



131
29
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"DETERMINACION DE MYC Y NM23 EN
CELULAS 3T3NIH TRANSFECTADAS CON EL
GEN RAS NORMAL Y MUTADO"

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

IVAN JONATHAN VAZQUEZ LUNA



MEXICO, D. F.



264832

1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente	Prof. HERNANDEZ MONTES HOMERO
Vocal	Prof. PEREZ CARDENAS ZAFERINO ENRIQUE
Secretario	Prof. FRANCO Y BOURLAND REBECA E.
1er. suplente	Prof. AGUILAR RAMIREZ MANUEL BENIGNO
2do. suplente	Prof. ADELA GIRAL BARNES

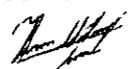
SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA
División de Investigación Básica

ASESOR DEL TEMA


BIOL. Z. ENRIQUE PEREZ CARDENAS

SUSTENTANTE


IVAN JONATHAN VAZQUEZ LUNA

A Dios

Por darme la oportunidad de vivir
y ser el faro de luz que ilumina la ruta
de mi vida.

A mi Madre

Por tu gran esfuerzo y sacrificio que me permitieron finalizar ésta meta, tu enorme apoyo en cada uno de los momentos difíciles, que por cierto, han sido demasiados; por tu gran cariño, amor y sobre todo por todos los valores y principios que me has inculcado, que son, sin duda alguna, la base de mi formación, no solo como profesionista sino como persona y gracias a ellos, he logrado construir hasta el momento una vida llena de felicidad y muchas satisfacciones, por esto y mil cosas más:

"Gracias mamá".

A mi hermana

Por que durante el transcurso de nuestras vidas y a través de todas nuestras vivencias he logrado aprender mucho de ti, gracias por tu apoyo, amistad y cariño.

A Ti

Por tu gran apoyo, cariño y comprensión, ya que siempre, en cualquier momento bueno o malo, estuviste a mi lado dándome ese impulso que me permitió seguir adelante y sobre todo por compartir conmigo tantas experiencias maravillosas.

A mi tutor: Enrique

Por tu gran apoyo, interés y dedicación para lograr culminar este proyecto. Por haberme dado la oportunidad de formar parte de tu equipo de trabajo, permitiéndome desenvolverme en el campo profesional, además de brindarme tu amistad y compartir conmigo tus conocimientos y experiencias.

A la Facultad de Química

Por ser como mi segunda casa,
ya que al abrirme sus puertas,
logre alcanzar un gran sueño.

A mis profesores:

Por compartir sus conocimientos y experiencias, además de brindarme su amistad y apoyo; logrando así, contribuir cada uno de manera muy especial en mi formación profesional y personal. De manera muy especial a los profesores Rebeca Franco y Homero Hernández

A mis amigas: Erika, Alejandra y Deyanira

Porque en todo momento me brindaron su apoyo para lograr cumplir esta meta; por todos los momentos que compartimos juntos y sobre todo por brindarme su amistad que es un gran tesoro que guardo en mi corazón.

A todos aquellos que en todo momento fueron incondicionales al proporcionarme su ayuda y apoyo en el desarrollo de éste trabajo: Cathy, Lucia, Ernesto, Francisco, Bety, Ricardo, Claudia, Jorge y Vilma.

"Gracias"

Con cariño
Juan Jonathan Vázquez Luna

INDICE

	Página
Generalidades	2
-El oncogen <i>ras</i>	
- <i>nm23</i> un probable inhibidor metastásico	
-El oncogen <i>c-myc</i>	
Antecedentes	11
Objetivos	13
-Objetivo general	
-Objetivos particulares	
Hipótesis	13
Metodología	13
-Células y cultivo celular	
-Sondas	
-Ensayos de transfección	
-Selección y aislamiento de clonas	
-Western blot	
-Tumorigenicidad y formación de tumores	
-Análisis inmunohistoquímico de Nm23 y C-Myc	
-Análisis histopatológico	
Resultados	20
Discusión	38
Conclusiones	43
Bibliografía	44

GENERALIDADES

El cáncer se considera una enfermedad multifactorial, la cual actualmente ocupa el segundo lugar de mortalidad en nuestro país. La formación de tumores puede ocurrir en cualquier parte o región del cuerpo a partir de grupos de células que proliferan en forma anormal. De ellos, los que no pueden invadir los tejidos vecinos y permanecen estrictamente localizados reciben el nombre de tumores benignos, mientras que los que se diseminan desde su lugar de origen, infiltrando tejidos vecinos y alcanzando el torrente sanguíneo, así como el sistema linfático reciben el nombre de tumores malignos o cánceres (1). La formación de estos últimos es resultado de la aparición de una población de células que poseen características únicas para la diseminación, implantación, invasión, sobrevivencia y desarrollo en otros sitios a distancia o metástasis. Estas células son, más que el tumor primario la gran amenaza del cáncer (2, 3, 4), ya que en general, el médico oncólogo es capaz de controlar y eliminar el crecimiento de un tumor primario, pero las metástasis se han considerado como la característica más importante de un tumor maligno biológicamente agresivo y constituyen la principal causa de muerte de los pacientes que padecen esta enfermedad (3).

La metástasis es un proceso complejo que involucra la invasión de células tumorales a los tejidos adyacentes, su extravasación al sistema circulatorio, pasar inadvertidas al sistema inmunológico, y la formación de colonias en otros órganos (4). A pesar de la importancia clínica de las metástasis, se tiene poca información de su mecanismo a nivel molecular, y aunque la metástasis es un proceso que ocurre *in vivo* se han sugerido para su estudio diversos modelos *in vitro* y en animales de laboratorio que simulan ese proceso (5).

El cáncer es el resultado de la disfunción de los mecanismos celulares normales que regulan la división celular (1,6). Se han propuesto diversos modelos para explicar como se origina el cáncer, y el más aceptado refiere la aparición de mutaciones que pueden sufrir diversos genes que controlan el comportamiento celular, entendiéndose por mutación aquellas alteraciones que sufre la estructura del DNA que dan lugar a variaciones permanentes en la información genética (7). En el caso del cáncer, los proto-oncogenes y los genes supresores de tumor sufren un mayor número de éstas anomalías. Los proto-oncogenes son genes normales que al mutarse dan lugar a los llamados oncogenes, los cuales controlan el desarrollo tumoral favoreciendo la división celular; mientras que los

supresores de tumor, inhiben el desarrollo de los mismos, por eso los oncogenes son considerados como los reguladores positivos del crecimiento celular, y los supresores del tumor son los reguladores negativos (2, 7). El estudio de los oncogenes y los genes supresores, no sólo ha contribuido al entendimiento de las enfermedades neoplásicas, sino que también, han servido para aclarar el mecanismo que controla el crecimiento y la diferenciación de las células normales (2, 6, 7, 8).

