellos, particularmente los que han sido vinculados a la señalización de receptores acoplados a proteínas G. En este caso, investigamos el efecto de VEGF a 3 horas de estímulo, analizando por *western-blot* la expresión de ARHGEF1, ARHGEF2, ARHGEF7, ARHGEF12, Trio, ITSN1L, PREX-1 y Vav2. Además, incluimos como control el análisis de la expresión de α -actina y Akt, todo esto en lisados totales de células endoteliales HMEC, estimuladas o no con VEGF, según se indicó. Los niveles de proteína de los RhoGEFs analizados no se modificaron a 3 horas de estímulo con VEGF, lo que indica que la temporalidad a nivel de transcripción de los RhoGEFs no correlaciona con la expresión a nivel de proteína. Probablemente debido a los diferentes mecanismos de control y a la temporalidad en la síntesis y degradación de las proteínas, Fig. 34.

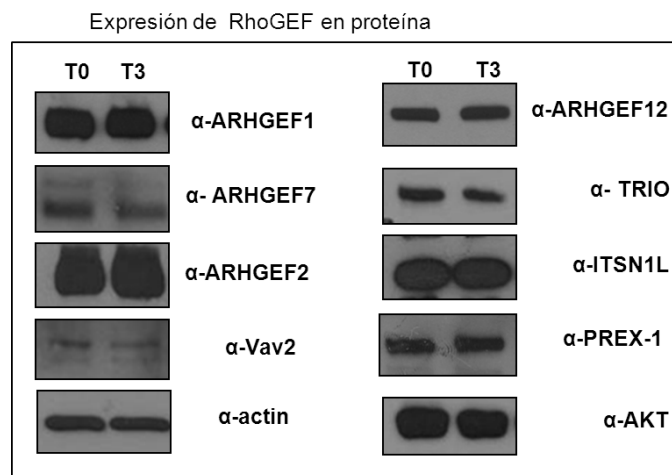


Fig 34 Expresión de RhoGEFs en proteína a 3horas de estímulo con VEGF.

Analizamos la expresión a nivel de proteína de los RhoGEFs ARHGEF1, ARHGEF2, ARHGEF7, ARHGEF12, Trio, ITSN1L, PREX-1 y Vav2 en células endoteliales estimuladas con VEGF durante 3 horas.

Expresión de GEFs de la familia de DOCK

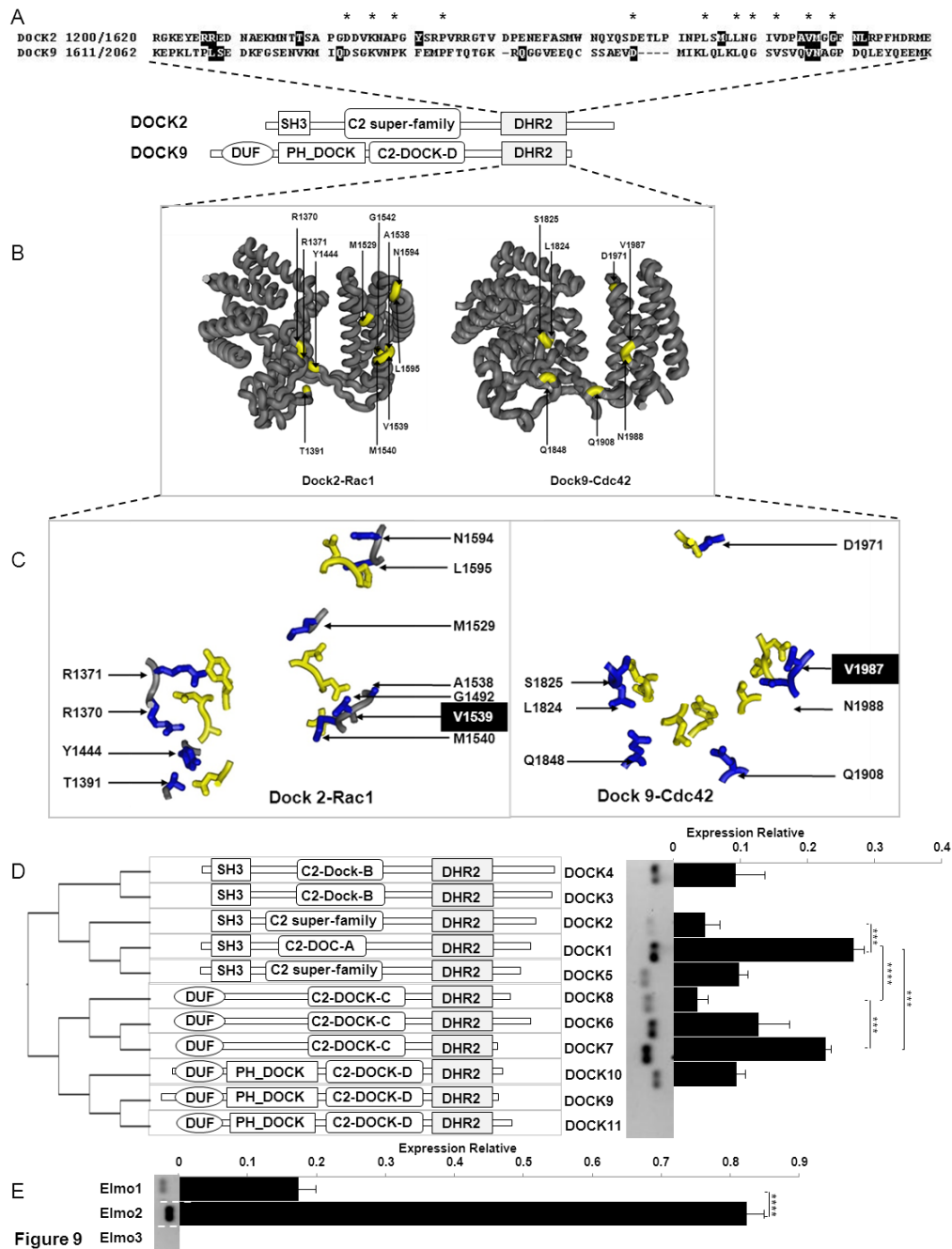


Fig. 35 Características estructurales y análisis de expresión de los GEFs de la familia de DOCK en células endoteliales.

A) Alineamiento del dominio de GEF (DHR2) e identificación de los aminoácidos que participan en la interfase de la unión a la GTPasa (en recuadro negro) y cuáles de esos aminoácidos se conservan en los dominios DHR2 marcados con *. Estructura de los GEFs Dock 2 y Dock9. B) identificación de dominios que participan en la interfase. C) Interfase: en azul la estructura tridimensional de los aminoácidos del GEF que participan en la interfase, en amarillo la estructura tridimensional de los aminoácidos de la GTPasa. D) árbol filogenético del dominio DHR2 (Dock), expresión de Docks y Elmos en células endoteliales HMEC.

El grupo de proteínas de la familia de Dock puede activar a las GTPasas Rac y Cdc42. En mamíferos, esta familia esta conformada por 11 proteínas. Varios GEFs de este grupo forman un complejo funcional con proteínas de la familia de ELMO. Siguiendo la estrategia que usamos para el estudio de GEFs de la familia de homólogos a *Dbp*, inicialmente analizamos el dominio DHR2 (dominio catalítico en la familia de DOCK), identificamos a los aminoácidos que participan en la superficie de interacción entre este dominio y la GTPasa e investigamos cuáles de estos aminoácidos son conservados filogenéticamente. Con el programa Cn3D analizamos la estructura de los complejos cristalizados. En la figura 35 (A-C) mostramos la secuencia del dominio, la estructura general del GEF analizado, la conformación del dominio DHR2 indicando en amarillo los sitios de interacción con la GTPasa así como un acercamiento en el que se muestran los aminoácidos que participan en tal interacción. En azul y en amarillo se observan los aminoácidos del GEF y la GTPasa, respectivamente, que participan en la interacción a una distancia límite de 3 Å seleccionada en el análisis en CN3D. Para sistematizar nuestro análisis de expresión determinamos las relaciones filogenéticas en este grupo de GEFs mediante un alineamiento, hecho con el programa Clustal-Omega, de los 11 DOCKs y obtuvimos un árbol filogenético con ayuda de Figtree1.4, mismo que mostramos en el la figura 35 (D). Por ultimo, utilizando primers específicos para cada uno de estos GEFs y para cada uno de los 3 ELMOs codificados en el genoma humano, analizamos su expresión en células endoteliales HMEC. Destaca la expresión abundante de DOCK1 y 7, cada uno de ellos ubicado en un subgrupo diferente de esta familia. Los DOCKs 3, 9 y 11 estuvieron ausentes y el resto mostraron una expresión moderada en comparación con los dos más abundantes, antes mencionados. Del grupo de ELMOs destacó ELMO2 por encontrarse abundantemente expresado. Este fue mucho más abundante que ELMO1, en tanto que ELMO3 no fue detectado.

Discusión

La angiogénesis es la formación de vasos sanguíneos a partir de capilares pre-existentes, ocurre de manera fisiológica y patológica. Nosotros estamos interesados en la angiogénesis tumoral, considerada importante desde etapas tempranas del proceso canceroso, puesto que el crecimiento de tumores pequeños, de 1 a 2 mm, depende de que se formen nuevos capilares en torno a ellos. Los tumores secretan factores angiogénicos, entre los que destaca el VEGF, que reclutan a células endoteliales y a otros tipos celulares para formar nuevos capilares hacia el tumor. Durante la migración endotelial se activan GTPasas de la familia de Rho, éstas son las encargadas de modular los cambios morfológicos requeridos para que la célula endotelial pueda responder moviéndose en dirección a factores angiogénicos. Los RhoGEFs integran tales respuestas angiogénicas, ya que cuentan con múltiples dominios que integran las señales y conducen a la activación del dominio catalítico que directamente activa a la GTPasa (79). Este modelo general implica múltiples posibilidades, ya que en el genoma humano existen decenas de genes que codifican para RhoGEFs cuya expresión no ha sido analizada de forma sistemática en células endoteliales.

La identificación sistemática de RhoGEFs endoteliales constituye el primer paso para elucidar sus respectivas funciones como reguladores de la dinámica del citoesqueleto endotelial. En los vasos sanguíneos, las GTPasas contribuyen a crear sitios de nucleación de actina en respuesta a factores angiogénicos, dando lugar al ensamble dinámico de estructuras del citoesqueleto indispensables para iniciar la formación de brotes vasculares. Se ha descrito que diferentes RhoGEFs participan en este proceso y se han realizado estudios *in silico* aprovechando la información en bases de datos públicas para investigar la expresión de RhoGEFs en células endoteliales (80). En este trabajo nos enfocamos en analizar la expresión de todos los RhoGEFs (activadores directos de Rho GTPasas, identificados por su dominio DH, presente en todos los RhoGEF homólogos con *Dbf*) en células endoteliales de humano (HMEC y HUVEC) y ratón (IMEC) y células endoteliales derivadas de tumor (TEC). Además, analizamos la expresión de los 11 GEFs de la familia de DOCK y sus 3 compañeros, con los que forman un complejo funcional,

pertenecientes al grupo de ELMO. En concreto, demostramos la expresión en células endoteliales humanas (HMEC) de 52 GEFs de un total de 70 pertenecientes al grupo de DH-RhoGEFs, 8 de 11 de la familia de Dock y 2 de 3 ELMOs. Estos resultados establecen la base para estudios futuros de los subgrupos de RhoGEFs endoteliales, la mayoría de los cuales no han sido estudiados en el contexto de la angiogénesis.

El análisis filogenético de los dominios DH reveló la existencia de dos grupos principales de RhoGEFs, cada uno subdividido en dos ramas con múltiples miembros cada uno. Lo realizamos para representar y comparar las secuencias y resaltar las zonas de similitud, que podrían indicar relaciones funcionales o evolutivas entre los genes. Si comparamos un RhoGEF con otro cercano en el árbol cuya función haya sido podríamos deducir o proponer su función apelando a la homología de su secuencia del dominio DH. Dicho de otra manera, si la composición y orden de sus componentes son muy parecidos podríamos postular hipótesis sobre su función de acuerdo a las homologías. Por supuesto, tenemos que tomar en cuenta los dominios accesorios de cada RhoGEF que contribuyen a su regulación y estructura tridimensional, Fig. 20. La mayoría de los grupos filogenéticos de RhoGEFs fueron detectados expresados en células endoteliales. Interesantemente, algunos de estos RhoGEFs mostraron cambios en su expresión en células endoteliales derivadas de tumores.

La estructura general de los diferentes dominios DH es similar; sin embargo, la superficie de interacción con las distintas Rho GTPasas varía ampliamente: sólo dos aminoácidos en esta región se conservan en el DH de ITSN-1, ARHGEF11 y Vav1. Esta relación secuencia-estructura seguramente está implicada en determinar la selectividad de las proteínas Dbl con su GTPasa y analizarla a este grado de profundidad resulta relevante en el camino hacia el diseño de fármacos que bloqueen a RhoGEFs específicos. Identificamos en nuestro estudio a E741 y N921 (en ARHGEF11/PDZRhoGEF) como aminoácidos conservados que participan en la interfase de interacción entre RhoGEFs y GTPasas. Este hallazgo es consistente con el resultado del análisis sistemático reportado en el trabajo de Mohammad Reza y colaboradores (77), en el que en base a alineamientos múltiples se construyó

una matriz basada en la estructura-interacción y se analizaron interacciones de pares de 74 RhoGEFs y 12 RhoGTPasas, encontrándose once pares de interacciones interesantes.

Los RhoGEFs que se expresaron más en células endoteliales aisladas de tumorales de ratón (TEC), en comparación con los otros tipos de células endoteliales, fueron: FGD6, FGD2, FGD3, BCR, NGEF, NET1, ARHGEF3, ARHGEF1, AKAP13, Vav1, ARHGEF6, ARHGEF7, TIAM2, PLEKHG3, p63RhoGEF y MCF2L. Estas diferencias sugieren que las células endoteliales ajustan su repertorio de RhoGEFs como parte de su respuesta angiogénica y, potencialmente, la acción de algunos de estos RhoGEFs podría estar vinculada a la integración de señales angiogénicas que inician los brotes endoteliales. Por lo tanto, se podría especular que los cambios en su expresión en células endoteliales tumorales podrían estar vinculados a una disminución en la estabilidad vascular.

Los RhoGEFs que disminuyeron su expresión en células endoteliales tumorales de ratón (TEC), en comparación con los otros tipos celulares endoteliales, fueron: FARP2, FGD4, FGD5, ARHGEF10, Sos1, Sos2, ECT2, ARHGEF17, ARHGEF19, ARHGEF15, ARHGEF5, PLEKHG5, ARHGEF12, ARHGEF18, RGNEF, TUBA, Vav3, TIAM1, PREX2, PLEKHG1, PLEKHG4 y Trio. Muchos otros RhoGEFs mostraron niveles de expresión comparables entre distintos tipos de células endoteliales, lo cual resalta aún más el posible significado funcional de los que sí mostraron diferencias. Llamando particularmente la atención los antes indicados debido a que tales diferencias se encontraron en células endoteliales derivadas de tumores. Además, sólo un grupo pequeño de RhoGEFs estuvieron ausentes en células endoteliales, lo que resalta la importancia funcional de este grupo de proteínas y evidencia el amplio repertorio requerido para integrar cascadas de señalización que conducen a la activación de GTPasas de la familia de Rho. Además de que revela un margen importante para estudios futuros tendientes a entender las implicaciones específicas que cada RhoGEF tiene en el contexto de la angiogénesis tumoral y las posibilidades de desarrollo de fármacos.

En el grupo 1A la expresión de FGD5 fue muy alta en células endoteliales humanas HMEC y HUVEC. En cuanto a las células TEC, su expresión disminuyó considerablemente, pero la expresión de FGD6 aumentó con respecto a FGD5. Dado que ambos RhoGEFs tienen una estructura similar, tal vez sus actividades podrían ser redundantes. FGD5 participa en la angiogénesis temprana removiendo los nuevos vasos sanguíneos aberrantes y es identificado como regulador genético de la red secundaria (54). FGD5 tiene una localización subcelular y función en células endoteliales vasculares, ejerciendo una acción proangiogénica, en la formación de nuevas redes, permeabilidad, movimiento direccional y proliferación (53). Mientras que los efectos endoteliales de FGD6 son actualmente desconocidas, es probable que coordine la polaridad a través de Cdc42 y el reciclaje de membrana según su función reportada en los osteoclastos (81). El siRNA de FGD4 inhibe la formación de lumen sugiriendo que participa en la lumenogénesis. Interesantemente, este GEF se encontró disminuido en las células TEC (82). No hay reportes de este RhoGEF en células endoteliales, en nuestro trabajo FGD2 es uno de los más expresados en células TEC. FGD3 y FGD1 inducen diferentes cambios morfológicos en células HeLa. FGD1 induce largas protrusiones mientras que FGD3 induce anchas protrusiones. FGD1 estimula la migración mientras que FGD3 la inhibe. A pesar de que son RhoGEFs altamente homólogos, tienen diferentes papeles para regular las funciones celulares (83). En nuestros resultados, FGD3 se encontró altamente expresado en células endoteliales tumorales TEC.

Del grupo 1B, ARHGEF17 que originalmente fue identificado como un gen que sobreexpresado en células endoteliales durante la angiogénesis inducida por células tumorales (84), se encontró muy bien expresado en células HMEC y medianamente expresado en células TEC, tal vez debido al tipo endotelial. En el trabajo de Natalia Mitin (85) se demuestra que ARHGEF17 regula la migración de las células endoteliales, específicamente, que la señalización ARHGEF17 es esencial para mantener la organización del citoesqueleto de actina y adhesiones focales en las zonas de protrusión de la célula endotelial (85). BCR es un RhoGEF para RhoA, es una proteína que tiene un dominio de GEF y uno de GAP, está altamente expresado en células HUVEC, regula la

actividad de RhoA, fibras de estrés y formación de adhesiones focales en queratinocitos (80, 86). En nuestros resultados, BCR se encuentra bien expresado en células endoteliales de ratón IMEC y derivadas de tumor TEC. De hecho, es el RhoGEFs más abundante del Grupo 1B. Sin embargo, no se detectó su expresión en células endoteliales HMEC y su expresión en HUVEC fue muy baja. Es importante destacar que en los casos cuando no fue detectada la expresión de un RhoGEF, la eficiencia de los primers fue se confirmó utilizando otros tipos celulares. Nuestros primers fueron diseñados para detectar RhoGEFs independientemente de posibles variantes de empalme.

En el grupo 2A, el GEF PLEKHG5 (Syx) se expresa de manera baja en células TEC. Como se mencionó en la introducción, este GEF se recluta a la uniones de las células endoteliales y además desempeña un papel específico en la migración direccional de brotes endoteliales durante la angiogénesis de vertebrados(49, 50). El VEGF induce el desensamble de las uniones endoteliales y aumenta la permeabilidad de la monocapa desplazando a Syx de las uniones. Por el contrario, Ang1 estabiliza las uniones y sostiene la permeabilidad de los vasos mediante el mantenimiento de Syx en las uniones (87).

NGEF es un RhoGEF para RhoA, regula la dinámica de actina y juega un papel esencial en la maduración y el funcionamiento de la unión neuromuscular de los mamíferos (88). NGEF se expresó muy bien en células TEC, hasta el momento no hay reportes de este RhoGEF en células endoteliales, lo que lo hace un buen candidato de estudio.

ARHGEF5 es crucial para la formación de podosomas inducidos por Src. La sobreexpresión de ARHGEF5 promueve la remodelación de las fibras de estrés de actina a través de la activación de RhoA (89). En nuestro trabajo, la expresión de ARHGEF5 es media en células TEC. Esto destaca respecto a un análisis bioinformático en que éste GEF no fue detectado (80). ARHGEF5 se expresó en células MS1 endoteliales y participa en la vía de señalización de TGF β (90).

Se demostró que la actividad AKAP-Lbc Rho-GEF es estimulada por la subunidad α de la proteína G heterotrimeric G12 (91). AKAP13 se encontró bien expresado en células TEC. Alteraciones genéticas del gen de AKAP13 conducen a la activación constitutiva de RhoA, facilitando así el desarrollo del cáncer, lo que sugiere que la expresión elevada de AKAP13 en las células TEC, posiblemente se correlacione con una actividad constitutiva elevada de la GTPasa RhoA.

La familia de los RGS-RhoGEFs comprende a p115RhoGEF (LSC), ARHGEF11 (PDZRhoGEF) y ARHGEF12 (LARG). Precisamente ARHGEF11 resultó ser el RhoGEF más expresado en todos los tipos de células endoteliales de nuestro estudio. Hasta el momento no hay reportes de la participación de este GEF en células endoteliales tumorales.

El RhoGEF RGNEF participa en la motilidad celular e interacciona con la cinasa FAK que activa en las células las adhesiones focales, sería importante comprobar esta interacción con FAK y además que participa también activando RhoA (92).

En un tamizaje de shRNAs se identificó que ARHGEF6 participaba en la orientación perpendicular de células endoteliales. En nuestros resultados ARHGEF6 se encontró expresado en todos los tipos endoteliales, destacando en aumento en las células TEC. De acuerdo a lo anterior, podríamos decir que se encuentra más expresado en células endoteliales tumorales y esto pudiera estar correlacionada a la malignidad del carcinoma, tal y como se ha observado en otros casos en los que se identificó su expresión en tumores (93).

El COOH de la Rho GTPasa Rac1 se une directamente al dominio SH3 de ARHGEF7 (β PIX) mediante una interacción independiente de nucleótidos. De esta forma, la GTPasa Rac1 unida a ARHGEF7 es reclutada a los ruffles de membrana y a las adhesiones focales. Esta interacción controla las extensiones celulares y las adhesiones. La cinasa PAK1, que es un efector directo de Rac, regula la interacción de ARHGEF7 con Rac1 (94). ARHGEF7 también es un RhoGEF para Cdc42. Este GEF, también llamado β -PIX, se une a GIT. Un concepto que se desprende de la literatura es que el complejo PIX-

GIT sirve como un cassette para inducir cambios en la forma celular, esenciales para las respuestas de células polarizadas, en una amplia gama de contextos biológicos. Un estudio reciente indica que PIX sirve exclusivamente como GEF para Cdc42 y no para Rac1. Esto plantea la posibilidad de que PIX sirva como un proteína de andamiaje (*scaffold*) para Rac1 (95). El papel del GEF ARHGEF7 en la regulación negativa de la maduración de adhesiones focales, promoviendo las protrusiones de lamelipodios y la rotación de adhesiones focales para impulsar la migración celular ha sido documentado (96). En nuestro estudio, el ARHGEF7 estuvo altamente expresado en células TEC. Como se mencionó, se considera que ARHGEF7 sería un buen candidato como blanco terapéutico, ya que participa en muchos procesos implicados en diferentes enfermedades. Se encuentra activando a la GTPasa Cdc42, y reclutando a la membrana a Rac1 para ser activada, promoviendo la migración celular endotelial, formando complejos en las adhesiones focales y complejos que participan en cambios de morfología celular.

No existen reportes sobre TIAM2 en células endoteliales; sin embargo, en otros tipos celulares, la importancia de este GEF para la migración celular ha sido demostrada. Además de que participa en el desensamble de adhesiones focales en otros tipo celulares. En nuestro estudio TIAM 2 se encuentra sobre expresada en células TEC, podríamos predecir que está regulando el desensamble de los microtúbulos de las células endoteliales TEC de acuerdo a la literatura (97).

La sobreexpresión de la familia de PRex en líneas células endoteliales induce la actividad de Rac1, extensiones celulares, formación de lamelipodia, ruffles en la membrana, quimiotaxis e invasión en matrigel en respuesta a una serie de estímulos (98). De manera muy interesante, la sobreexpresión de los dominios PDZ aislados de PRex1 fue suficiente para favorecer la quimiotaxis dependiente de S1P en las células endoteliales de aorta porcinas (PAE), lo que implica una función independiente de la actividad de Rac-GEF y que estuvo asociada a la permanencia de los receptores en la membrana (99). El knockdown de P-Rex1 endógeno en células endoteliales microvasculares humanas (HMEC) inhibió la actividad de Rac1 estimulada por SDF1, así como

la quimiotaxis y angiogénesis in vitro estimulada por SDF1 pero no VEGF o FBS (66).

En nuestro trabajo, PREX1 disminuyó su expresión en células TEC. Algunos de los trabajos mencionados anteriormente usaron células endoteliales HMEC estimuladas con SDF-1, nosotros observamos una sobreexpresión en las células HMEC y HUVEC. Tal vez las células TEC tienen mayor expresión de receptores para VEGFR2 y por lo tanto responden mejor a VEGF-A (66). La sobreexpresión de MCF2L (Dbs) endógeno reduce la motilidad en células T47D y MDA-MB-231, que correlaciona con la baja actividad de Cdc42. Esto sugiere que Dbs activa a Cdc42 en estos dos líneas celulares de cáncer de mama humano y que la función normal de Dbs podría ser apoyar el movimiento celular (100).

Hemos probado el efecto de VEGF en la expresión de DH-RhoGEFs en las células endoteliales microvasculares humanas. En primer lugar, nos aseguramos de que la calidad del RNA-total era de buena, en segundo lugar se confirmó que la señalización de VEGF estimulara la expresión génica mediante la demostración del incremento en los niveles de HLX-1, un factor de transcripción cuya expresión se sabe está estimulada por la señalización de VEGF (78, 101). Las células HMEC fueron estimuladas con VEGF y aumentó la expresión de RasGRF2 y P-Rex2, al menos dos veces su basal. La expresión de otros RhoGEFs fue baja (FGD5, ITSN1, Vav3, ARHGEF6, ARHGEF7, Tiam1, P-REX1, P-REX2 y PLEKHG1), pero al estimular con VEGF aumentó significativamente. Esto nos proporciona un cierto grado de especificidad de la respuesta del factor de crecimiento.

Con el fin de identificar la expresión de RhoGEFs a nivel de proteína en respuesta a 3 horas de estímulo con VEGF se seleccionaron los siguientes RhoGEFs: ARHGEF1, ARHGEF2, ARHGEF7, ARHGEF12, Trio, ITSN1, Vav2 y P-REX1. No hubo cambio en la expresión de las proteínas anteriores, lo que nos hizo suponer que los tiempos de expresión, no son los mismos para sintetizar una proteína, logramos ver a la proteína pero no hubo efecto del estímulo.

De los RhoGEFs atípicos sobresale la expresión de ARHGEF40 y ALS2. En un estudio donde utilizando siRNAs para 63 RhoGEFs identificaron que ARHGEF40 induce supresión de la orientación de las células y fibras de estrés, y ALS2 participa en la orientación de células HUVEC, en el efecto de la densidad celular (102).

La familia de Docks está constituida por GEFs que tienen un dominio DHR2, dominio catalítico con cerca de 400 residuos y se encuentra dentro del carboxilo terminal. Se realizó el análisis de la estructura de los GEFs Dock 2-Rac1 y Dock 9-Cdc42 con el programa Cn3D y se identificó que una valina-1539 en Dock 2 y la valina 1987 en Dock9 participan en la interfase de la unión con la GTPasa. Al comparar estos resultados con los Dbl, los aminoácidos de interacción cambian. Esto habla de que las GTPasas están reguladas por otra vía de señalización, hasta la fecha no se conoce a detalle cómo se activan los GEFs de la familia de Dock.

Analizamos la expresión de los 11 miembros de Dock e identificamos la expresión de 9 GEFs de la familia de Dock: Dock1 y Dock7 se expresaron abundantemente. En un estudio se demostró que Dock 180 (Dock1) enlaza la señalización de CXCR4 a la activación de Rac para controlar la migración de células endoteliales durante el desarrollo cardiovascular (103).

En un estudio reciente, se describió que la señalización de Dock4 es necesaria para la protuberancia de filopodios laterales y la remodelación de túbulos antes de la formación del lumen. Estudios posteriores revelaron que DOCK4 inicia el proceso dirigiendo la formación de filopodios laterales a través de una cascada de GTPasas iniciadas por la activación de Rac, que conduce a la activación de Cdc42 cascada abajo de SGEF, un DH-RhoGEF que activa RhoG (104).

En nuestros resultados la expresión de Dock1 (Dock180) en células HMEC fue bastante elevada, y Dock4 se expresa de manera media, tal vez porque de acuerdo a los antecedentes se expresa activando a Rap1 en las uniones adherentes.

En cuanto a la expresión de ELMOs, las parejas de unión de la familia Dock, en nuestros resultados se encontró a ELMO2 muy expresado. ELMO1 es el

mejor estudiado hasta la fecha. Los estudios bioquímicos y funcionales en células de mamífero han demostrado que Dock180 requiere ELMO1 para funcionar como un eficaz activador de Rac y para respuestas biológicas dependientes de la activación de Rac (73). Estos adaptadores de la familia Dock contribuyen a ensamblar complejos funcionales que permiten la conexión con los receptores de la superficie celular y otros mediadores de señalización. ELMO2 no se ha estudiado en las células endoteliales, mientras que ELMO1 y Dock1 protegen a las células endoteliales de la apoptosis por activación de la cascada de señalización Akt/PAK/Rac in vitro e in vivo. Elmo1 y Dock1 (Dock180) facilitan la formación de vasos sanguíneos por estabilización del endotelio durante la angiogénesis (105). ELMO3 no se expresó en células endoteliales HMEC.

De acuerdo a su expresión y características estructurales, diversos RhoGEFs podrían tener una función redundante en las células endoteliales. Los posibles candidatos incluyen FARP1 y FARP2; FGD1 y FGD6; SOS1 y SOS2; ITSN1 y ITSN2; y RGS-RhoGEFs (en particular, ARHGEF11 (PDZ-RhoGEF) y ARHGEF12 (LARG)), que son pares de RhoGEFs con estructura similar y se encontró que se expresan en todas las células endoteliales.

Otros con estructura similar, tales como Vav1/2/3, Tiam1/2 y PRex1/2 se expresan diferencialmente en células endoteliales, por lo que su función posiblemente no sea redundante.

La totalidad de las investigaciones sobre las funciones de los diferentes RhoGEFs en células endoteliales se han estudiado individualmente tanto in vitro como in vivo. La angiogénesis es inducida por una gran cantidad de estímulos específicos. Por ejemplo, en respuesta a esfingosina-1-fosfato, que activa parcialmente a RhoC a través del receptor S1P2R, por el mecanismo dependiente de G12/G13 mediado por LARG activando a RhoC. Esta vía regula negativamente las respuestas angiogénicas (106).

Por otro lado la esfingosina-1-fosfato activa al receptor S1PR acoplado a Gi que activa a Rac a través del RhoGEF TIAM1, aumentando las adherencias endoteliales, controlando la permeabilidad endotelial (107). Nosotros identificamos un patrón de expresión de 60 RhoGEFs en células endoteliales

HMEC, pero no sabemos de que manera la expresión diferencial de estos RhoGEFs está regulando las diferentes funciones celulares. Existen RhoGEFs con múltiples actividades, por ejemplo se ha reportado que células endoteliales HMEC-1 estimuladas con los factores angiogénicos SDF-1/CXCL12 y VEGF son capaces de activar a Rac, para la migración celular y la angiogénesis in vitro, SDF-1 activa al receptor CXCR4 que es una vía dependiente de GPCR en donde tiene una participación crítica el RhoGEF para Rac-PREX-1 que no está implicado en la vía de VEGF (66) y VEGF activa a su receptor VEGFR2 activando a Rac en células endoteliales a través de Vav2 (55). Nuestros resultados permiten evidenciar una gran cantidad de posibilidades en la participación de los RhoGEFs en cascadas de señalización angiogénicas. Proporcionan evidencia que nos permite ubicar a los RhoGEFs regulando diferentes procesos biológicos, y contribuir en el planteamiento de posibles modelos animales con la finalidad de revelar el potencial de los RhoGEFs en el desarrollo de patologías como el cáncer. También proporcionan orientación para futuros estudios encaminados a explorar la complejidad en la integración de señales para ensamblar estructuras del citoesqueleto que conducen a la formación de nuevos vasos sanguíneos.