Algunos estudios han determinado que cuando un proto-oncogen muta, la célula se transforma, es decir, adquiere ciertas características que la hacen diferente a una célula normal (9). Entre estos cambios se encuentran: a) la modificación en la relación del tamaño núcleo-citoplasma, b) la pérdida de la inhibición por contacto, particularizándose en que las células pueden crecer unas sobre otras y no en monocapa, llegando a formar los llamados focos de crecimiento; c) la pérdida de la dependencia de anclaje, que es la capacidad de las células para crecer en agar blando y no depender de un sustrato de adherencia (9). Las células cancerosas también se caracterizan por ser inmortales, es decir, se encuentran siempre en continua división y nunca senecen, lo que no ocurre con una célula normal, la cual llega a un determinado número de divisiones y muere (9, 10).

El oncogen *ras*

Entre los oncogenes más estudiados se encuentra el gen *ras*, cuya proteína (p21) esta involucrada en la transducción de señales provenientes de receptores transmembranales y la cual pertenece a la familia de las proteínas G. La función de estas proteínas es regulada por la unión e hidrólisis del GTP (6). Este grupo de proteínas participan como interruptores fisiológicos que regulan la actividad de las enzimas blanco en respuesta a una variedad de señales. La analogía entre p21 y las proteínas G se determinó en 1984, (6) cuando un grupo de investigadores reportaron que la proteína Ras no sólo tenía la capacidad de cambiar GDP por GTP y la actividad de GTPasa (aunque muy débil), si no que también requiere la actividad de las GAP (proteínas activadoras de GTPAsas). La interacción de Ras con nucleótidos de guanina es muy similar a la subunidad alfa (α) de las proteínas G, sugiriendo así, que la actividad funcional de las proteínas Ras puede ser regulada por un ciclo de unión-hidrólisis de nucleótidos de guanina (6). (Figura 1)

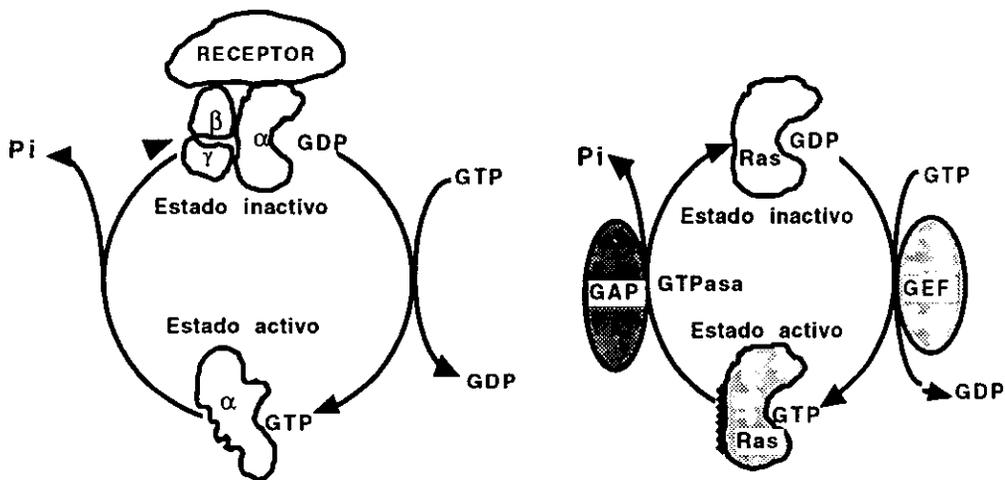


Figura 1. Comparación entre p21 Ras y las proteínas G.

Regulación de las proteínas G por unión de nucleótidos de guanina

En el estado inactivo la subunidad α se une a GDP formando un complejo con las subunidades β y γ . Cuando un ligando se une al receptor de la superficie celular se induce el cambio de GDP por GTP. La subunidad α se activa al unirse a GTP por lo que se disocia de las subunidades β y γ , así como del receptor para interactuar con su molécula blanco. El estado activo de la subunidad α concluye al llevarse a cabo la hidrólisis del GTP a GDP.

Interacción de ras con nucleótidos de guanina.

En el estado inactivo, ras está unido a GDP, el cambio de unión GDP por GTP se lleva a cabo por medio de un factor intercambiador de nucleótidos de guanina denominado (GEFs) y el paso del estado activo al inactivo (GTP a GDP), es estimulado por proteínas activadoras de GTPasa denominadas (GAPs), las cuales estimulan la hidrólisis del GTP por parte de Ras.

Los genes *ras* de mamíferos pertenecen a una familia altamente conservada en eucariotes. Los principales genes *ras* son tres y están clasificados con los términos N, H y K-*ras*. H y K fueron identificados por primera vez en retrovirus de ratón por Harvey y Kirsten, y N-*ras* fue identificado en líneas celulares de neuroblastoma humano y subsecuentemente en otras líneas celulares de diversos tumores humanos (11,12). Los tres codifican para proteínas de 21 kDa, las cuales están constituidas por 188 ó 189 aminoácidos, difiriendo en una región de 20 aminoácidos cercanos al carboxilo terminal (región heterogénea). Esas proteínas se localizan unidas al interior de la membrana plasmática donde su adhesión es facilitada por varias modificaciones post-traduccionales; incluyendo la farnesilación, metilación y palmitilación. La cisteína 186 localizada en la llamada caja CAAX la cual se encuentra cercana al carboxilo terminal (ver figura 2) (en donde C es una cisteína conservada en todas las proteínas Ras, A es un aminoácido alifático y X es cualquier aminoácido) es la primera modificada por la enzima farnesil isoprenoide transferasa (farnesilación), los tres aminoácidos siguientes son separados enzimáticamente y el carboxilo terminal de la cisteína es metilado; produciéndose una proteína más hidrofóbica con alta afinidad a la membrana (12). Esas modificaciones químicas de las proteínas Ras, junto con la palmitilación de algunas cisteínas localizadas en la región heterogénea, incrementa la afinidad de la proteína para asociarse a la membrana, lo que permite que la proteína participe en la transducción de señales del exterior celular al núcleo. El número y localización de las cisteínas en la región heterogénea son diferentes entre las proteínas p21 (N,H y K) (11, 12). (Figura 2).

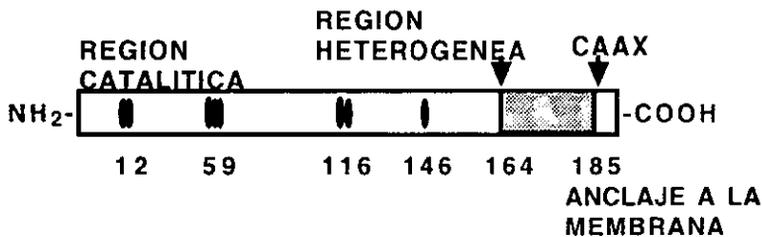


Figura 2. Regiones de la proteína p21 codificada por *ras*.