Conclusiones

- A lo largo del presente trabajo caracterizamos el perfil de expresión de RhoGEFs en células endoteliales humanas HMEC. Este será un recurso muy valioso que permitirá identificar proteínas reguladoras de las GTPasas de la familia de Rho en células endoteliales humanas, además de que será la base para futuros proyectos.
- El análisis de las estructuras de los RhoGEF-GTPasa (ITSN1-Cdc42, ARHGEF11-RhoA y Vav1-Rac1) nos permitió identificar los aminoácidos que participan en la interfase (–E794 y –N975), que dan especificidad y cuáles de esos aminoácidos son conservados en la mayoría de los RhoGEFs
- El análisis de las estructuras de los GEFs Dock-GTPasa (Dock2-Rac1 y Dock9-Cdc42) nos permitió identificar los aminoácidos que participan en la interfase (V-1539) que dan la especificidad y cuáles de esos aminoácidos son conservados en la mayoría GEFs para Dock.
- Determinamos la expresión de 52 RhoGEFs y 7 GEF-Dock y 2 Elmos en células endoteliales HMEC
- Determinamos la expresión de 52 RhoGEFs enlistados en la base de datos del SMART, en células endoteliales HUVEC
- Determinamos la expresión por RT-PCR de 53 RhoGEFs presentes en el SMART, en células endoteliales IMEC
- Podemos mencionar que hemos aislado células endoteliales tumorales de ratón con carcinoma de Lewis, y que determinamos la expresión de 49 RhoGEFs presentes en el SMART, en células endoteliales de tumor de carcinoma de Lewis.
- En el presente trabajo también determinamos la expresión de los RhoGEFs que son estimulados por el VEGF: FGD5, RASGRF2, ITSN1, AKAP13, Vav 3, ARHGEF6, ARHGEF7, TIAM1, PREX2, PREX1 y PLEKHG1 en células HMEC estimuladas a las 0, 1,3 y 12 horas.
- Determinamos la expresión por western blot de los RhoGEFs: ARHGEF1, ARHGEF2, ARHGEF7, ARHGEF11, ARHGEF12 , Trio, ITSN1 y PREX-1 en células endoteliales estimuladas por tres horas con factor angiogénico VEGF
- Nosostros hemos generado herramientas para continuar estudiando a algunos de los RhoGEFs como:
 - la clonación del pCEFL-EGFP-ARHGEF7 para localizarlo en los

compartimientos de las células endoteliales.

- la generación de lentivirus: pDSL_hpIG-shRNA-ARHGEF7 para silenciar la expresión de RhoGEF-ARHGEF7

- Infectamos con este lentivirus células endoteliales HMEC y HUVEC.

PERSPECTIVAS

- El presente trabajo servirá para investigaciones futuras sobre la participación de los RhoGEFs en la respuesta angiogénica.
- Extender los hallazgos a modelos animales en los que se explore si la formación de vasos sanguíneos inducidos por tumores se previene silenciando a RhoGEFs seleccionados como (ARHGEF7, PREX1, PLEKHG5, TIAM2, Tuba, FGD5, RasGRF2, FGD3) identificados que participan en procesos angiogénico.
- Identificar a algún RhoGEF que al silenciarlo evite la formación de vasos sanguíneos en respuesta a factores angiogénicos secretados por tumores

Apendice I. Protocolos adicionales y resultados preliminares.

Análisis de la expresión de RhoGEFs en células endoteliales microvasculares (HMEC) estimulando a diferentes receptores, con medios condicionados de células de cáncer o bien en situación de hipoxia.

Se eligió el tiempo de 3 horas como estímulo tomando como referencia el ensayo con VEGF. Estimulamos diferentes tipos de receptores con FGFb, TGF- β , SDF-1 y con medios condicionados obtenidos de diferentes tipos de cáncer: de próstata (células PC-3), de colon (células HT-29) y de mama (células MDA-MB-231). En situación de Hipoxia también por 3 horas, como control células HMEC en ayuno y estimuladas con medio completo.

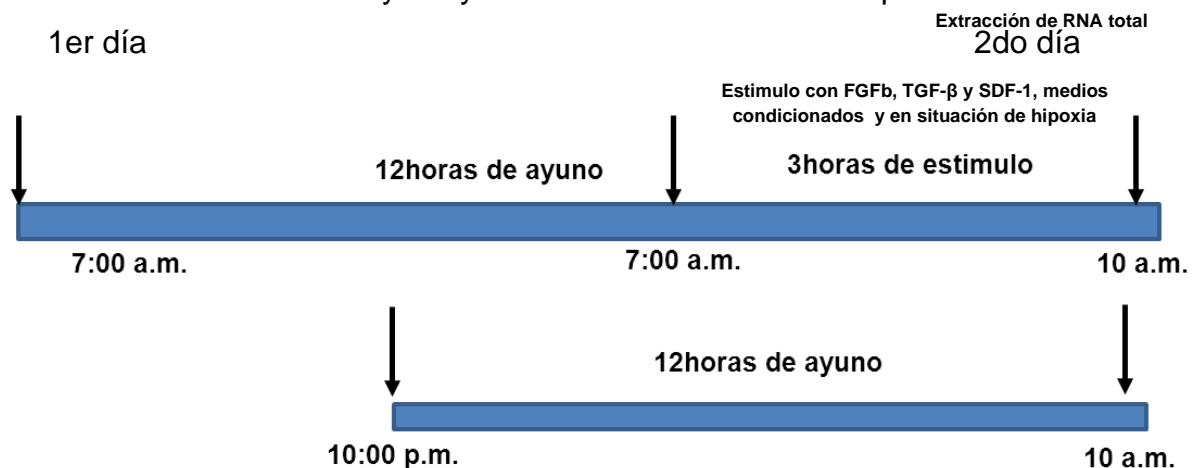


Fig. 36 Esquema de curso temporal para la obtención RNA de células endoteliales HMEC estimuladas con medios condicionados de células de cáncer (próstata, colon y mama), estimulando a diferentes receptores, y en situación de hipoxia

Obtención de medio condicionado de células de cáncer de mama (MDA-MB-231), de colon (HT29) y de próstata (PC-3).

1. Para este experimento se utilizaron placas de 10cm. El cultivo celular de cáncer estuvo entre el 80% y 90% de confluencia.
2. Se realizaron 10 lavados 5ml de PBS1x estéril con cuidado de no despegar las células.
3. Se agregaron 10 ml de medio del correspondiente a cada línea celular sin suero y sin antibiótico, y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ hasta las 48horas. En este paso es importante que el medio mantenga su pH.
4. Se recolectó en un tubo falcón estéril de 15ml.
5. Se centrifugó durante 15min a 3500rpm. Para quitar los restos celulares, se pasó a otro tubo y se utilizó para estimular a las células endoteliales HMEC.
6. Si se congela a -20C se adicionan inhibidores de proteasas y fosfatasas (orto vanadato, PMSF, leupeptina, aprotinina, β -glicerol-fosfato y fluoruro de sodio (NaF).

Resultados preliminares.

Expresión de RhoGEFs en células endoteliales HMEC estimulando a diferentes receptores, en situación de Hipoxia y con medios

condicionados de cáncer

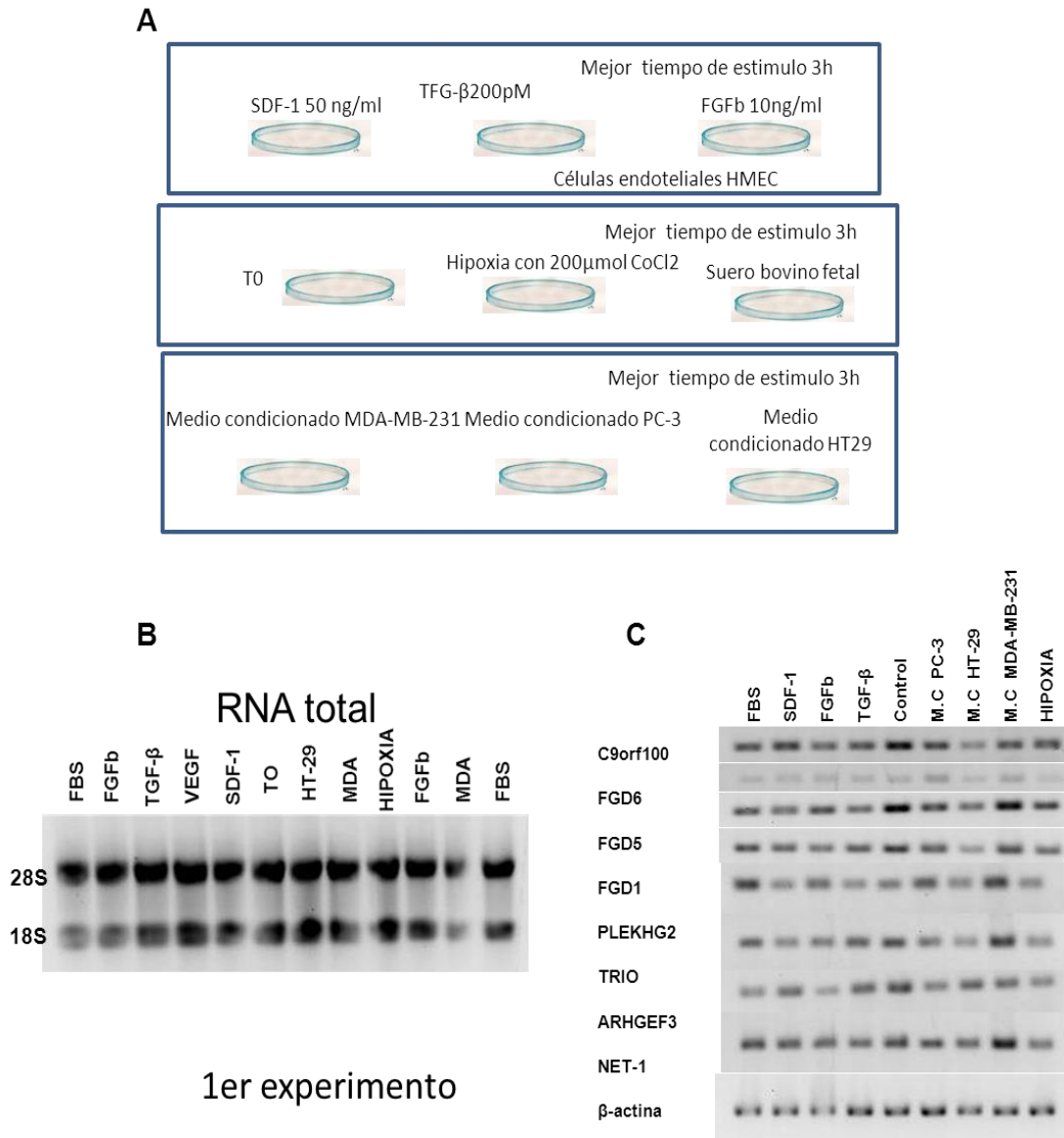
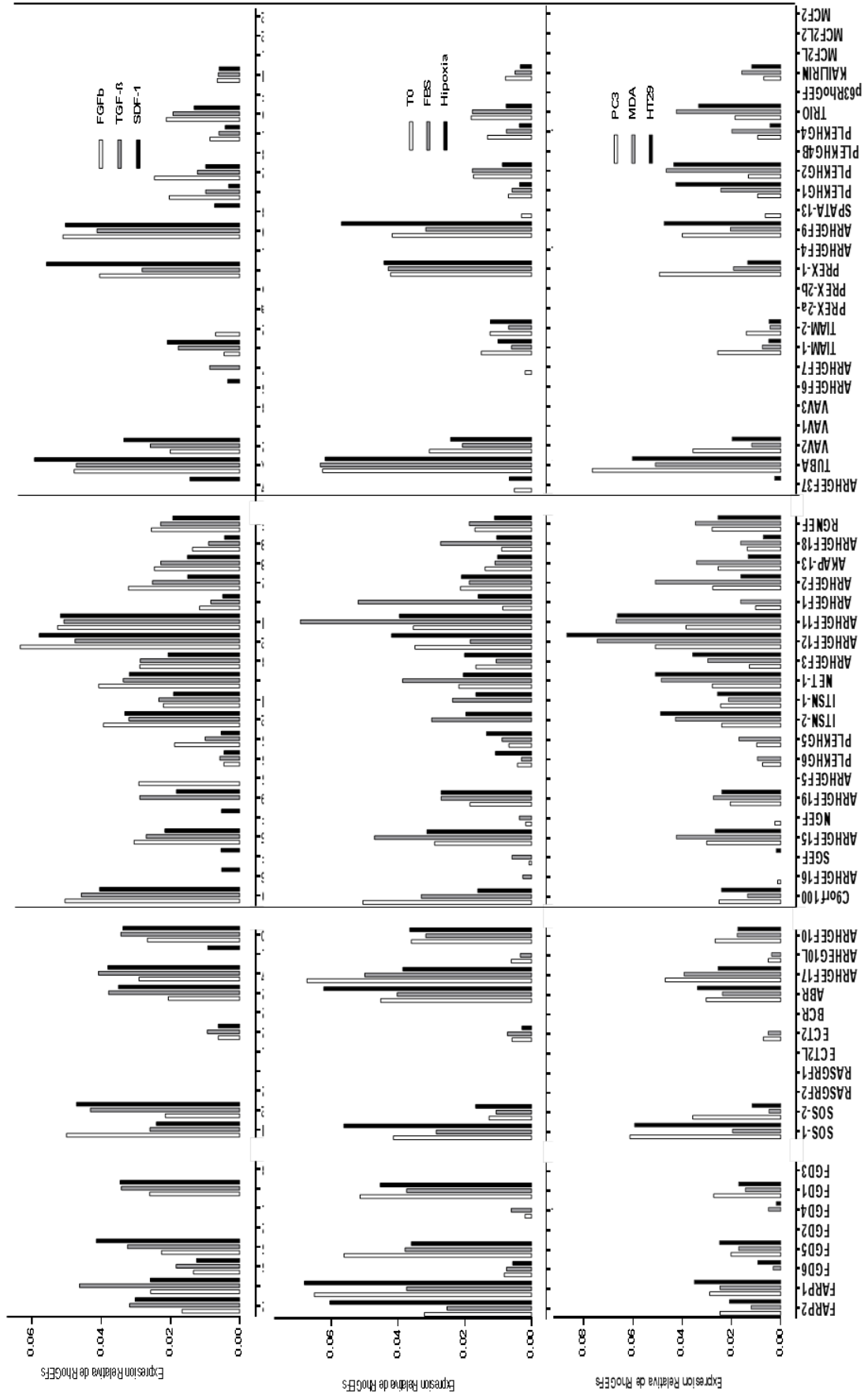


Fig 37 expresión de RhoGEFs en células endoteliales con diferentes estímulos

- A) Protocolo experimental: estímulos a receptores FGf, TGF β y SDF-1. Estímulos en situación de hipoxia, en ayuno y con suero. Estímulos con medios condicionados de cáncer de Mama (MDA-MB-321), próstata (PC-3) y de colon (HT-29). B) calidad del RNA obtenido de todo el experimento C) Algunos ejemplos de la expresión de los RhoGEFs en estos estímulos.



Expresión de RhoGEFs en células endoteliales HMEC estimulando a diferentes receptores, en ayuno, con suero, en situación de hipoxia, M.C. de próstata (PC-3), M.C. de colon (HT-29) y M.C. de mama (MDA-MB-231)

De este protocolo solo tenemos una réplica por lo cual estos resultados no serían significativos, tendríamos que aumentar el número de N, y analizar los resultados. Pero en general al comparar la expresión de los diferentes estímulos podríamos mencionar por ejemplo que hay una disminución de la expresión de los RhoGEFs del Grupo 1A estimulados con medios condicionados comparándolo con los grupos 1A estimulados con diferentes receptores y en situación de hipoxia, ayuno y con suero. Del grupo 1B se nota la gran expresión de SOS2 estimulado con TGF β y SDF-1 comparándolo con SOS2 estimulado con medios condicionados, en ayuno, con suero y en hipoxia. Del grupo 2A sobresale el RhoGEF C9orf100 donde se expresa muy alto estimulando con diferentes receptores, expresión media en ayuno, con suero y en hipoxia. Y expresión muy baja en medios condicionados. Del grupo 2B sobresale el RhoGEF PLEKHG2 donde se expresa muy alto cuando se estimula con medios condicionados y disminuye en ayuno, con suero, con hipoxia y estimulando a diferentes receptores. Mencionamos algunos ejemplos que sobresalen de este experimento pero no podemos concluir por el número de repeticiones. Cabe mencionar que se tuvieron que normalizar todos los cDNAs, de las células endoteliales con todos los estímulos con β -actina como gen para normalizar, se cuidó la extracción del RNA, que tuviera buena calidad y que no estuviera contaminado con DNA, por lo cual todas las muestras de RNA fueron tratadas con DNase1 (roche).

Protocolo de aislamiento de células endoteliales tumorales y otros tejidos de humano

Obtención del tumor fragmento de 1.5cm por cirugía en quirófano

- Recibir el tumor en 10ml de medio DMEM sin suero y sin antibiótico,
- Disgregar el tumor en una placa de cultivo con una navaja de Bisturí hasta quedar una pasta después pasarla a un tubo falcón de 50ml, con 10ml de medio con colagenasa tipo I al .05% con una temperatura de 37°C y con un agitador magnético, incubar 10 minutos en agitación, tomar una muestra y verificar que se encuentra disgregado el tejido, que no hay cúmulos de células de lo contrario extender el tiempo de incubación.
- Después centrifugar 5min a 1200rpm, quitar la colagenasa y agregar 10ml de medio completo al 0.2% de suero para inactivar la colagenasa resuspender la pastilla y volver a centrifugar por 3 min a 1200 rpm.
- Quitar ese medio y agregar 10ml de medio sin suero y sin antibiótico y volver a resuspender la pastilla de células, observar al microscopio las células, se deben observar disgregadas sin formar cúmulos, si el tejido todavía no está perfectamente disgregado incubar otra vez con colagenasa, y repetir la inactivación de la colagenasa. Aunque hay un tejido que no se disgrega. También se recomiendan pasar la suspensión por una malla de 30µm, para evitar cúmulos de células y otros tejidos que no se disgregan.
- En este punto es importante separar por FiCOLL para evitar contaminación celular, pero nosotros lo que hicimos fue sembrar las células en cajas de cultivo por 3 horas hasta que se pegaran, después de ahí hicimos la separación y aislamiento de células endoteliales

1.- Determinar el volumen celular

2.-Centrifugar la suspensión de células 1000rpm por 10 min. Aspirar el sobrenadante

3.- Resuspender en 100µl de buffer en cual debe estar a 4°C

4.-Adicionar 10µl de anticuerpo CD31

5.-Mezclar bien e incubar por 10 min. En oscuridad en el refrigerador (2-8°C)

6.- Lavar las células adicionando 1-2ml de buffer y centrifugar a 1000rpm por 10min.

7.-Decantar y resuspender el pellet en 40µl buffer para 10^7 .

8.-Adicionar 10µl cocktail biotin-anticuerpo, mezclar muy bien e incubar 10 minutos a 4-8°C.

9.-Adicionar 30µl de buffer

10.-Adicionar 20µl de anti-biotin microbeads, mezclar bien e incubar 15 min. A 4-8°C

11.-Lavar las células adicionando 1-2ml s de buffer y centrifugar 1000rpm por 10 min.

Con pipeta quitar completamente el sobrenadante y resuspender en 500µl de buffer.

SEPARACION POR MICROBEADS

12.-Preparar la columna pasando 500µl de buffer

13.-Fijar el magneto y poner la columna, pasar 500µl de suspensión de células, recuperar en un tubo las células que no fueron marcadas

14.-Lavar la columna con 500µl de buffer por lo menos tres veces, quitar el magneto de la columna y eluir las células marcadas de las perlas con 500µl de buffer apoyándose con el embolo de la columna, recuperar en un tubo nuevo.

15.- Centrifugamos y quitamos el buffer, empezamos el protocolo de extracción de RNAtotal por el método de Trizol.

Tumor de cáncer de mama

Por ultimo decidimos ver la expresión de RhoGEFs en células endoteliales humanas aisladas de tumores de cáncer de mama humano. Obtuvimos una donación de un tumor de cáncer de mama en etapa 4, del hospital de oncología de siglo XXI, lo procesamos, para aislar las células endoteliales y valorar la expresión de los RhoGEFs. Los resultados obtenidos muestran que fallamos en el aislamiento de células endoteliales tumorales humanas, pero realizamos un perfil de los RhoGEFs que se expresan en el tumor completo Fig(). Aunque el aislamiento fallo se puede observar que se expresa el RhoGEF ARHGEF11, es solo un experimento, pero nos da cierta información, para mejorar el procesamiento de la muestra.

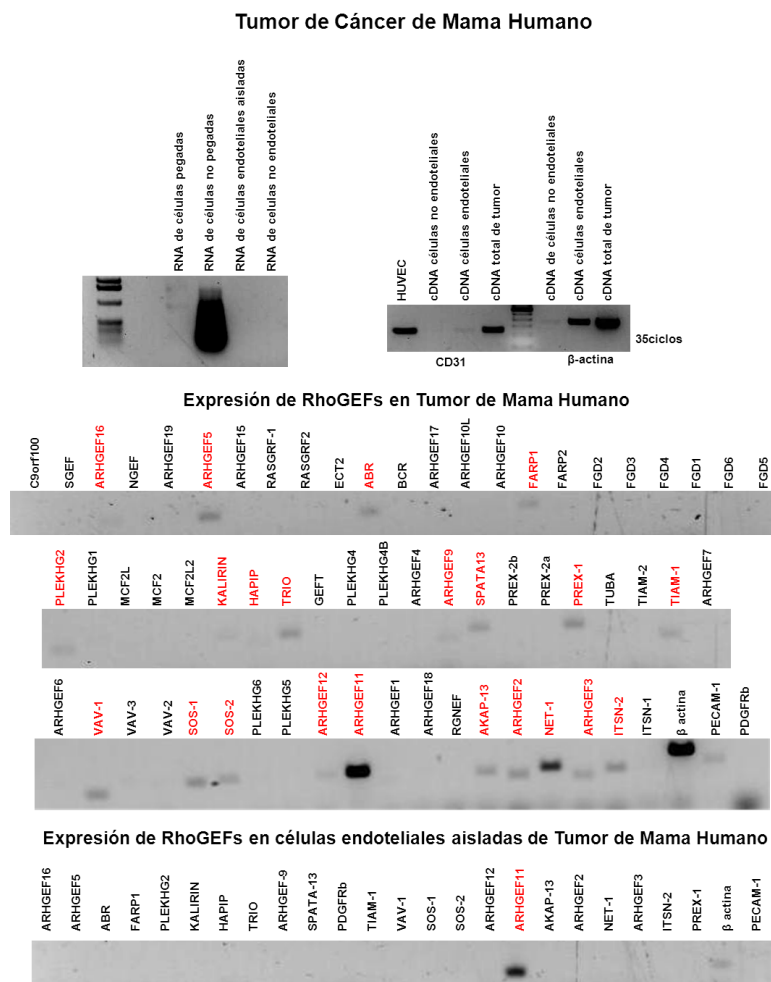


Fig 38 Perfil de RhoGEFs de tumor de cancer de mama.

Transfección de células HeLa con pCEFL-EGFP, myc-βPIX y pCEFL-EGFP-β-PIX

Previo a la transfección con polyfect

1. A partir de un cultivo confluyente, un día antes de la transfección, se dividen los cultivos de células HeLa. Para ello se lavó con 4 ml de PBS 1X estéril.
2. Se agregó 1 ml de tripsina para despegar las células y se incubó durante 5 minutos a 37°C y 5% de CO₂.
3. Se agregaron 4 ml de medio DMEM suplementado al 10% con SBF, se resuspendió hasta homogeneizar.
4. Se sembraron 200 µl de la suspensión celular en cajas de 6 pozos con 1.8 ml de medio DMEM suplementado al 10% de SBF.
5. Se incubaron a 37°C y al 5% de CO₂ durante 24 h.

Transfección con polyfect

1. Se preparó polyfect en un tubo de prolipropileno. Por cada pozo se considerón 100 µl de DMEM sin suero y 10 µl de polyfect.
2. Se agregó 1.5 µg del DNA a transfectar en cada tubo, se agitó y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos.
3. Se prepararon las células. Se lavó cada pozo con PBS 1X estéril y se agregaron 1.5 ml de DMEM al 10% de SBF.
4. Después de los 10 minutos se añadieron 600 µl de DMEM al 10% de SBF a cada tubo, se mezcló y decantó cada tubo en el pozo correspondiente.
5. Se incubó a 37°C a 5% de CO₂ y se procesó al tercer día.

Clonación de RhoGEFs con una etiqueta para evaluar su localización celular

Considerando la información obtenida de este proyecto y de la literatura decidimos ir generando herramientas para seguir caracterizando a los RhoGEFs en células endoteliales. Decidimos utilizar al RhoGEF ARHGEF7

que su expresión es inducida cuando se estimula con VEGF. Para lo cual clonamos en un vector pCEFL-EGFP al RhoGEF ARHGEF7/ β -PIX/Cool-1, al etiquetar con la proteína EGFP, esperamos ver su localización en los compartimientos celulares. Para evaluar la clonación transfectamos el pCEFL-EGFP-ARHEGEF7 en células HeLa y comprobamos su expresión al ver células HeLa, verdes, y comprobamos su expresión de ARHGEF7 a nivel de proteína por western. Fig (). Esperamos utilizar esta herramienta con los RhoGEFs que resulten importantes en la modulación del citoesqueleto, por lo tanto en cambio de forma de la celular en respuesta a un estímulo.

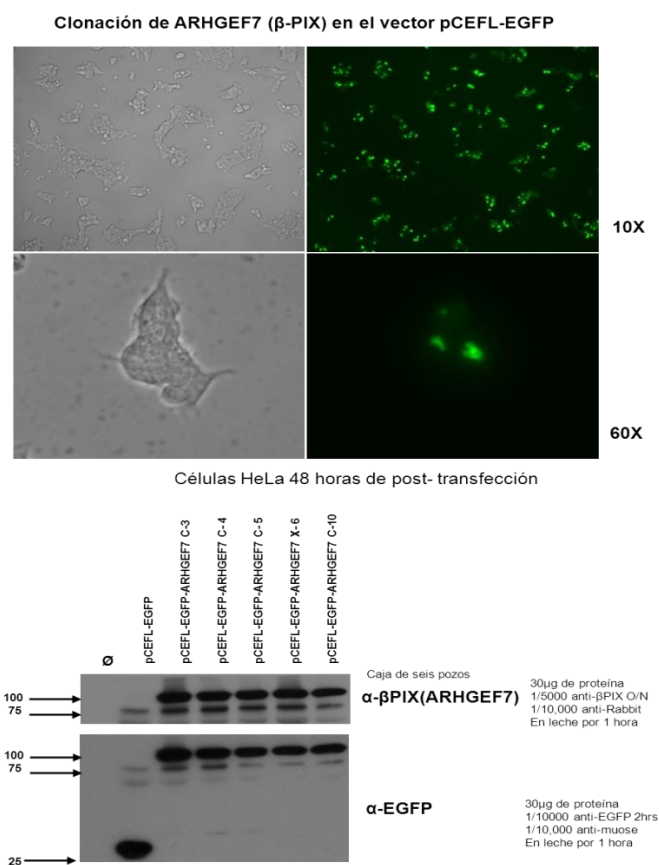


Fig 39 Clonación y expresión del RhoGEF ARHGEF7

Construcción del shRNA 3A GENERACIÓN: SISTEMA CONSTITUTIVO

1.-Una vez probado que funciona la secuencia del shRNA(X) clonado en los vectores pENTR o pEN_EmiRc3.

2.-Por el sistema GATEway, pasamos el cassette que contiene el shRNA (junto con el promotor) a un vector pDSL (pDSL_hpIP, para que se pueda seleccionar con Puromicina) o bien (pDSL_hpIG, para monitorear la expresión de la EGFP). El pDSL-shRNA se puede usar para transfectar o bien para preparar lentivirus.

3.-Se realiza una reacción Gateway:

-El volumen de la reacción es de 5 µl de la siguiente forma.

-Tris 10 mM (tomar del buffer de elución de minis de qiagen) (cbp... 5µl)
(2.5µl).

-vector destino (cualquiera de los pDSL mencionados antes): 200 ng (1µl).

-vector de entrada (cualquiera de los pENTR o pEN_EmirRc3 mencionados antes): 50-100 ng (1µl).

-clonasa LR II (se debe encontrar almacenada en el revco sacar en un cooler)
(0.5µl).

-Incubar a 22° C toda la noche.

4.-Al día siguiente transformar 2 µl de la reacción en 50 µl de bacterias DH5α ultracompetentes que se usan para ligaciones. Procesar como si fuera una ligación. Selección en bacterias por ampicilina.

5.-Si la reacción de gateway es efectiva, se puede verificar digiriendo con la enzima XhoI, y corriendo un poco del producto en un gel de agarosa al 1.5%, debiendo liberar un fragmento de 389.

Transformación de bacterias *E.coli* DH5 α

Bacterias ccdB-R para plasmido pDSL_hplG y pDSL_hpIP vectores pDEST-sistema Gateway

Bacterias Dh5 α para plasmido pMDI/pRRE, pRSV/REV, pVSV/G y pCEFL-EGFP ampicilina

Ligación

1. Se descongelaron en hielo bacterias *E.coli* DH5 α competentes almacenadas en nitrógeno líquido (las bacterias tardan aproximadamente 10 minutos en descongelarse).
2. A 100 μ l de bacterias se agregó 1 μ l del producto de ligación.
3. Se incubó en hielo por un periodo de 20 a 30 minutos
4. Después se realizó un choque térmico de 45 segundos a 42°C (en el baño maría).
5. Inmediatamente después se incubó en hielo durante 10 minutos.
6. Se agregaron 300 μ l de medio S.O.C, o 500 μ l de TB o LB.
7. Se Incubó durante 1 hora a 37°C con agitación (150 rpm).
8. Se centrifugó a 6,000 rpm por 30 segundos.
9. Se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el botón en medio LB líquido conteniendo el antibiótico correspondiente y se plaqueó en medio LB sólido con el antibiótico correspondiente.

Plásmido superenrollado

1. Las bacterias competentes se descongelaron sumergidas en hielo (las bacterias tardan aproximadamente 10 minutos en descongelarse).
2. A 100 μ l de bacterias se agregó 1 μ l de plásmido súperenrollado.
3. Se incubó en hielo por un periodo de 20 a 30 minutos
4. Se realizó un choque térmico a 42°C durante 45 segundos (en el baño mrc).
5. Inmediatamente después se incubó en hielo durante 10 minutos.
6. Se agregó 300 μ l de medio S.O.C, o 500 μ l de TB o LB.
7. Se incubó con agitación (150 rpm) durante 1 hora a 37°C.
8. Se plaqueó entre 20 y 50 μ l en medio con el antibiótico correspondiente.

Obtención de plásmidos pDSL_hplG y pDSL_hplP a partir de un cultivo de *E. coli* crecidos en un volumen de 5 ml de medio LB.

Preparación de miniprep (GenElute™ Plasmid Miniprep Kit PLN350, catálogo No.096K6838)

1. El cultivo de bacterias se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
2. Se eliminó el sobrenadante por decantación.
3. Se agregó 200 µl de buffer de resuspensión. Para resuspender las bacterias mezclar con el vortex y transferir a un tubo eppendorf.
4. Para lisar las bacterias se adicionó 200 µl de buffer de lisis, se mezcló suavemente, por inversión y se incubó a temperatura ambiente menos de 5 minutos.
5. Para precipitar DNA genómico y proteínas, se adicionó 350 µl de buffer de neutralización y se agitó bruscamente invirtiendo el eppendorf.
6. Se centrifugó a velocidad máxima (13,000 rpm) durante 10 minutos.
7. Para aislar el plásmido se decantó el sobrenadante en la columna (previamente equilibrada con buffer de preparación de columnas)
8. Se centrifugó la columna a velocidad máxima un 1 minuto.
9. Se eliminó el filtrado colectado en la columna.
10. Después se adicionaron 500µl de buffer de lavado para lavar la columna.
11. Se centrifugó a velocidad máxima un 1 minuto.
12. Se eliminó el filtrado colectado en la columna.
13. Se centrifugó nuevamente a velocidad máxima 1 minuto.
14. Se transfirió la columna a un eppendorf limpio de 1.5 ml y se eluyó el DNA con 30 µl de agua para biología molecular.
15. Se incubó 5 minutos y se centrifugó a velocidad máxima 1 minuto.
16. Se almacenó a -20°C hasta su uso.