La región CAAX, donde C es una cisteína conservada en todas las proteínas Ras, A es un aminoácido alifático (no polar) y X es cualquier aminoácido. La región heterogénea (■) es una secuencia de aminoácidos que varía entre los tres genes *ras*. Sitios de mutaciones activas (●).

La actividad transformante en tumores humanos de los oncogenes *ras*, es consecuencia de mutaciones puntuales que ocurren por la sustitución de un aminoácido (6). La primera mutación descrita fue la sustitución de una glicina por una valina en la posición 12 en *H-ras*, y ha sido la mutación más utilizada para transformar células normales (6)(9). Sin embargo, subsecuentes estudios del oncogen *ras* han revelado que existen otros sitios de sustitución en posiciones críticas, que activan el potencial transformante de *ras* como es el caso de los aminoácidos 13, 59, 61,63,116,117,119 y 146 (6) (12). Dichas mutaciones ocasionan que en la proteína Ras, la actividad de hidrólisis del GTP se vea disminuida, particularmente en el caso del codón 12 mencionado anteriormente (cambiando una glicina por una valina), el cual produce un cambio en la estructura de la enzima que no permite la entrada de agua al sitio activo de la GTPasa, ocasionando que Ras permanezca más tiempo unido a GTP (forma activa). Ello favorece la capacidad transformante, ya que la señal transducida por Ras se mantiene por más tiempo. Los cambios celulares generados por la mutación de Ras incluyen: incremento en la expresión de varias hidrolasa incluyendo metalo y cistein proteinasas, así como el decremento en la expresión de sus inhibidores (Timps) (10) (13).

Como ya se menciona la función normal de Ras, está involucrada en la transducción de señales de receptores transmembranales (6) (10). Dichas señales transmitidas a través de Ras pueden mediar la diferenciación o proliferación dependiendo del tipo de célula y del receptor transmembranal. Se sabe que este proceso se inicia cuando un receptor de la membrana es estimulado por algún factor de crecimiento ocasionando que Ras pase de su forma inactiva (unido a GDP), a la activa (unido a GTP), mediante el factor GEF (factor intercambiador de nucleótidos de guanina). Posteriormente, las Ras se unen a diferentes sitios blanco denominados efectores de Ras que encienden una cascada de proteínas cinasas de serina/treonina entre las cuales se encuentran C-Mos, Raf y las Map cinasas, proteínas a través de las cuales se transmite la señal transducida por Ras al núcleo. Se ha visto que al término de esta cascada se activan algunas proteínas nucleares entre las cuales se encuentran factores de transcripción como Jun y Myc (6, 14, 15) (figura 3).

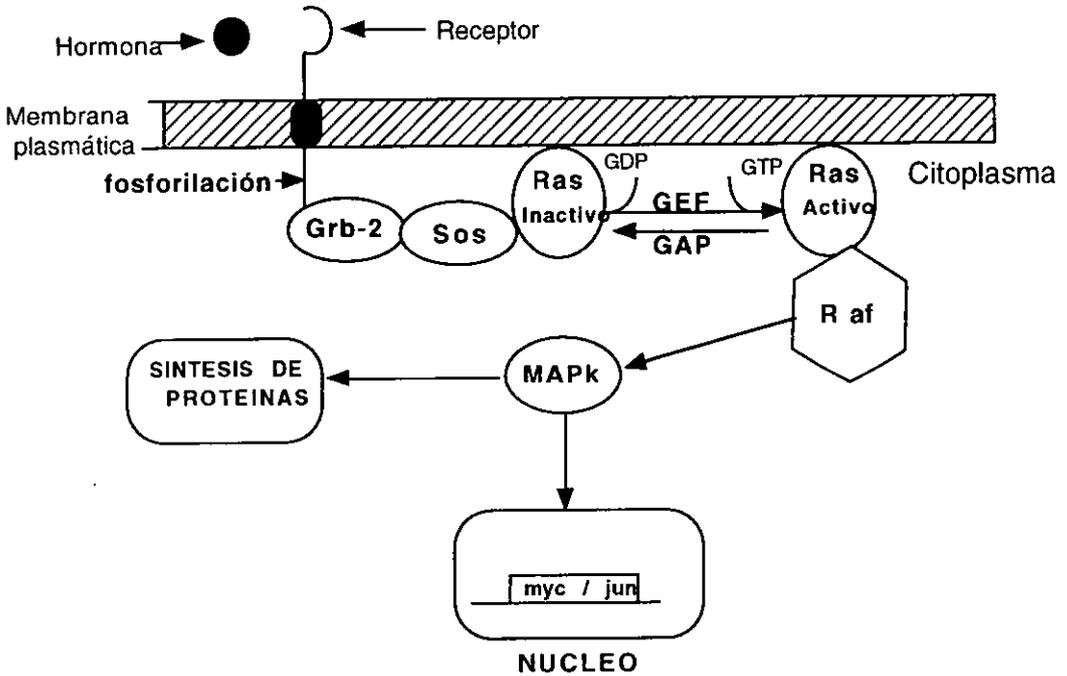


Figura 3. Cascada de señalización de Ras.

En la figura se muestra un receptor de membrana al cual se le une la hormona respectiva. Ello provoca un cambio conformacional en dicho receptor ocasionando que éste se fosforile en su parte intracelular, originando que sean reclutadas las proteínas adaptadoras GRB2 y SOS las cuales transducen la señal hacia Ras actuando como factores intercambiadoras de GTP (GEF). De ésta manera Ras pasa de su forma inactiva (unido a GDP), a su forma activa (unido a GTP). Una vez activado Ras interacciona con uno de sus efectores (RAF), lo cual genera que se activen una serie de cinasas de serina/treonina las cuales fosforilan a la proteína MAPK (proteín cinasa activada por mitógenos). La señal pasa al núcleo lo que genera que aumenten la expresión de proteínas como Myc y Jun, las cuales funcionan como factores de transcripción.

nm23 un probable inhibidor metastásico

El proceso metastásico es regulado a nivel genético por la activación o desactivación de distintos genes específicos. En particular el gen *ras* que se ha propuesto como un factor preponderante en la expresión del comportamiento metastásico de algunos tumores. Uno de los efectos de la mutación del oncogen *ras* es la disminución en la expresión de varias proteínas entre las que se ha encontrado el producto del gen denominado *nm23* (10). Distintos reportes indican que su expresión disminuye cuando la habilidad metastásica de las células aumenta y viceversa (16, 17).

El gen *nm23* fue originalmente identificado en la línea celular de melanoma de ratón K-1735, la cual es altamente metastásica, encontrándose que la expresión de este gen estaba disminuida en estas células en comparación con líneas celulares de melanoma de bajo potencial metastásico (18). La familia de *nm23* agrupa dos genes : *nm23-H1* y *nm23-H2*, ambos localizados en el cromosoma 17q21. Codifican para proteínas de 17 kDa con 80 - 90 % de homología entre sí (19, 20), y una homología del 100 % con la subunidad A y B, respectivamente, de la enzima nucleósido difosfato cinasa (NDPK), purificada de eritrocitos humanos (21). Dicha enzima se encarga de catalizar la transferencia de un grupo fosforil, de un nucleósido trifosfato donador a un nucleósido difosfato receptor, mediante un mecanismo conocido como ping-pong (Figura 4) (19, 21).

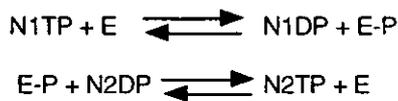


Figura 4. **Reacción de intercambio de fosfatos por parte de la NDPK.**

N1TP = Nucleósido trifosfato donador

N2DP = Nucleósido difosfato receptor

N1DP = Nucleósido trifosfato que dono
un grupo fosfato

E = Enzima NDPK libre

E-P = Enzima unida con el grupo fosfato

N2TP = Nucleósido 2 trifosfato
que recibió un grupo fosfato

Estas proteínas se encuentran altamente conservadas filogenéticamente, ya que las NDPKs purificadas de diferentes especies muestran una alta homología con la proteína Nm23, como Puf, el cual es el factor de transcripción del oncogen *myc* (22, 23, 24), así como otras proteínas no directamente relacionadas con la función de NDPK, que también muestran homología con ella como son: el factor inhibidor de la diferenciación de células de mieloma de ratón, y la proteína de neuroblastoma p19 relacionada con la proliferación celular (25, 26).

Diversos estudios han propuesto que los productos de los genes *nm23* están implicados en distintas actividades celulares: *nm23-H1*NDPK-A, puede jugar un papel importante en el potencial metastásico tumoral y NDPK-B, codificada por *nm23-H2* ha sido identificado en estudios *in vitro* como PUF, un factor de transcripción que controla la expresión del proto-oncogen *myc* (19, 20, 25). Debido a que Nm23 es una NDPK, se sugiere que puede tener una interacción directa o indirecta con proteínas dependientes de GTP, así como estar encargadas de mantener las reservas de NTPs (nucleósidos trifosfato) en la célula (27).

La relevancia potencial de *nm23* en metástasis de cánceres humanos es nueva y se investiga mediante el análisis de los niveles de su expresión en diferentes tipos tumorales. En general una correlación significativa de baja expresión de *nm23* en tumores con alto potencial metastásico se observa en tumores humanos de mama, hepatocelulares, gástricos, ovario, melanomas y carcinomas cervicales (19, 20, 28, 29). Sin embargo, en otros cánceres tales como los de pulmón, colon, próstata y riñón no se observa la misma tendencia en la expresión de *nm23* y el potencial metastásico tumoral. Estos datos sugieren que la expresión de *nm23* depende de la extirpe celular. (19, 20, 30, 31, 32, 33).

El oncogen *c-myc*

El control del crecimiento celular normal y la diferenciación involucra varias vías de señalización captada extracelularmente y transmitida hacia el núcleo. Estas señales alteran la expresión génica y pueden en algunos casos regular el crecimiento celular. Se ha observado que lesiones moleculares en estas vías pueden resultar en una proliferación incontrolada de la células (8). Muchas de estas alteraciones como ya se ha mencionado involucran a los oncogenes, y particularmente al proto-oncogen *c-myc* que juega un papel importante en el crecimiento y división normal de las células (34) (35).

El oncogen *c-myc* fue inicialmente aislado de células B de pollo (34). Posteriormente en 1983 y 1985 se identificó en células de neuroblastoma y de carcinoma de pulmón, secuencias que tenían una fuerte homología con *c-myc* las cuales fueron llamadas *n-myc* y *l-myc*, respectivamente (34).

El proto-oncogen *c-myc* humano, está localizado en el cromosoma 8 y codifica para dos proteínas de 439 y 435 aminoácidos cuyo peso molecular es de 65 y 68 kDa respectivamente; su secuencia está constituida por tres exones (figura 5) (34, 35, 36).

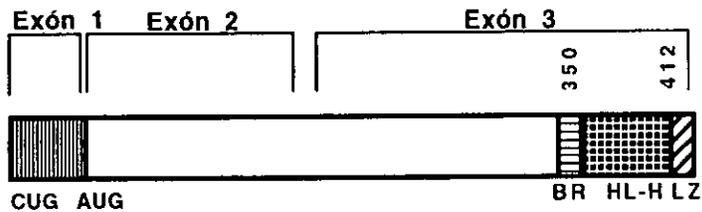


Figura 5. **Diseccción molecular de la oncoproteína c-Myc.**

CUG (sitio de iniciación sin exón), AUG (sitio de iniciación del exón 2), BR (región básica) y HLH y LZ (dominios de dimerización de la proteína).

La proteína Myc funciona como un factor de transcripción, puesto que contiene un dominio hélice-vuelta-hélice y cierre de leucina, que le permiten mediar su dimerización y su unión al DNA. Se sabe que esta unión al DNA se logra cuando Myc se une con Max, que es una proteína nuclear la cual tiene la propiedad de dimerizar con Myc, uniéndose a secuencias específicas blanco del DNA (CACGTG), que se encuentran en diversos promotores (34, 35, 37).

Los genes *myc* pertenecen a la categoría de los oncogenes immortalizadores, los cuales son capaces de transformar parcialmente a células primarias en cultivo, pero no inducen el fenotipo tumorigénico. Se sabe que tanto *c-myc*, *l-myc* y *n-myc* cooperan con el oncogen *ras* para transformar fibroblastos, ya que la expresión desregulada de *myc*, por sí solo es insuficiente para generar el fenotipo maligno en ausencia de eventos genéticos secundarios (34, 35, 36, 38, 39).

Postel, y colaboradores (1993), identificaron a *nm23-H2* como Puf, el factor de transcripción del oncogen *c-myc*. (25). el cual interacciona con la región localizada en las posiciones -142 a -115, lo cual fue corroborado por Lin ji, y SJ Berberich (1995), quienes reportaron que Puf/*nm23-H2*, funciona como regulador positivo de *c-myc* vía su interacción con esta región (40, 41).

ANTECEDENTES

El proceso tumorigénico requiere de una serie de cambios genéticos complejos que involucran la activación o inactivación de múltiples oncogenes y genes supresores de tumor, y como se mencionó anteriormente, varios estudios sugieren una probable relación entre *ras*, *myc* y *nm23*, durante el desarrollo de este proceso.