Determinar la concentración de DNA

1. La concentración del plásmido se determinó en base a su absorción (260-280 nm) usando el espectrofotómetro Beckman.
2. Para la lectura se preparó 100 μ l de una dilución 1:50, se espera una concentración de 200-500 ng/ μ l (concentración correspondiente al plásmido sin diluir).
3. Se ajustó con agua grado biología molecular la concentración del plásmido en caso de ser necesario.
4. Se etiquetó y mantuvo a una temperatura de -20°C hasta su uso.

Protocolo para generación de lentivirus con el vector pDSL_hplG y pDSL_hpIP, en células HEK293ft transfectadas con lipofectamina 2000®.

Día 1

1. A partir de un cultivo al 90% de confluencia de células HEK 293ft, un día antes de la transfección se dividen, se retira el medio completo y se lavan con 4 ml de PBS 1X estéril.
2. Se agregó 1ml de tripsina para despegar las células y se incubó durante 5 minutos a 37°C y 5% de CO₂.
3. Se agregaron 9ml de medio DMEM suplementado al 10% de FBS (medio completo) sin antibiótico, se resuspendió hasta homogenizar el cultivo.
4. Se sembraron 1.2 ml de la suspensión celular en cajas de 10cms con 8.8 ml de medio completo, Se incubaron a 37°C y al 5% de CO₂ durante 24h.
5. Este día dividimos las células blanco (las que se van a infectar con los lentivirus) en una proporción de 500,000 células (endoteliales HMEC y HUVEC) en cajas de 60mm. Las células deben estar confluentes a las 48 horas después de la infección.

Día 2

1. Transfección de células HEK293ft utilizando lipofectamina 2000®. Se recomienda realizar la transfección después de las 6 de la tarde.
2. Se cambió el medio dos horas antes de la transfección, se agregó 9.5 ml de medio completo sin antibiótico.
3. Después de las dos horas se dejó a temperatura ambiente la lipofectamina 2000 durante 5 minutos. La lipofectamina se encuentra almacenada a 4°C.
4. Se preparó la lipofectamina 2000 en un tubo (1) de polipropileno con 250µl de medio que se utiliza para transfectar (DMEM sin suero y sin antibiótico) y 10µl de lipofectamina 2000. La lipofectamina fue adicionada al medio e incubada 5 minutos a temperatura ambiente.
5. En otro tubo(2) se adiciono 250µl de medio para transfectar y las siguientes cantidades de plásmidos:
6. 1.95µg del vector pDSL_hplG shβPIX
1.3µg del vector de empaque pMMDD-pRRE

0.65µg del vector pVSV-G

1.015µg pRSV-REV

7. Se homogenizó la mezcla de plásmidos con la micropipeta y se mezclaron los dos tubos (1 y 2) llegando a un volumen de 500µl.
8. Se incubó 20 minutos a temperatura ambiente.
9. Una vez transcurrida la incubación. Se adicionó la mezcla gota a gota a las células HEK293ft y se incubaron a 37°C y 5 % CO₂ durante toda la noche.

Día 3

1. Después de 18h de haber transfectado las células HEK293ft. Cambiamos el medio con 5ml de medio completo sin antibiótico y seguimos incubando a 37°C y al 5% CO₂ durante 24horas.
Nota: (1) No olvides usar guantes, bata y trabajar en el cuarto destinado a virus. (2) Se puede observar al microscopio de fluorescencia las células transfectadas HEK293ft con el vector pDSL_hplG-X para verificar la calidad de la transfección.

Día 4

Revisar las células trasfectadas y blanco, deben encontrarse extendidas, adheridas en buenas condiciones.

Primer día de infección (corresponde a las 48 horas después de la transfección de las células HEK293ft

1. Dejar a temperatura ambiente durante 5 a 10 minutos el stock de sulfato de protamina (6mg/ml) que se encuentra a 4°C.
2. Colectar el sobrenadante de las células HEK293ft en un tubo falcón estéril de 15ml.
3. Colocar 8ml de medio completo sin antibiótico a las células HEK293ft e incubarlas a 37°C y al 5% de CO₂ durante 24 horas.

4. El sobrenadante colectado es la primera cosecha de lentivirus, lo filtramos en un filtro swinnex de 0.45µm, no usar de 22µm. El sobrenadante debe tener un PH óptimo (color tomate-naranja) si no es así y está amarillo esto es indicación de que se pasó de tiempo, agregar medio de las células blanco hasta obtener el color tomate-naranja.
5. Adicionar 1µl de sulfato de protamina (6mg/ml) por cada ml de sobrenadante filtrado.
6. Retiramos el medio a las células blanco (endoteliales) y agregamos el sobrenadante filtrado suplementado con sulfato de protamina (cosecha1) e incubamos a 37°C y al 5% CO₂ durante 16 horas
7. Transcurrido en tiempo retiramos en sobrenadante, lavamos con PBS 1X y cambiamos por medio completo sin antibiótico correspondiente a las células blanco (endoteliales) e incubamos a 37°C y al 5% CO₂.

Nota: (1) No olvidar usar guantes, bata y trabajar en el cuarto destinado a virus. (2) Todos los utensilios desechables serán depositados en la bolsa roja de desechos peligrosos infecciosos, después de haber pasado por cloro, el material de vidrio se dejará en el recipiente de cloro dentro de la campana. Todo el material empleado deberá haber sido tratado con cloro antes de sacarlo de la campana de bioseguridad.

Día 5

Antes de comenzar revisamos que las células se encuentren adheridas y extendidas (en buenas condiciones). En este día tienen las células HEK293ft tienen 72 horas de transfección.

1. Se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos el stock de sulfato de protamina
2. Se colectó el sobrenadante de las células HEK293ft transfectadas, se filtró en un swinnex de 0.45µm. Es la segunda cosecha de lentivirus, recordar que el sobrenadante debe tener el pH óptimo, si está amarillo

adicionar medio completo de las células blanco hasta recuperar el color tomate-naranja.

3. Agregamos cloro a las cajas generadoras del lentivirus (HEK293ft transfectadas) dejamos pasar 5 minutos y aspiramos con el vacío todo el residuo de la caja, y desechemos las cajas en la bolsa roja de desechos biológicos.
4. A los sobrenadantes recolectados y filtrados agregamos 1µl de sulfato de protamina por cada ml de sobrenadante.
5. Retiramos el medio de las células blanco y adicionamos el sobrenadante con los lentivirus de la segunda cosecha e incubamos a 37°C y al 5% CO₂ durante 16 horas.
6. Después del tiempo de infección retiramos el sobrenadante y agregamos medio completo de las células blanco (endoteliales). Incubamos a 37°C y al 5%CO₂.

Nota: (1) No olvidar usar guantes, bata y trabajar en el cuarto destinado a virus. (2) Todos los utensilios desechables serán depositados en la bolsa roja de desechos peligrosos infecciosos después de haber pasado por cloro, material de vidrio se dejara en el recipiente de cloro dentro de la campana.

Día 6

Se dejaron incubando un día más las células blanco.

Día 7

Para células infectadas con plásmido pDSL_hpIG-X

1. Se observaron al microscopio de fluorescencia si había células verdes
2. Si había células verdes, tripsinizamos las células endoteliales infectadas con lentivirus preparados con el pDSL_hpIG y resuspendimos en PBS1x estéril con 0.5M de EDTA
3. Separamos las células endoteliales verdes por FACS ("*Fluorescence-Activated Cell Sorter*"), aislamos 1millon de células endoteliales fluorescentes.
4. Sembramos las células en placas de 10cm y expandimos el cultivo.
5. Una vez llenas las cajas congelamos los cultivos.

Para células con plásmido pDSL_hpIP-X

1. Se agrega puromicina, para lo cual primero se hace una curva con diferentes concentraciones de puromicina, sólo sobrevivirán las células blanco que estén infectadas.

Aislamiento de células endoteliales HMEC infectadas con pDSL_hpIG y pDSL_hpIG-shRNA-ARHGEF7 por FACS (*fluorescence-activated cells sorting*)

1. Las células HMEC infectadas con pDSL_hpIG A, en una caja de 10cm, se despegaron con 1 ml de tripsina después de 48 horas de haber sido infectadas,.
2. Se agregaron 5ml de medio completo para inactivar la tripsina y se recuperan en un tubo falcón de 15ml, se centrifugaron a 1500 r.p.m por 2 minutos.
3. Se decantó el sobrenadante con mucho cuidado.
4. Se lavaron las células con 5ml de medio sin suero y sin antibiótico, se disgregó la pastilla de células y se volvió a centrifugar a 1500 r.p.m. por 2 minutos.
5. Se decantó el sobrenadante y se agregó PBS con EGTA al 5mM, para evitar que formen cúmulos las células.
6. Se procedió a pasar las células por el FACS.

Infección con Lentivirus

Otra herramienta que pensamos utilizar es la infección por lentivirus de células endoteliales. La transfección de células endoteliales por liposomas es muy baja por lo que estamos interesados en infectar células endoteliales con shRNAs para silenciar a los RhoGEFs que sean seleccionados de anteriores proyectos del laboratorio. Hemos realizados algunos ensayos de infección con lentivirus que generamos, el cual tiene el nombre de pDSL_hoIG-shRNA- ARHGEF7. Los resultados de esta infección lo podemos ver en la Figura (), donde infectamos células endoteliales HMEC y cultivos primarios de células HUVEC. Necesitamos ver la expresión o el silenciamiento de esta proteína a nivel por