Diferentes estudios reportan que el oncogen *H-ras*, puede transformar fibroblastos de ratón e incluso llegar a desarrollar metástasis en ratones desnudos. (5) (9) (10) Sullivan (1986), Born (1994) y Taylor (1995), han demostrado que el oncogen *c-Myc* coopera con *Ras* activado para transformar fibroblastos de ratón, sugiriendo de esta manera, que *Myc* media la actividad transformante de *Ras* (42) (43) (44).

Por otra parte, *Nm23* parece estar involucrada en el proceso tumorigénico ya que, diversos trabajos (10) han encontrado que su expresión en tumores humanos y en fibroblastos de ratón transformados por *H-ras*, está disminuida, proponiendo que esta proteína pueda actuar como un supresor metastásico. Bominaar (27), reporta que la *NDPK* puede estar involucrada en la transducción de señales transmembranales, ya que la actividad de *NDPK* es estimulada por receptores de la superficie produciendo *GTP* lo que lleva a la activación de proteínas *G*, semejantes como *p21-Ras*. Diversos trabajos, mencionan que *Nm23-H2* por su localización nuclear puede funcionar como factor de transcripción del oncogen *c-myc*, el cual está sumamente involucrado en el crecimiento y diferenciación celular (20, 25, 34, 45, 46).

Finalmente, parece haber una relación estrecha entre estos tres genes, ya que, en particular los oncogenes *ras* y *myc* colaboran para inducir la formación de neoplasias; proponiendo que ambos funcionan como reguladores positivos del proceso tumorigénico. Por otra parte, la expresión del gen *nm23-H1* disminuye en células con un alto potencial

metastásico, sugiriendo que éste pueda funcionar como un gen supresor de metástasis y por consiguiente comportarse como un regulador negativo en dicho proceso. Sin embargo, diversos estudios demuestran que Nm23-H2 funciona como factor de transcripción del oncogen *myc*, por lo que podría correlacionar con el proceso tumorigénico, ya que además de tener función de NDPK, Nm23 podría participar en la transducción de señales vía la activación de proteínas G (como Ras), proponiéndose así estar a favor de este proceso.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar la posible relación entre *nm23*, *myc* y el oncogen H-*ras* en células 3T3NIH transfectadas con este último y en los tumores generados por éstas.

Objetivos particulares:

- 1.- Determinar inmunohistoquímicamente la expresión de *nm23* y *myc* en las células transfectadas y en los tumores generados por éstas.
- 2.- Correlacionar la expresión de los genes *ras* y la expresión del gen *nm23* y *myc*, tanto en las células transfectadas como en los tumores generados por éstas.

HIPOTESIS

- 1.- Ya que la proteína del gen *nm23* se ha considerado como un probable supresor de metástasis y la proteína de *myc* coopera con *ras* activo en la transformación de fibroblastos, se espera que en las células transfectadas con *ras* mutado, la expresión de *Nm23* disminuya; mientras que la expresión de *Myc* aumente.
- 2.- Ambas proteínas, presentaran un comportamiento inverso en el proceso tumorigénico, es decir, *Myc* estará a favor y *Nm23* en contra de dicho proceso.

METODOLOGIA

Células y cultivo celular: Se empleó la línea celular normal 3T3NIH de fibroblastos de ratón obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC). Se cultivaron en monocapa en Medio Mínimo Esencial Dulbeco F12 (DMEM-F12, GIBCO), suplementado con 10% de suero fetal de ternera (SFB, GIBCO) y complementado con penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml. Para cosechar las células se empleó tripsina-EDTA (0.25% tripsina y 0.5 mM EDTA, Sigma Chemical Co, St. Luis, MO) deteniendo la reacción con albúmina 1% en solución salina amortiguadora de fosfatos (albúmina Fracción V, Sigma). El conteo celular se realizó empleando una cámara de Neubauer y la viabilidad se determinó con el colorante vital azul tripán.

Sondas: Para la transfección (entendiéndose por transfección, al proceso mediante el cual se introduce en el genoma de una célula una secuencia determinada de DNA, que dependiendo del contenido de su información genética, le confiere a la célula características que la hacen diferente) se emplearon 3 diferentes plásmidos:

A) plásmido *pSV2neo* (gen de resistencia a neomicina) el cual se utilizó como testigo.

B) plásmido *pECneo* el cual tiene el gen de resistencia a neomicina y el gen de H-*ras* normal.

C) plásmido *pEJneo* el cual tiene el gen de resistencia a neomicina y el gen de H-*ras* mutado en la posición 12.

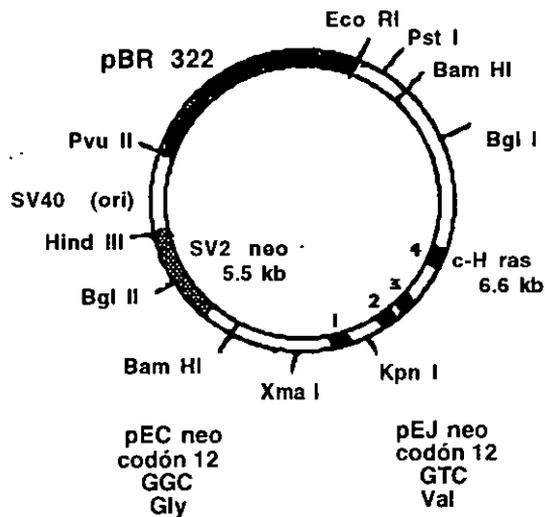


Figura 6. Esquema de la construcción del plásmido empleado para la transfección de las células.

En la figura se muestran los sitios de corte por diversas enzimas de restricción, el sitio de origen y promotor del plásmido SV40. También se esquematizan el gen de resistencia a neomicina (SV2 neo) y el gen *ras*, los cuales están adyacentes uno del otro, ambos genes se encuentran en el vector PBR322. En la parte inferior de la figura se muestran la diferencia entre el gen *ras* normal y el mutado.

Ensayos de transfección (45): La transfección de los genes se realizó mediante la técnica de electroporación: Se adicionaron 10×10^6 células en 250 μ l de solución de HEBS (NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na_2HPO_4 0.7 mM, Glucosa 6 mM, HEPES 20 mM, pH 7.05) más 10 μ g del plásmido cortado con enzimas de restricción (Bam-H1 para *pECneo* y *pEJneo*, y Eco-R1 para *SV2neo*) y 240 μ g de ADN de esperma de salmón (Sigma). Se electroporó con un pulso de 5 seg de 400 volts y 250 μ F (Bio-Rad, Gene pulser, Figura 7). Tres experimentos de transfección se realizaron en las células de 3T3 NIH: a) con la construcción *pSV2neo*; b) con *pECneo* y c) con *pEJneo*. Para seleccionar únicamente aquellas células que tuvieran en su genoma el gen *ras* normal o mutado, o el de resistencia a neomicina. Se cultivaron en medio con 800 μ g/ml del antibiótico G418 (geneticina, GIBCO), ya que las células normalmente no presentan resistencia a éste antibiótico, por lo que únicamente las transfectadas sobreviven a éste. La transfección con sólo *pSV2neo*, no sólo sirvió como testigo, sino también para comprobar que la transformación celular es debida a la transfección del gen *ras* y no al plásmido inoculado.

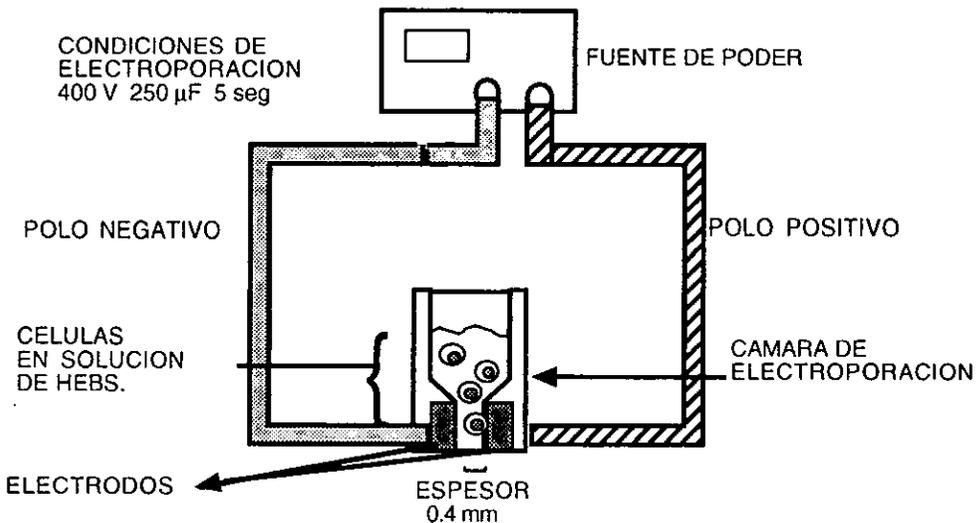


Figura 7. Esquema del equipo de electroporación empleado para realizar la transfección de las células.

Selección y aislamiento de las clonas ⁽⁴⁶⁾: De las células transfectadas, se seleccionaron diferentes clonas mediante el método de dilución. Dicho método consiste en colocar 24 células en 9.6 ml de medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal. En cajas de 96 pozos se colocaron alícuotas de 100 μ l de la dilución anterior, con el objetivo de colocar una célula por pozo. Se verificó la presencia de una sola célula mediante la observación del cultivo empleando microscopio invertido (a 40X, microscopio Olympus CK2). Las clonas obtenidas se seleccionaron nuevamente con G418 para corroborar la expresión del plásmido inoculado. A las clonas celulares se les nombró y enumeró de acuerdo al plásmido electroporado: N5 con *pSV2neo*, J3 y J20 con *ras* mutado y C4 y C10 con *ras* normal.

Western blot ⁽⁴⁷⁾: Para corroborar la expresión del gen *ras* se realizaron Western blots de las clonas N5, C4, C10, J3 y J20, las cuales fueron lisadas empleando solución amortiguadora de lisis (Tris 28 mM a pH 7.1, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, NP-40 1%, deoxicolato de Sodio al 0.5%, DTT 1 mM, PMSF 1 mM). Del lisado, se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford ⁽⁴⁸⁾. 50 μ g de proteína celular se corrieron en una gel desnaturante de poliacrilamida-DSS al 10 %, a 80 volts durante 1.5 hr. Las proteínas se transfirieron a papel PVDF (Millipore) por 2 hrs a 400 mA a 4°C. La proteína expresada con *ras* normal (p21^{ras}), se detectó con el anticuerpo monoclonal IgG1 y la proteína p21^{ras} val¹² (mutada), con el anticuerpo monoclonal pan-*ras* IgG2b (Oncogene) en una concentración de 10 μ g/ml. Por quimioluminiscencia se reveló la presencia de la proteínas en película X-Omat con el sistema ECL (Amersham). También se adicionó por goteo en la misma membrana 3 μ l y 5 μ l de péptido control para Ras normal como para Ras mutado (Oncogene) respectivamente. Dichos péptidos se emplean para verificar la funcionalidad y especificidad de cada anticuerpo empleado (Ver Figura 8).