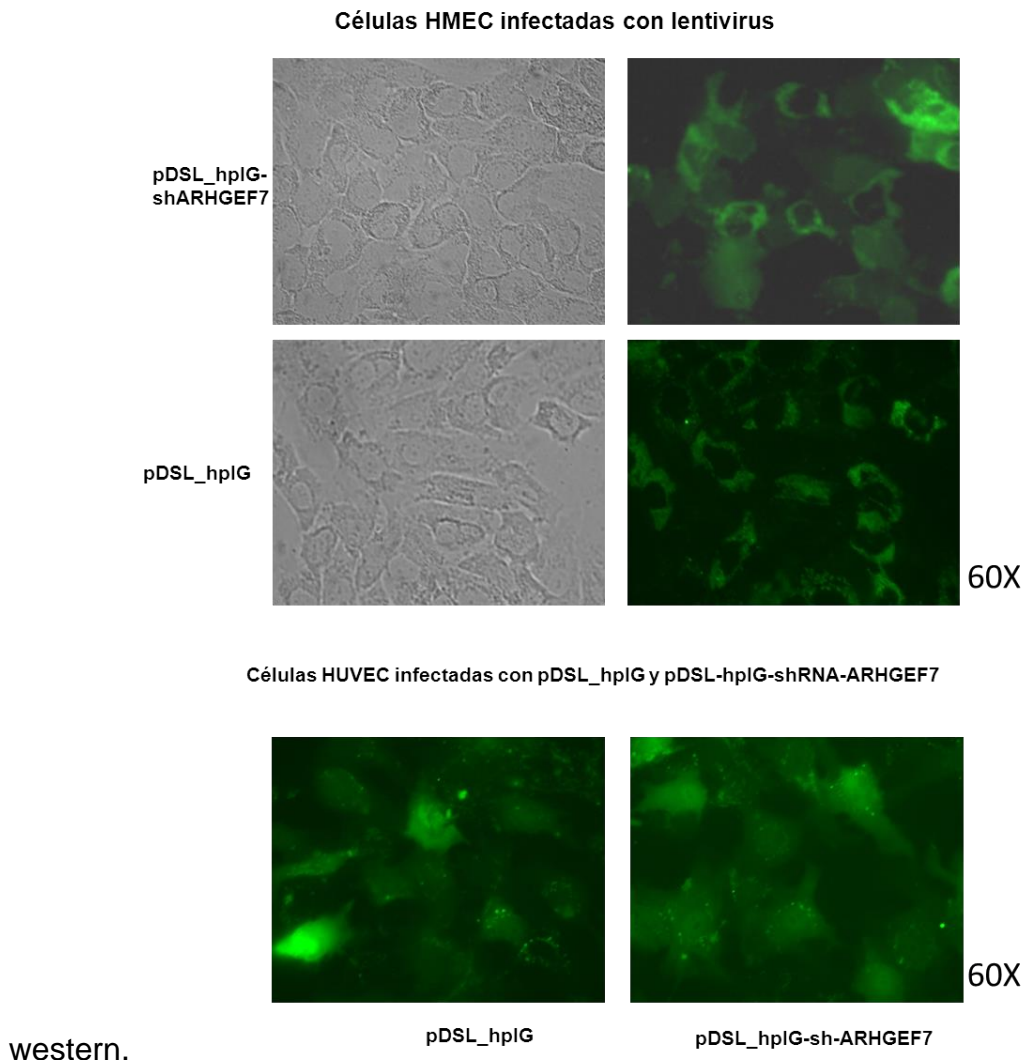


Fig 40 Expresión de pDSL-hpIG-shRNA β -PIX en células HMEC y HUVEC

Tabla 2 de primer para losRhoGEFs que se encuentran en el SMART

Humano	pb	Pares de primers para RT-PCR	Ratón	pb	Pares de primers para RT-PCR
FARP2	228	>FARP2-RT-FW-2782-CDS gtcgagaaccagcttcagg >FARP2-RT-REV-3010-CDS agacgtgggatttgaactgg	mFARP2	188	>mFARP2-RT-PCR-FW-1361-CDS CAATTTGAAGGACAGCAGCA >mFARP2-RT-PCR-REV-1549-CDS GAGGGAGAAGGCTGAGGACT
FARP-1	223	>FARP1-RT-FW-1484CDS acgtgacctgtctccaac >FARP1-RT-REV-1707CDS tgtgctctgaaaccacgaag	mFARP1	158	>mFARP1-RT-PCR-FW-448-CDS TTGGAACGAGGACAGAAACC >mFARP1-RT-PCR-REV- 606-CDS CTCCACAAGGTTGAGGTGGT
FGD6	219	>FGD6-RT-FW-291CDS tgaaggcaatcagagcaatg >FGD6-RT-REV-510CDS accctggttcttgcttttt	mFGD6	207	>mFGD6-RT-PCR-FW-3954-CDS CCAAGCTTGCTCATCAAACA >mFGD6-RT-PCR-REV-4161-CDS GGGGATTTTCTTCTGCTTCC
FGD5	173	>FDG5-RT-PCR-FW-2432CDS tggacatgagcagcttcaac >FDG5-RT-PCR-REV-2634CDS Tgaagcactgtcctcctcct	mFGD5	170	>mFGD5-RT-PCR-FW-2292-CDS GTGGACATGAGCAGCTTCAA >mFGD5-RT-PCR-REV-2462-CDS TGAAGCACTGTCTCCTCCT
FGD2	210	>FGD2-RT-FW-1307CDS gagacatccaggagcaggag >FGD2-RT-REV-1517CDS ggcctgttgcctcgtattt	mFGD2	207	>mFGD2-RT-PCR-FW- 998-CDS CCAGAGAGCACTGGACATGA >mFGD2-RT-PCR-REV-1205-CDS AACCAGGTAGCGTCCATTG
FGD4	172	>FGD4-RT-FW-2068CDS ccactctgggctatgtggt >FGD4-RT-REV-2239CDS gaccacctggtgtctcacct	mFGD4	174	>mFGD4-RT-PCR-FW-379-CDS GAGTCTAATCCGGCCCTAC >mFGD4-RT-PCR-REV--553-CDS AGGAGGTTAACCCAGGCTGT
FGD-1	168	>FGD1-RT-FW-2540CDS aaaatgaaccttgggtgctg >FGD1-RT-REV-2707CDS ggctgaagtaccagctgagg	mFGD1	172	>mFGD1-RT-PCR-FW-1108-CDS TGTGATTGTTGCTCGGATA >mFGD1-RT-PCR—REV-1280-CDS TAGGCACCTTCTACCATCC
FGD3	197	>FGD3-RT-FW-1022CDS ccattcggaagtggagaaa >FGD3-RT-REV-1218CDS cagcttgggcacacagtaaa	mFGD3	218	>mFGD3-RT-PCR-FW-433CDS ATCCCCAACAGAGACAGTGG >mFGD3-RT-PCR- REV-651-CDS AGGCCTAACAGGGTGACCT
SOS-1	208	>SOS1-RT-FW-3331CDS agccctttcactcaagcaa >SOS1-RT-REV-3538CDS Ggggactgtcctaagtctta	mSOS1	158	>mSOS1-RT-PCR-FW- 2235-CDS CTGCCAGTGCTGAAGTGTA >mSOS1-RT-PCR-REV 2393-CDS TGGATCTGCGTACATGTGGT
SOS-2	221	>SOS2-RT-FW-3775CDS ccaagcactcctcctagcac >SOS2-RT-REV-3995CDS tggggagtcttgcattttc	mSOS2	174	>mSOS2-RT-PCR-FW-3431-CDS TCAATGGCGTGTGGAGATA >mSOS2-RT-PCR-REV-3605-CDS CAAGGCGGATTGATTGACTT
RASGRF2	195	>RASGRF2-RT-FW-1548CDS caagacaggtggggttctgt >RASGR2-RT-REV-1742CDS ctcatcaggcagctttctc	mRASGRF2	154	>mRASGRF2-RT-PCR-FW-600-CDS GGAGGAGGATCCAGACATCA >mRASGRF2-RT-PCR-REV-754-CDS CCATCGTGAACACAATCTGG
RASGRF1	216	>RasGRF1-RT-FW-1698CDS ctcgtccagacaggagaagg >RaSGRF1-RT-REV-1913CDS ttgctgaagcgaatgtcaac	mRASGRF1	184	>mRASGRF1-RT-PCR-FW- 787-CDS TGATCGTATCCAATCCAGCA >mRASGRF1-RT-PCR-REV- 971-CDS ACACCACCTGGTTCCTCTTG
ECT2L	205	>ECT2L-RT-PCR-FW-496-CDS< acgctgaatgaaccacaaaac >ECT2L-RT-PCR-Rev-700-CDS< ctcgctccctacagctctgg	mECT2 L	190	>mECT2L-RT-PCR-FW-2374-cds Ctgattcggaccacaaagatgt >mECT2L-RT-PCR-REV-2564-cds Gatgctgggtgaactggttaggt
ECT2	160	>ECT2-RT-FW-1348CDS ccattggaagaggaaggaca >ECT2-RT-REV-1507CDS caccaatgcttttgcctca	mECT2	158	>mECT2-RT-PCR-FW-2126-CDS GGCACAAGGTTATTGGCACT >mECT2-RT-PCR-REV-2284-CDS GCCTTACAAGCAAGGCAAAG
BCR	169	>BCR-RT-FW-3543CDS cctctggaccacctgaaaa >BCR-RT-REV-3711CDS caaggaccagctgtcagtca	mBCR	175	>mBCR-RT-PCR-FW-2691-CDS CCGAGTGGAGAGAAAGCATC >mBCR-RT-PCR-REV-2866-CDS CAGGAAGCCGTAGAGTCCAG
ABR	205	>ABR-RT-FW-2352CDS gaaggagccatcaacaaaa >ABR-RT-REV-2556CDS tgtgtccgcttgagttctg	mABR	157	>mABR-RT-PCR-FW-1291-CDS GACCTCAGCAGGAAAGCATC >mABR-RT-PCR-REV-1448-CDS TGAGGGCAGAGATCTTCGTT
ARHGEF17	373	>ARHGEF17-RT-3576CDS Catgctgagaacaaggaga	mARHGEF17	151	>mARHGEF17-RT-PCR-FW- 2710-CDS

		>ARHGEF17-RT-REV-3949CDS agacgatgaggtccgtgaac			CAGTGACCCAGCTATGGAT >mARHGEF17-RT-PCR-REV- 2861- CDS GCCAGCAATCCTGTCTTCTC
ARHGEF10L	202	>ARHGEF10L-RT-FW-800CDS gcaaagtctcctcctgcac >ARHGEF10L-RT-REV-1001CDS Gactccacgtagctgacctc	mARHGEF10L	192	>mARHGEF10L-RT-PCR-FW- 3272- CDS ACTCTGGAGCACCTTCAGGA >mARHGEF10L-RT-PCR-REV- 3464CDS catgccttccctgtgatct
ARHGEF10	196	>ARHGEF10-RT-FW-1427CDS tcttcgtggcttcgtttct >ARHGEF10-RT-REV-1622CDS ctctggatgggcttcatcat	mARHGEF10	200	>mARHGEF10-RT-PCR-FW-2972- CDS TCACGCATCCTGTGTATGGT >mARHGEF10-RT-PCR-REV-3172- CDS CGGTGCATAGAAGTGCTGAA
C9orf100	210	>C9ORF100-RT-FW-313CDS caatttgctccaactcaga >C9ORF100-RT-REV-522CDS Gctgttgggacctgtgtttt	mC9ORF100	204	>mC9orf100-RT-PCR-FW-178-CDS CCTGAAAGCCAAAGGAACAC >mC9orf100-RT-PCR-REV- 382-CDS CGCCTGAAGGGTAGTCTGAG
ARHGEF16	204	>ARHGEF16-RT-FW-1465-CDS aaggtaagtcctccact >ARHGEF16-RT-REV-1668-CDS gtggttcatctgggctgtagt	mARHGEF16	247	>mARHGEF16-RT-PCR-FW-822-CDS CAGCTTCTCGTTGGATGACA >mARHGEF16-RT-PCR-REV-1069- CDS CTTTGAAAGACCCTTGTGTC
SGEF	221	>SGEF-RT-FW-1263CDS ctctgctggtaaaagaaagg >SGEF-RT-REV-1484CDS ttgcttgcctcacagacatc	mSGEF	153	>mSGEF-RT-PCR-FW-2433-CDS TTTTCTCATTCTCCCCATGC >mSGEF-RT-PCR-FW-2586-CDS TGCTCCTTATTGCACAGTC
ARHGEF15	201	>ARHGEF15-RT-FW-1421CDS ggtttctagcaacgctcctg >ARHGEF15-RT-REV-1621CDS Cacacttagggaggctctgc	mARHGEF15	210	>mARHGEF15-RT-PCR-FW 2290- CDS CTGTTCCCCAGACACCATCT >mARHGEF15-RT-PCR-REV- 2500- CDS CCTCCTCTCGTGTCTCCTG
NGEF	230	>NGEF-RT-FW-1528CDS accaagaagctcttccacga >NGEF-RT-REV-1757CDS tgagaggacgcctttagcat	mNGEF	242	>mNGEF-RT-PCR-FW-1312-CDS TCGGTACCCATCATCTCACA >mNGEF-RT-PCR-REV-1554-CDS CAGTGTGTTGACCTGGTCTCT
ARHGEF19	239	>ARHGEF19-RT-FW-1849CDS agcaaggcagctctacctca >ARHGEF19-RT-REV-2087CDS atccatcgctgcttctcact	mARHGEF19	162	>mARHGEF19-RT-PCR-FW-2033- CDS GATCCATTTTGAGGGCAAGA >mARHGEF19-RT-PCR-2195-REV- CDS CAGCAGGCAGTCATTGAAGA
ARHGEF5	214	>ARHGEF5-RT-FW-4195CDS gccttggagttcagtgcttc >ARHGEF5-RT-REV4408CDS gcagaaagagtcggaacagg	mARHGEF5	166	>mARHGEF5-RT-PCR-FW- 3687-CDS GGCTTTTCAAGACGTTGCTC >mARHGEF5-RT_PCR-REV- 3853- CDS GAAGAGACCAGTGCCTTTTCG
PLEKHG6	231	>PLEKHG6-RT-FW-1947CDS gccggaaggaatcctaaaag >PLEKHG6-RT-REV-2177CDS ccagcttcaggaacagagg	mPLEKHG6	249	>mPLEKHG6-RT-PCR-FW-1285-CDS AGACAGCAACCCACTGTTC >mPLEKHG6-RT-PCR—REV-1534- CDS CTCCTGCTCTTACCCTGTGTC
PLEKHG5	170	>PLEKHG5-RT-FW-387CDS gaagagcacaggcctgaaac >PLEKHG5-RT-REV-557CDS Tcaaatacaggcagcagcac	mPLEKHG5	171	>mPLEKHG5-RT-PCR-FW- 512-CDS AATTCGACCTGAACGTGGAC >mPLEKHG5-RT-PCR-REV-683-CDS CTGTAGGCCTCGAAGGTGAG
ITSN2	206	>ITSN2-RT-PCR-FW-3124CDS gggagtgctagcaagtctgg >ITSN2-RT-PCR-REV-3330CDS Atgactggcaggaaaccatc	miTSN2	175	>miTSN2-RT-PCR-FW-1514-CDS GCAGCTGGAGTTGGAGAAAC >miTSN2-RT-PCR-REV-1689-CDS CCCTGGTCTTCTGACTGAGC
ITSN1	224	>ITSN1-RT-PCR-FW-401CDS Tgggatccattccagttgtt >ITSN1-RT-PCR-REV-625CDS Cactggccacatcaaatgac	miTSN1	211	>miTSN1-RT-PCR-FW- 2557-CDS ATGGTGGATGAAAGCCAGAC >miTSN1-RT-PCR-REV-2768-CDS GGCTCAGAAGAGGTCACTGG
NET-1	232	>NET1-RT-FW-330CDS tggagctgtcagacgttttg >NET1-RT-REV-561CDS ctgttcacctcgggacattt	mNET1	193	>mNET1-RT-PCR-FW-708-CDS GGGGAACAGGACTTGATTGA >mNET1-RT-PCR-REV- 901-DCDS ATCTGCTCCACAGTCCCATC
ARHGEF3	175	>ARHGEF3-RT-FW-821CDS tgaggcacacacaaatgat >ARHGEF3-RT-REV-995CDS gagctgtcagtcagggagtc	mARHGEF3	218	>mARHGEF3-RT-PCR-FW-1001-CDS GAATCGGAATGCCGCTATTA >mARHGEF3-RT-PCR-REV-1219- CDS GATGGGCTGTCGGTACAAC
ARHGEF12	225	>ARHGEF12-RT-PCR-FW- 4268CDS cagtcaggagagttccaca >ARHGEF12-RT-PCR-REV- 4493CDS Tctgcacaagaggaggact	mARHGEF12	167	>mARHGEF12-RT-PCR-FW-2225- CDS ATCGGCTTCTTCAAAGAT >mARHGEF12-2392-REV- CDS GGGTGGCGTGACTTCTGTAT
ARHGEF11	242	>ARHGEF11-RT-PCR-FW- 3839CDS tcatcagctcactctcact	mARHGEF11	193	>mARHGEF11-RT-PCR-FW-4217- CDS CCAGCAGAACCTCTGGACTC

		>ARHGEF11-RT-PCR-REV-4081CDS Tgtaacctcctgctgcctct			>mARHGEF11-RT-PCR-REV-4410-CDS TGAAGCTTGACGGTCAGTTG
ARHGEF1	170	>ARHGEF1-RT-PCR-FW-731CDS tcttccggaaaaaggatgatg >ARHGEF1-RT-PCR-REV-901CDS Ggtctgtagcacctggcttc	mARHGEF1	200	>mARHGEF1-RT-PCR-FW-816-CDS TCTTCCGGAAAAAGGTGATG >mARHGEF1-RT-PCR-REV-1016-CDS TGTCCCGAGAAGACATACCC
ARHGEF2	185	>ARHGEF2-RT-FW-719CDS agctacactggagccagga >ARHGEF2-RT-REV-903CDS aggacctgagaactggctga	mARHGEF2	196	>mARHGEF2-RT-PCR-FW-1992-CDS CTTAAAGGCTGGCTTCGTTG >mARHGEF2-RT-PCR-REV-2188-CDS AGTCCAAGGGTAAGGCTGGT
AKAP13	219	>AKAP13-RT-PCR-FW—5711CDS cgctctccaaaagtgtctcc >AKAP13-RT-PCR-REV—5930CDS Gcttcagctgtttggactc	mAKAP13	186	>mAKAP13-RT-PCR-FW-4774-CDS TCCCTGGATCGACATTCTTC >mAKAP13-RT-PCR-REV-4960-CDS TGCTGTCCATCTCCTCTCT
ARHGEF18	218	>ARHGEF18-RT-FW-578CDS caggtgaaatggggagaga >ARHGEF18-RT-REV-795CDS ctccaccagcactgggtatt	mARHGEF18	172	>mARHGEF18-RT-PCR-FW-2822-CDS GCAAGGATGAGAGTGCATCA >mARHGEF18-RT-PCR-REV-2993-CDS GGGGAGACAGGTGGTAGTGA
RGNEF	189	>RGNEF-RT-FW-422CDS Cccatctggaattgcctcta >RGNEF-RT-REV-610CDS ctaattggtgtggcaccctct	mRGNEF	214	>mRGNEF-RT-PCR-FW-2608-CDS CCTTTTGCAGTAGGCAGGAG >mRGNEF-RT-PCR-REV-2822-CDS GAAGAAGAAGTGCCGGTGAG
ARHGEF37	234	>ARHGEF37-RT-PCR-FW-71-CDS< AGGACAGATCGCTGCTTCAT >ARHGEF37-RT-PCR-Rev-304-CDS< GCTGCACTTGTTCTCTTCC	mARHGEF37	180	>mARHGEF37-RT-FW-1180-cds gaataccaggcgctcaactc >mARHGEF37-RT-REV-1360-cds gctctgagacgtggtgatga
DNMBP	170	>DNMBP-RT-FW-1489CDS cctcagctccacaacctagc >DNMBP-RT-REV-1658CDS gtcagcttcgagctccaggtc	mTUBA	171	>mTuba-RT-PCR-FW-2166-CDS GCTGTTGGAGGAAAAGCAAG >mTuba-RT-PCR-REV-2337-CDS AGTGGACACAGACCCAAAGG
VAV-2	207	>VAV2-RT-PCR-FW-728CDS tcaaggtgcatcacagcttc >VAV2-RT-PCR-REV-935CDS Ttcagtggtgactcctcgcac	mVAV2	177	>mVAV2-RT-PCR-FW-2583-CDS GGAAAGCTTCAAGCAGTTGG >mVAV2-RT-PCR-REV-2759-CDS ACTGACCAGAGGGAGCAGA
VAV-1	151	>VAV1-RT-FW-117CDS tggtgtccttctgtgctcagc >VAV1-RT-REV-267CDS cttgaggccgaactctcac	mVAV1	182	>mVAV1-RT-PCR-FW-1047-CDS CTACGGGATCTGCTGATGGT >mVAV1-RT-PCR-REV-1229-CDS CTGCCGTAGGGTTTCATTGT
VAV-3	244	>VAV3-RT-PCR-FW-1725CDS accagagaaaacggaccaatg >VAV3-RT-PCR-REV-1969CDS Gcttgactgcatcacttggga	mVAV3	221	>mVAV3-RT-PCR-FW-1712-CDS AGCCAACAACCTTACCCTG >mVAV3-RT-PCR-REV-1933-CDS GATGTACCCGAGTGAAGGT
ARHGEF6	207	>ARHGEF6-rtpr-FW1305-cds tattcagcagatgggaaggag >ARHGEF6-rtpr-REV-1511cds gtcaccaccgttctgctat	mARHGEF6	199	>mARHGEF6-RT-PCR-FW-2087-CDS GAGCCCCAAAACAATGAAGA >mARHGEF6-RT-PCR-REV-2286-CDS CGGGGAGTAGAAGTGTGGA
ARHGEF7	229	>ARHGEF7-RT-PCR-FW-272-CDS agcctcctcagcatctggta >ARHGEF7-rtpr-REV-501-CDS Tgaagtccgagtggtgcaag	mARHGEF7	246	>mARHGEF7-RT-PCR-FW-1167-CDS TATGACGGCCTTCAAAAACC >mARHGEF7-RT-PCR-REV-1413CDS ACCACTCATCTGGGACTTG
TIAM-1	151	>TIAM1-RT-PCR-FW-3735CDS tgaccagctgattgctgaac >TIAM1-RT-PCR-REV-3886CDS Agacgaatgctgccaactct	mTIAM1	210	>mTIAM1-RT-PCR-FW-4510-CDS CTACCGAAGCTTTGCAGGTC >mTIAM1-RT-PCR-REV-4720-CDS TCCGTTTTGAGGAGCTGTCT
TIAM-2	203	>TIAM2-RT-FW-2925CDS ggacacaaaagcaaccctgt >TIAM2-RT-REV-3127CDS ccagagtgccatctgtctga	mTIAM2	188	>mTIAM2-RT-PCR-FW-2926-CDS GTCTTCAGCTCCGAAAGGTG >mTIAM2-RT-PCR-REV-3114-CDS GGTGTTCGTCCACCTGAAC
PREX-2		>P-Rex2-RT-FW-2760-CDS< Tgtctgggagcacagttttg >P-Rex2-RT-REV2930-CDS< gccctctctgtaagagcatt	mPREX2	239	>mPREX-2-RT-PCR-FW-1988-CDS GCACAAAGCCAAGAGAGACC >mPREX-2-RT-PCR-REV-2227-CDS GCTTCATTGGCCGTTTGTAT
PREX-1	226	>PREX-1-FW-RT-3383CDS CCCTGGTCAGTGAAGAGAGC >PREX-1-REV-RT-3068CDS TCATCTCCAGACCCCATCTC	mPREX1	196	>mPREX-1-RT-PCR-FW-483-CDS GCACGAAGTGGGAATGTTT >mPREX-1-RT-PCR-REV-679-CDS ACAGCAGGTAGCCTCCAGA
ARHGEF4	248	>ARHGEF4-RT-FW-206CDS tgtgctggagaagacacag >ARHGEF4-RT-REV-453CDS tgtgtccagagctccatcag	mARHGEF4	198	>mARHGEF4-RT-PCR-FW-756-CDS TGGAGCAGAAGTTCAACACG >mARHGEF4-RT-PCR-REV-954-CDS TCAATCATCTTTGCAGCAG
ARHGEF9	168	>ARHGEF9-RT-FW-654CDS gcactctttgaggcctgtc >ARHGEF9-RT-REV-821CDS	mARHGEF9	232	>mARHGEF9-RT-PCR-FW-1189-CDS TTGGCCGAGCTCATAAAGTA >mARHGEF9-RT-PCR-REV-1421CDS