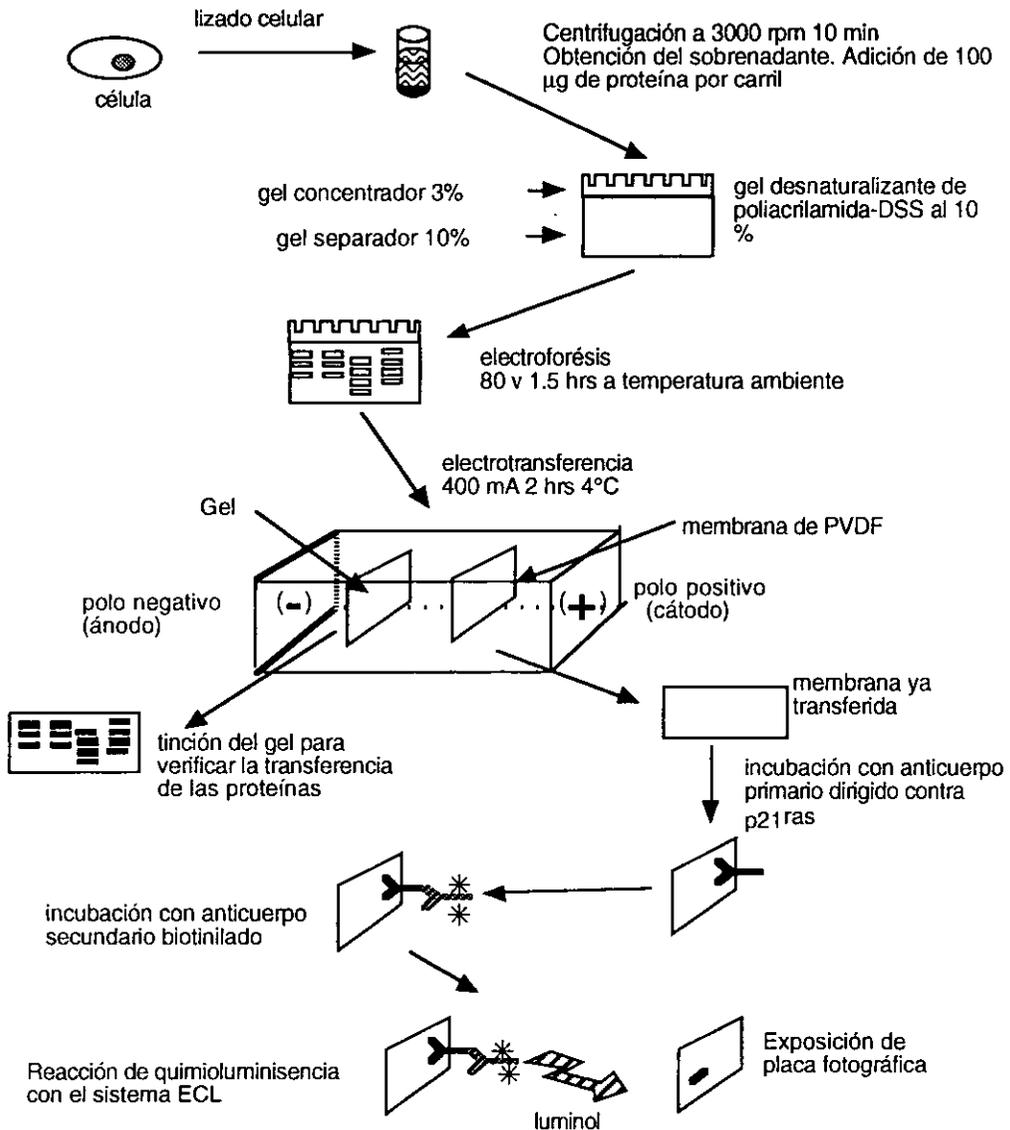


Figura 8. Esquema del procedimiento de Western blot.

El procedimiento está básicamente dividido en dos partes: A) Obtención de proteínas y separación electroforética de las mismas; B) Electrotransferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida a la membrana de PVDF y la inmuno-identificación de la proteína problema, en este caso Ras. Mediante quimioluminiscencia se evidenció la presencia de la misma mediante una placa fotográfica.

Tumorigenicidad y formación de tumores ⁽⁴⁹⁾: Se inyectaron subdérmicamente a un costado de los ratones atímicos nu/nu Balb/C, 1×10^6 células, de tal forma, que cada tres ratones fueron inyectados con una clona diferente. En otros ratones, también atímicos nu/nu, se inyectaron células silvestres, es decir, no transfectadas con ningún plásmido como grupo blanco. El volumen tumoral fue determinado de acuerdo a la siguiente fórmula: $Vt = \frac{a \times b^2 \times \pi}{6}$, donde Vt es el volumen tumoral, a es el diámetro mayor y b es el diámetro menor. Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical al presentar disfunción y cada ensayo se realizó por triplicado. La autopsia de los animales consistió del examen anatomopatológico de los pulmones, hígado, cerebro y bazo; así como del tumor desarrollado subdérmicamente. Los tumores generados se dividieron en dos partes, una de éstas se almacenó en nitrógeno líquido, y la otra se fijó en formol al 10 %, y posteriormente se incluyeron en parafina. De ambos se realizaron cortes histológicos. El tejido congelado fue empleado para el análisis inmunohistoquímico y los de parafina para su análisis histopatológico.

Identificación inmunohistoquímica de Nm23 y Myc ⁽⁵⁰⁾.

Las células trasfectadas se crecieron en cajas de cultivo con medio DMEM y SFB (suero fetal de bovino) al 10%, después se cosecharon como se indicó anteriormente en la metodología (Células y cultivo celular). 2.5×10^5 células se adicionaron sobre laminillas estériles; se incubaron de 2 a 5 días a 37°C en medio DMEM + SFB. Posteriormente, se lavaron con PBS (Solución salina amortiguadora de fosfatos) y se fijaron en acetona a -20°C . Finalmente fueron almacenadas a -70°C .

Los tejidos tumorales almacenados a -70°C se cortaron en un criotomo (Leitz) a -25°C . Los cortes de $5 \mu\text{m}$ de grosor fueron colocados en laminillas, y más tarde fijados y almacenados de igual forma que las células.

Tanto los cortes de los tejidos tumorales como las células se permeabilizaron con solución de tritón X-100 al 0.1% durante 30 min. A continuación, se bloqueó la peroxidasa endógena, incubando las muestras en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% (concentración final) en alcohol metílico durante 10 min. Después se bloqueó la unión inespecífica de los anticuerpos mediante la solución de bloqueo marca Dako. A continuación se adicionó a cada una de las muestras el anticuerpo primario dirigido contra las proteínas Nm23 y Myc (Dako y Santa Cruz, respectivamente) en una dilución de 1:50 incubándose durante 17 horas a temperatura ambiente. Cabe mencionar que el anticuerpo empleado contra Nm23 (Dako) reacciona con la proteína en el núcleo y

citoplasma. Pasado este tiempo las muestras se lavaron en PBS (Solución salina amortiguadora de fosfatos) para eliminar el anticuerpo no unido y se incubaron con el anticuerpo secundario IgG biotinilado (crecido en porcino y dirigido contra conejo, Dako) a una dilución de 1:100. La unión específica se reveló adicionando el complejo avidin-biotina con diaminobencidina, obteniendo como reacción positiva una tinción de color café en las células y en los tejidos.

Como testigo de la unión inespecífica del anticuerpo secundario, también se incubaron muestras en las mismas condiciones pero a las cuales no se les adicionó el anticuerpo primario (control negativo).

Cada ensayo se realizó por duplicado y los resultados obtenidos fueron analizados por tres diferentes observadores.

Como control de calidad de la técnica y como testigos positivo de Nm23 y Myc, se trabajaron las siguientes muestras:

a) Control de la técnica.- Se emplearon muestras (Cáncer de mama), a las cuales se les adicionó anticuerpo primario (Crecido en ratón) contra la proteína Vimentina, la cual es ubicua a todos los tejidos.

b) Control positivo de Nm23.- Se emplearon cortes de Cáncer de mama y células MCF7 de humano.

c) Control positivo de Myc.- Se utilizaron cortes de cáncer de pulmón y células HL60 humanas.

Análisis histopatológico. Se realizaron cortes histológicos de 5 μm y se tiñeron con hematoxilina-eosina. El diagnóstico y análisis morfológico fue realizado por el Dr. Ricardo Delgado del Servicio de Patología del Instituto Nacional de Cancerología.

RESULTADOS

Selección de clonas

Por el método de dilución se obtuvieron 4 clonas testigo, 17 clonas transfectadas con pSV2neo, 19 clonas transfectadas con *ras* normal y 20 clonas transfectadas con *ras* mutado. De éstas, únicamente se trabajaron cinco: **N5**, transfectada con el plásmido testigo; **C4** y **C10**, transfectadas con el gen *ras* normal; **J3** y **J20**, transfectadas con el gen *ras* mutado, y la clona **T1**, que consiste en células 3T3NIH sin transfectar, es decir, silvestres. Se escogieron las clonas transfectadas antes mencionadas porque fueron las que presentaron la mayor resistencia al antibiótico de selección (G418), y por lo tanto eran las que tenían mayores posibilidades de haber incluido en su genoma el plásmido electroporado.