		Aagcagctgccacatacct >SPATA13-RT-FW-625CDS gagctgtcggaaaactccag >SPATA13-RT-REV-838CDS Caacgggtgaacattcctgtg	mSPATA13	230	TGGTAGATCCAGGCCATCTC >mSPATA 13-RT-PCR-FW- 1766-CDS CTCAGCCACTGGGAAATGAT >mSPATA 13-RT-PCR-REV- 1996- CDS CTGAACTGAGGGACAGCACACA
SPATA-13	213				
PLEKHG1	211	>PLEKHG1-RT-FW-3294CDS tctcccaccagagcaagact >PLEKHG1-RT-REV-3504CDS ccgaccaagaggtgtaaa	mPLEKHG1	246	>mPLEKHG1-RT-PCR-FW- 2561-CDS AGCTCCAGTTCACTGAGGA >mPLEKHG1-RT-PCR-REV- 2807- CDS TCTCTGGTGCATCGTCTTTG
PLEKHG2	163	>PLEKHG2-RT-FW-3442CDS ctgccacaagtctcacaga >PLEKHG2-RT-REV-3604CDS tcttctgctccaacgaaggt	mPLEKHG2	216	>mPLEKHG2-RT-PCR-FW-1878-CDS CACCTACAAGGGCCACATCT >mPLEKHG2-RT-PCR-REV-2094- CDS GAGAACTTGCTTTGCCTTGG
PLEKHG4	203	>PLEKHG4-RT-FW-1064CDS tcgaaagtgtgaaggctgtg >PLEKHG4-RT-REV-1266CDS gtccattgccgtcctgtagt	mPLEKHG4	160	>mPLEKHG4-RT-PCR-FW-354-CDS CCTGACACAGGGTGACAATG >mPLEKHG4-RT-PCR-REV-514-CDS GACAGTCAGCAGGCTTAGGG
PLEKHG4B	210	>PLEKHG4B 764 FW catagcatcccaggaaaga >PLEKHG4B 973 REV gctcacgacctcacactgaa			
			mPLEKHG3	211	>mPLEKHG3-RT-PCR- FW-3493-CDS ACTCCTGACCAAGAGGAGCA >mPLEKHG3-RT-PCR-REV-3704- CDS CTTGGGCTAACAGCAGAAGG
TRIO	215	>TRIO-RT-FW-5750CDS tgaaaagcaagatggcactg >TRIO-RT-REV-5964CDS aaggtcccgcacatagtcac	mTRIO	207	>mTRIO-RT-PCR-FW-1041-CDS GCTGTACCGCTAGAGGAAC >mTRIO-RT-PCR-REV-1248-CDS CGAGCCTGAGTTCTTTTTGG
			mp63RhoGEF/ mGEFT	167	>mGEFT-RT-PCR-FW-627-CDS GCAGAAGAAGATGGCTCTGG >mGEFT-RT-PCR-REV-794-CDS CCAAACACAATCCTGTACAG
KALIRIN	210	>KARLN-RT-FW-1513CDS gagaggggtgttctgcaagc >KARLN-RT-REV-1722CDS cgcaggaacagaggagtagg	mKalirin	177	>mKARLN-RT-PCR-FW- 943-CDS GACAACACCTGCACCAAATG >mKARLN-RT-PCR-REV-1120-CDS TGGAGGTCTAGTGCATGCTG
MCF2L2	202	>MCF2L2-RT-FW-2170CDS gcaatctggcaagagtgtca >MCF2L2-RT-REV-2371CDS ccttagccgagcctcctagt			
MCF2L	168	>MCF2L-RT-FW-1188CDS agcgtcccagaagatagcaa >MCF2L-RT-REV-1355CDS Gcgtagtgtctgttcccaat	mMCF2L	165	>mMCF2L-RT-PCR-FW- 1160-CDS TGTCACTGGAAGGTCAGCAG >mMCF2L-RT-PCR-REV- 1325-CDS GTCTCCAGGAGGCTATGCAG
MCF2	249	>MCF2-RT-FW- 667CDS ctggaagtgcctgacactga >MCF2-RT-REV- 915CDS agccagtctgctgtgttg	mMCF2	223	>mMCF2-RT-PCR-FW-1940-CDS TGCCTTTTTCCAGGAATGTC >mMCF2-RT-PCR-REV- 2163-CDS CCATTGATGGCAGTCTGATG

Tabla de primers de RhoGEFs que no se encuentran en el SMART

Nombre	pb	Pares de primers para RT-PCR secuencia (humano)
ALSIN, ALS2	166	>ALS2-FW-RT-4308-cds< AGGCAGCACAAATTCCTCTCT >ALS2-REV-RT-4474-cds< GCATAAACAGCGGTGGGTAG
ARHGEF33, FLJ41381	211	>ARHGEF33 -FW-RT- 68- cds< TTTACCAGTTGCAGGCCCTA >ARHGEF33-REV-RT-267-cds< CATCGACATGGCATTGCTCA
OBSCURIN, ARHGEF30	249	>Obscurin-FW-RT-22841-cds< TGACCTGCTCATCCCCATTT >Obscurin-REV-RT-23089-cds< ACTTGAGCTGCTTGGTGTTG
SOLO, ARHGEF40	244	>ARHGEF40-RT-FW-3294-cds< AGATTACGTGGCCACCTTGA >ARHGEF40-RT-REV- 3537-cds< CAGTTTGTGTCGGTGCTTCA
FLJ20184, ARHGEF38	161	>ARHGEF38-FW-RT-1133-cds< TGCAGAGTGTGATGGACCTT >ARHGEF38-REV-RT-1293-cds< TGGGAATAAGGACAGCAGGG
PLEKHG7	221	>PLEKHG7-FW-RT-648-cds< CTTGTACCAACCAGCAGAC >PLEKHG7-REV-RT-868-cds< CTGTACACGAACCACCCTCT
PLEKHG3	192	>PLEKHG3-FW-RT-640-cds< AACGACATGAAGAGGAGGCA >PLEKHG3-REV-832-cds< CCCGTCTTGGTGATAAGC

Tabla de primers de GEF no convencionales

Nombre	pb	<i>Pares de primers para RT-PCR Secuencia (humano)</i>
Dock1	179	>DOCK1-FW-3129-cds< tgaacatggtgcaaaataaagtct >DOCK1-RV-3308-cds< aaagccaatctgtctcctcatatc
Dock2	229	>DOCK2-FW-3023-cds< gacagtgtgaagacttacttggga >DOCK2-RV-3252-cds< cagattgttgatggattcaagag
Dock3	216	>DOCK3-FW-3346-cds< ctgcacaagaatttcacagagact >DOCK3-RV-3562-cds< agtggatcttatgttcaccctcaat
Dock4	242	>DOCK4-FW-349-cds< tggaaattggagatacagttcaga >DOCK4-RV-591-cds< cattacgcacatagattgttcc
Dock5	153	>DOCK5-FW-1825-cds< gatctggtggtttataagggtgac >DOCK5-RV-1978-cds< tgtcttagtgctatccttgcttg
Dock6	210	>DOCK6-FW-977-cds< aactctacttcgacctgaactcg >DOCK6-RV-1187-cds< ccactctttcaacaccatgtaag
Dock7	160	>DOCK7-FW-3392-cds< caggtgtcttcaagcttactca >DOCK7-RV-3552-cds< gaagaacagaaggtgatggagat
Dock8	170	>Dock-8-FW-cds< cttgtatgaccttctcctcat >DOCK8-RV-cds< aaaaggttcagattgaggtaatgc
Dock9	204	>DOCK9-FW-cds< ataatccagaggcatctaagaacg >DOCK9-RV-cds< ttcaacggaataatgttcatgg
Dock10	241	>DOCK10-FW-cds< caattacatcagcatgttctcctc >DOCK10-RV-cds< gcagaattccgattaagaagtgtt
Dock11	164	>DOCK11-FW-3357-cds< ttcaagaccctttaaataatga >DOCK11-RV-3598-cds< tftgaaaaatgctgaaggaaa
Elmo1	182	>ELMO1-FW-3360-cds< ttagaagagatcctcaggagaa >ELMO1-RV-3542-cds< ttggcagtttgagtcatacaagat
Elmo2	252	>ELMO2-FW-1161-cds< tttgacgcagagtctgatcct >ELMO2-RV-1416-cds< atgttgtcttcccggctact
Elmo3	179	>ELMO3-FW-cds< gtggtgaagattgccatcaag >ELMO3-RV-cds< gctgtattctcggtgatga

Referencias

1. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):653-60.
2. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature.* 2005 Dec 15;438(7070):932-6.
3. Carmeliet P, Tessier-Lavigne M. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature.* 2005 Jul 14;436(7048):193-200.
4. Bryan BA, D'Amore PA. What tangled webs they weave: Rho-GTPase control of angiogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2007 Aug;64(16):2053-65.
5. Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res.* 2007 Mar 30;100(6):782-94.
6. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis. *BMB Rep.* 2008 Apr 30;41(4):278-86.
7. Lohela M, Bry M, Tammela T, Alitalo K. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 2009 Apr;21(2):154-65.
8. Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology.* 2005;69 Suppl 3:4-10.
9. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003 Jun;3(6):401-10.
10. Weis SM, Cheresh DA. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med.* 2011;17(11):1359-70.
11. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag.* 2006;2(3):213-9.
12. Dome B, Hendrix MJ, Paku S, Tovari J, Timar J. Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol.* 2007 Jan;170(1):1-15.
13. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 2011 May 19;473(7347):298-307.
14. Munoz-Chapuli R, Quesada AR, Angel Medina M. Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci.* 2004 Sep;61(17):2224-43.
15. Sakurai T, Kudo M. Signaling pathways governing tumor angiogenesis. *Oncology.* 2011;81 Suppl 1:24-9.
16. Sumpio BE, Riley JT, Dardik A. Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002 Dec;34(12):1508-12.
17. Wacker A, Gerhardt H. Endothelial development taking shape. *Curr Opin Cell Biol.* 2011 Dec;23(6):676-85.
18. Michaelis UR. Mechanisms of endothelial cell migration. *Cell Mol Life Sci.* 2014 Nov;71(21):4131-48.
19. De Smet F, Segura I, De Bock K, Hohensinner PJ, Carmeliet P. Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 May;29(5):639-49.
20. Tung JJ, Tattersall IW, Kitajewski J. Tips, stalks, tubes: notch-mediated cell fate determination and mechanisms of tubulogenesis during angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Feb;2(2):a006601.

21. Siemerink MJ, Klaassen I, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Endothelial tip cells in ocular angiogenesis: potential target for anti-angiogenesis therapy. *J Histochem Cytochem*. 2013 Feb;61(2):101-15.
22. del Toro R, Prahst C, Mathivet T, Siegfried G, Kaminker JS, Larrivee B, et al. Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes. *Blood*. 2010 Nov 11;116(19):4025-33.
23. Phng LK, Gerhardt H. Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Dev Cell*. 2009 Feb;16(2):196-208.
24. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, et al. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. 2003 Dec 5;302(5651):1704-9.
25. Heasman SJ, Ridley AJ. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Sep;9(9):690-701.
26. Ridley AJ. Rho GTPase signalling in cell migration. *Curr Opin Cell Biol*. 2015 Oct;36:103-12.
27. Schmidt A, Hall A. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev*. 2002 Jul 1;16(13):1587-609.
28. Tybulewicz VL, Henderson RB. Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nat Rev Immunol*. 2009 Sep;9(9):630-44.
29. Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:247-69.
30. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 2002 Dec 12;420(6916):629-35.
31. Mayor R, Carmona-Fontaine C. Keeping in touch with contact inhibition of locomotion. *Trends Cell Biol*. 2010 Jun;20(6):319-28.
32. Cerione RA, Zheng Y. The Dbl family of oncogenes. *Curr Opin Cell Biol*. 1996 Apr;8(2):216-22.
33. Rossman KL, Der CJ, Sondek J. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Feb;6(2):167-80.
34. Kather JN, Kroll J. Rho guanine exchange factors in blood vessels: fine-tuners of angiogenesis and vascular function. *Exp Cell Res*. 2013 May 15;319(9):1289-97.
35. Cook DR, Rossman KL, Der CJ. Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease. *Oncogene*. 2014 Jul 31;33(31):4021-35.
36. Goicoechea SM, Awadia S, Garcia-Mata R. I'm coming to GEF you: Regulation of RhoGEFs during cell migration. *Cell Adh Migr*. 2014;8(6):535-49.
37. Garcia-Mata R, Burridge K. Catching a GEF by its tail. *Trends Cell Biol*. 2007 Jan;17(1):36-43.
38. Liu M, Horowitz A. A PDZ-binding motif as a critical determinant of Rho guanine exchange factor function and cell phenotype. *Mol Biol Cell*. 2006 Apr;17(4):1880-7.
39. Zheng M, Cierpicki T, Momotani K, Artamonov MV, Derewenda U, Bushweller JH, et al. On the mechanism of autoinhibition of the RhoA-specific nucleotide exchange factor PDZrhoGEF. *BMC Struct Biol*. 2009;9:36.
40. 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.
41. Erickson JW, Cerione RA. Structural elements, mechanism, and evolutionary convergence of Rho protein-guanine nucleotide exchange factor complexes. *Biochemistry*. [Review]. 2004 Feb 3;43(4):837-42.
42. Viaud J, Gaits-Iacovoni F, Payrastra B. Regulation of the DH-PH tandem of guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases by phosphoinositides. *Adv Biol Regul*. 2012 May;52(2):303-14.
43. Vetter IR, Wittinghofer A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*. 2001 Nov 9;294(5545):1299-304.

44. 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.
45. Lee SH, Kunz J, Lin SH, Yu-Lee LY. 16-kDa prolactin inhibits endothelial cell migration by down-regulating the Ras-Tiam1-Rac1-Pak1 signaling pathway. *Cancer Res*. 2007 Nov 15;67(22):11045-53.
46. Birukova AA, Alekseeva E, Mikaelyan A, Birukov KG. HGF attenuates thrombin-induced endothelial permeability by Tiam1-mediated activation of the Rac pathway and by Tiam1/Rac-dependent inhibition of the Rho pathway. *FASEB J*. 2007 Sep;21(11):2776-86.
47. Nimnual AS, Yatsula BA, Bar-Sagi D. Coupling of Ras and Rac guanine triphosphatases through the Ras exchanger Sos. *Science*. 1998 Jan 23;279(5350):560-3.
48. Snyder JT, Worthylake DK, Rossman KL, Betts L, Pruitt WM, Siderovski DP, et al. Structural basis for the selective activation of Rho GTPases by Dbl exchange factors. *Nat Struct Biol*. 2002 Jun;9(6):468-75.
49. Garnaas MK, Moodie KL, Liu ML, Samant GV, Li K, Marx R, et al. Syx, a RhoA guanine exchange factor, is essential for angiogenesis in Vivo. *Circ Res*. 2008 Sep 26;103(7):710-6.
50. Ernkvist M, Luna Persson N, Audebert S, Lecine P, Sinha I, Liu M, et al. The Amot/Patj/Syx signaling complex spatially controls RhoA GTPase activity in migrating endothelial cells. *Blood*. 2009 Jan 1;113(1):244-53.
51. Ngok SP, Anastasiadis PZ. Rho GEFs in endothelial junctions: Effector selectivity and signaling integration determine junctional response. *Tissue Barriers*. 2013 Dec 1;1(5):e27132.
52. Rittinger K. Snapshots form a big picture of guanine nucleotide exchange. *Sci Signal*. 2009;2(91):pe63.
53. Kurogane Y, Miyata M, Kubo Y, Nagamatsu Y, Kundu RK, Uemura A, et al. FGD5 mediates proangiogenic action of vascular endothelial growth factor in human vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Apr;32(4):988-96.
54. Cheng C, Haasdijk R, Tempel D, van de Kamp EH, Herpers R, Bos F, et al. Endothelial cell-specific FGD5 involvement in vascular pruning defines neovessel fate in mice. *Circulation*. 2012 Jun 26;125(25):3142-58.
55. Garrett TA, Van Buul JD, BurrIDGE K. VEGF-induced Rac1 activation in endothelial cells is regulated by the guanine nucleotide exchange factor Vav2. *Exp Cell Res*. 2007 Sep 10;313(15):3285-97.
56. Kusuhara S, Fukushima Y, Fukushima S, Jakt LM, Okada M, Shimizu Y, et al. Arhgef15 promotes retinal angiogenesis by mediating VEGF-induced Cdc42 activation and potentiating RhoJ inactivation in endothelial cells. *PLoS One*. 2012;7(9):e45858.
57. Nalbant P, Chang YC, Birkenfeld J, Chang ZF, Bokoch GM. Guanine nucleotide exchange factor-H1 regulates cell migration via localized activation of RhoA at the leading edge. *Mol Biol Cell*. 2009 Sep;20(18):4070-82.
58. Birkenfeld J, Nalbant P, Yoon SH, Bokoch GM. Cellular functions of GEF-H1, a microtubule-regulated Rho-GEF: is altered GEF-H1 activity a crucial determinant of disease pathogenesis? *Trends Cell Biol*. 2008 May;18(5):210-9.
59. Guo F, Tang J, Zhou Z, Dou Y, Van Lonkhuyzen D, Gao C, et al. GEF-H1-RhoA signaling pathway mediates LPS-induced NF-kappaB transactivation and IL-8 synthesis in endothelial cells. *Mol Immunol*. 2012 Feb;50(1-2):98-107.
60. Knezevic II, Predescu SA, Neamu RF, Gorovoy MS, Knezevic NM, Easington C, et al. Tiam1 and Rac1 are required for platelet-activating factor-induced endothelial junctional disassembly and increase in vascular permeability. *J Biol Chem*. 2009 Feb 20;284(8):5381-94.
61. O'Bryan JP. Intersecting pathways in cell biology. *Sci Signal*. 2010;3(152):re10.
62. Momboisse F, Ory S, Ceridono M, Calco V, Vitale N, Bader MF, et al. The Rho guanine nucleotide exchange factors Intersectin 1L and beta-Pix control calcium-regulated exocytosis in neuroendocrine PC12 cells. *Cell Mol Neurobiol*. 2010 Nov;30(8):1327-33.

63. Klein IK, Predescu DN, Sharma T, Knezevic I, Malik AB, Predescu S. Intersectin-2L regulates caveola endocytosis secondary to Cdc42-mediated actin polymerization. *J Biol Chem*. 2009 Sep 18;284(38):25953-61.
64. Mitin N, Betts L, Yohe ME, Der CJ, Sondek J, Rossman KL. Release of autoinhibition of Asef by APC leads to CDC42 activation and tumor suppression. *Nat Struct Mol Biol*. 2007 Sep;14(9):814-23.
65. Zhang Z, Chen L, Gao L, Lin K, Zhu L, Lu Y, et al. Structural basis for the recognition of Asef by adenomatous polyposis coli. *Cell Res*. 2012 Feb;22(2):372-86.
66. Carretero-Ortega J, Walsh CT, Hernandez-Garcia R, Reyes-Cruz G, Brown JH, Vazquez-Prado J. Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate-dependent Rac exchanger 1 (P-Rex-1), a guanine nucleotide exchange factor for Rac, mediates angiogenic responses to stromal cell-derived factor-1/chemokine stromal cell derived factor-1 (SDF-1/CXCL-12) linked to Rac activation, endothelial cell migration, and in vitro angiogenesis. *Mol Pharmacol*. 2010 Mar;77(3):435-42.
67. Guilluy C, Bregeon J, Toumaniantz G, Rolli-Derkinderen M, Retailleau K, Loufrani L, et al. The Rho exchange factor Arhgef1 mediates the effects of angiotensin II on vascular tone and blood pressure. *Nat Med*. 2010 Feb;16(2):183-90.
68. Woik N, Dietz CT, Schaker K, Kroll J. Kelch-like ECT2-interacting protein KLEIP regulates late-stage pulmonary maturation via Hif-2alpha in mice. *Dis Model Mech*. 2014 Jun;7(6):683-92.
69. Nacak TG, Alajati A, Leptien K, Fulda C, Weber H, Miki T, et al. The BTB-Kelch protein KLEIP controls endothelial migration and sprouting angiogenesis. *Circ Res*. 2007 Apr 27;100(8):1155-63.
70. Lu M, Kinchen JM, Rossman KL, Grimsley C, deBakker C, Brugnera E, et al. PH domain of ELMO functions in trans to regulate Rac activation via Dock180. *Nat Struct Mol Biol*. 2004 Aug;11(8):756-62.
71. Grimsley CM, Kinchen JM, Tosello-Trampont AC, Brugnera E, Haney LB, Lu M, et al. Dock180 and ELMO1 proteins cooperate to promote evolutionarily conserved Rac-dependent cell migration. *J Biol Chem*. 2004 Feb 13;279(7):6087-97.
72. Meller N, Merlot S, Guda C. CZH proteins: a new family of Rho-GEFs. *J Cell Sci*. 2005 Nov 1;118(Pt 21):4937-46.
73. Gumienny TL, Brugnera E, Tosello-Trampont AC, Kinchen JM, Haney LB, Nishiwaki K, et al. CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration. *Cell*. 2001 Oct 5;107(1):27-41.
74. Kapp GT, Liu S, Stein A, Wong DT, Remenyi A, Yeh BJ, et al. Control of protein signaling using a computationally designed GTPase/GEF orthogonal pair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Apr 3;109(14):5277-82.
75. Derewenda U, Oleksy A, Stevenson AS, Korczynska J, Dauter Z, Somlyo AP, et al. The crystal structure of RhoA in complex with the DH/PH fragment of PDZRhoGEF, an activator of the Ca(2+) sensitization pathway in smooth muscle. *Structure*. 2004 Nov;12(11):1955-65.
76. Chrencik JE, Brooun A, Zhang H, Mathews, II, Hura GL, Foster SA, et al. Structural basis of guanine nucleotide exchange mediated by the T-cell essential Vav1. *J Mol Biol*. 2008 Jul 25;380(5):828-43.
77. Jaiswal M, Dvorsky R, Ahmadian MR. Deciphering the molecular and functional basis of Dbl family proteins: a novel systematic approach toward classification of selective activation of the Rho family proteins. *J Biol Chem*. 2013 Feb 8;288(6):4486-500.
78. Testori J, Schweighofer B, Helfrich I, Sturtzel C, Lipnik K, Gesierich S, et al. The VEGF-regulated transcription factor HLX controls the expression of guidance cues and negatively regulates sprouting of endothelial cells. *Blood*. 2011 Mar 3;117(9):2735-44.
79. José Vázquez-Prado MLG-H, Jorge Carretero-Ortega,, Sandra Sánchez-Barbosa RH-GyGR-C. MECANISMOS MOLECULARES DE LA MIGRACIÓN DE

CÉLULAS ENDOTELIALES Y ANGIOGÉNESIS: PAPEL

REGULADOR DE LAS GTPasas DE LA FAMILIA DE Rho México D.F.2006.

80. van Buul JD, Geerts D, Huveneers S. Rho GAPs and GEFs: controlling switches in endothelial cell adhesion. *Cell Adh Migr.* 2014;8(2):108-24.
81. Steenblock C, Heckel T, Czupalla C, Espirito Santo AI, Niehage C, Sztacho M, et al. The Cdc42 guanine nucleotide exchange factor FGD6 coordinates cell polarity and endosomal membrane recycling in osteoclasts. *J Biol Chem.* 2014 Jun 27;289(26):18347-59.
82. Davis GE, Koh W, Stratman AN. Mechanisms controlling human endothelial lumen formation and tube assembly in three-dimensional extracellular matrices. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2007 Dec;81(4):270-85.
83. Hayakawa M, Matsushima M, Hagiwara H, Oshima T, Fujino T, Ando K, et al. Novel insights into FGD3, a putative GEF for Cdc42, that undergoes SCF(FWD1/beta-TrCP)-mediated proteasomal degradation analogous to that of its homologue FGD1 but regulates cell morphology and motility differently from FGD1. *Genes Cells.* 2008 Apr;13(4):329-42.
84. St Croix B, Rago C, Velculescu V, Traverso G, Romans KE, Montgomery E, et al. Genes expressed in human tumor endothelium. *Science.* 2000 Aug 18;289(5482):1197-202.
85. Mitin N, Rossman KL, Currin R, Anne S, Marshall TW, Bear JE, et al. The RhoGEF TEM4 Regulates Endothelial Cell Migration by Suppressing Actomyosin Contractility. *PLoS One.* 2013;8(6):e66260.
86. Dubash AD, Koetsier JL, Amargo EV, Najor NA, Harmon RM, Green KJ. The GEF Bcr activates RhoA/MAL signaling to promote keratinocyte differentiation via desmoglein-1. *J Cell Biol.* 2013 Aug 19;202(4):653-66.
87. Ngok SP, Geyer R, Liu M, Kourtidis A, Agrawal S, Wu C, et al. VEGF and Angiopoietin-1 exert opposing effects on cell junctions by regulating the Rho GEF Syx. *J Cell Biol.* 2012 Dec 24;199(7):1103-15.
88. Shi L, Fu AK, Ip NY. Multiple roles of the Rho GEF ephexin1 in synapse remodeling. *Commun Integr Biol.* 2010 Nov;3(6):622-4.
89. Kuroiwa M, Oneyama C, Nada S, Okada M. The guanine nucleotide exchange factor Arhgef5 plays crucial roles in Src-induced podosome formation. *J Cell Sci.* 2011 May 15;124(Pt 10):1726-38.
90. Mihira H, Suzuki HI, Akatsu Y, Yoshimatsu Y, Igarashi T, Miyazono K, et al. TGF-beta-induced mesenchymal transition of MS-1 endothelial cells requires Smad-dependent cooperative activation of Rho signals and MRTF-A. *J Biochem.* 2012 Feb;151(2):145-56.
91. Diviani D, Abuin L, Cotecchia S, Pansier L. Anchoring of both PKA and 14-3-3 inhibits the Rho-GEF activity of the AKAP-Lbc signaling complex. *EMBO J.* 2004 Jul 21;23(14):2811-20.
92. Miller NL, Kleinschmidt EG, Schlaepfer DD. RhoGEFs in cell motility: novel links between Rgnef and focal adhesion kinase. *Curr Mol Med.* 2014 Feb;14(2):221-34.
93. Seong MW, Park JH, Yoo HM, Yang SW, Oh KH, Ka SH, et al. c-Cbl regulates alphaPix-mediated cell migration and invasion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Dec 12;455(3-4):153-8.
94. ten Klooster JP, Jaffer ZM, Chernoff J, Hordijk PL. Targeting and activation of Rac1 are mediated by the exchange factor beta-Pix. *J Cell Biol.* 2006 Feb 27;172(5):759-69.
95. Frank SR, Hansen SH. The PIX-GIT complex: a G protein signaling cassette in control of cell shape. *Semin Cell Dev Biol.* 2008 Jun;19(3):234-44.
96. Kuo JC, Han X, Hsiao CT, Yates JR, 3rd, Waterman CM. Analysis of the myosin-II-responsive focal adhesion proteome reveals a role for beta-Pix in negative regulation of focal adhesion maturation. *Nat Cell Biol.* 2011 Apr;13(4):383-93.
97. Rooney C, White G, Nazgiewicz A, Woodcock SA, Anderson KI, Ballestrem C, et al. The Rac activator STEF (Tiam2) regulates cell migration by microtubule-mediated focal adhesion disassembly. *EMBO Rep.* 2010 Apr;11(4):292-8.

98. Welch HC. Regulation and function of P-Rex family Rac-GEFs. *Small GTPases*. 2015;6(2):49-70.
99. Ledezma-Sanchez BA, Garcia-Regalado A, Guzman-Hernandez ML, Vazquez-Prado J. Sphingosine-1-phosphate receptor S1P1 is regulated by direct interactions with P-Rex1, a Rac guanine nucleotide exchange factor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jan 22;391(4):1647-52.
100. Liu Z, Adams HC, 3rd, Whitehead IP. The rho-specific guanine nucleotide exchange factor Dbs regulates breast cancer cell migration. *J Biol Chem*. 2009 Jun 5;284(23):15771-80.
101. Schweighofer B, Testori J, Sturtzel C, Sattler S, Mayer H, Wagner O, et al. The VEGF-induced transcriptional response comprises gene clusters at the crossroad of angiogenesis and inflammation. *Thromb Haemost*. 2009 Sep;102(3):544-54.
102. Abiko H, Fujiwara S, Ohashi K, Hiataro R, Mashiko T, Sakamoto N, et al. Rho guanine nucleotide exchange factors involved in cyclic-stretch-induced reorientation of vascular endothelial cells. *J Cell Sci*. 2015 May 1;128(9):1683-95.
103. Sanematsu F, Hirashima M, Laurin M, Takii R, Nishikimi A, Kitajima K, et al. DOCK180 is a Rac activator that regulates cardiovascular development by acting downstream of CXCR4. *Circ Res*. 2010 Oct 29;107(9):1102-5.
104. Abraham S, Scarcia M, Bagshaw RD, McMahon K, Grant G, Harvey T, et al. A Rac/Cdc42 exchange factor complex promotes formation of lateral filopodia and blood vessel lumen morphogenesis. *Nat Commun*. 2015;6:7286.
105. Schaker K, Bartsch S, Patry C, Stoll SJ, Hillebrands JL, Wieland T, et al. The bipartite rac1 Guanine nucleotide exchange factor engulfment and cell motility 1/dedicator of cytokinesis 180 (elmo1/dock180) protects endothelial cells from apoptosis in blood vessel development. *J Biol Chem*. 2015 Mar 6;290(10):6408-18.
106. Del Galdo S, Vettel C, Heringdorf DM, Wieland T. The activation of RhoC in vascular endothelial cells is required for the S1P receptor type 2-induced inhibition of angiogenesis. *Cell Signal*. 2013 Dec;25(12):2478-84.
107. Singleton PA, Dudek SM, Chiang ET, Garcia JG. Regulation of sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cytoskeletal rearrangement and barrier enhancement by S1P1 receptor, PI3 kinase, Tiam1/Rac1, and alpha-actinin. *FASEB J*. 2005 Oct;19(12):1646-56.