Análisis morfológico de las células transfectadas y control

Al analizar la morfología de las diferentes clonas transfectadas se observó una clara diferencia entre las células que contenían *ras* normal o mutado, en comparación a las clonas testigo. Las células **T1** presentan una morfología típica de fibroblasto, es decir, en forma de uso, de orillas anguladas, manteniendo proporcional la relación núcleo citoplasma. Esta clona al cubrir toda la caja de cultivo formaba una monocapa (figura 9A). La clonas **C4**, **C10** y **N5** presentaba una morfología y comportamiento muy similar al mostrado por **T1** (figura 9B). Sin embargo, **C4** y **C10** mostraron células de un tamaño mucho mayor que las normales con núcleos muy grandes o multinucleadas (figura 9C y 9D). Con respecto a la clona **J3**, esta también presentó células en donde se perdía la relación núcleo citoplasma, particularmente células muy grandes multinucleadas, así como la formación de focos de crecimiento (figura 9E). Cabe aclarar que la formación de focos en esta clona sólo se presentaba cuando la superficie de la caja de cultivo se encontraba completamente cubierta de células. La clona **J20** fue la que presentó el cambio morfológico más marcado con respecto al resto de las clonas, ya que ésta no requería cubrir la caja de cultivo para presentar la aparición de focos. Como puede observarse en la figura 9F, esta clona genera grupos de células a manera de esteras que se intercomunican entre sí mediante líneas de células.

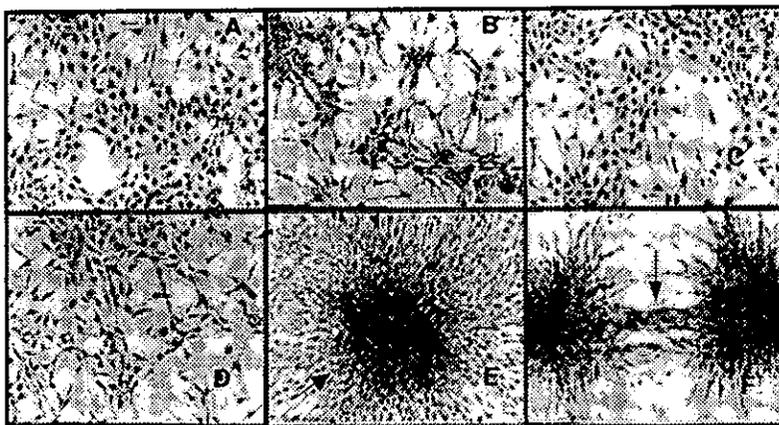


Figura 9. **Morfología de las células.**

(A) Células testigo T1; (B) Células transfectadas con el vector pSV2neo N5; (C) y (D) Células transfectadas con el vector pECneo C4 y C10, respectivamente; (E) y (F) las células trasfectadas con el plásmido pEJneo J3 y J20 respectivamente. Notese en estas últimas la formación de focos (E) y la intercomunicación entre estos mediante líneas de células (F).

Comprobación de la transfección de las células.

Para comprobar la expresión de los plásmidos transfectados en las clonas se realizó un ensayo de Western blot, para determinar la presencia de la proteína p21 de *ras* normal o mutada en la posición 12. Como puede observarse en la figura 10, las clonas **J3** y **J20**, fueron las únicas con mayor expresión de *ras* mutado. Sin embargo, al comparar la expresión de *ras* normal entre las células **C4**, con respecto a las testigo, no se observó ninguna diferencia. Cabe señalar que la clona **C10** no presento la misma expresión de *Ras* normal que **C4**, lo cual se debió a que en el carril correspondiente a la clona **C10**, no se adiciono la misma cantidad de proteína y por eso la banda se observa más tenue. Esto fue corroborado al analizar densitométricamente el gel. Sin embargo, al ajustar los valores obtenidos por densitometría se comprobó que la expresión de *Ras* es muy similar a la que presentaron las clona **C4** y **N5**.

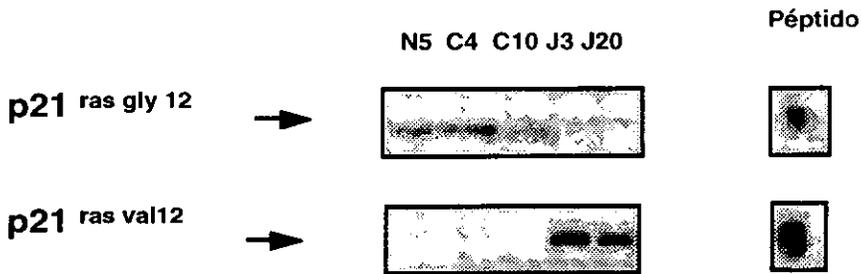


Figura 10. Western blot de los lisados celulares de cada clona.

Se adicionaron 50 μg de proteína por carril (excepto en el carril correspondiente a la clona **C10**). **J20** y **J3** clonas transfectadas con *ras* mutado, **C4** y **C10** clonas transfectadas con *ras* normal y **N5** clona transfectada con el plásmido de selección. El péptido testigo en el caso de *ras* mutado tiene la región mutada del codón 12 (cambio de glicina por una valina). Cabe señalar que la cantidad de péptido testigo para ambos casos fue diferente 3 μl para el péptido de *ras* normal y 5 μl para el péptido de *ras* mutado los cuales se encontraban a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, por lo cual la señal se ve más intensa en *ras* mutado.

Al inocular los ratones nu/nu con las diferentes clonas, se observó que los tumores generados por las células transfectadas con *ras* mutado fueron las más agresivas biológicamente, es decir, presentaron el menor tiempo de aparición, el mayor volumen tumoral y la mayor incidencia en los ratones (tabla 1 y figura 11). La figura 12, muestra que **J3** y **J20** clonas transfectadas con *ras* mutado generaron tumores en todos los ratones. De las células transfectadas con *ras* normal, **C10** generó tumor en menor tiempo que **C4** (figura 12), y se comportó de forma más agresiva que ésta última, presentado un volumen tumoral mayor, de 3.53 cm³ en comparación a 0.06 cm³ (tabla 1). La clona **N5**, también fue capaz de generar tumor, aunque sólo apareció en 1 de 3 ratones y su tamaño fue menor con respecto a los generados por el resto de las clonas (0.47 cm³).

Tabla 1.

Desarrollo tumoral en los ratones nu/nu inoculados subdérmicamente.

Clona	No de ratones con tumor.	Tiempo de aparición en días	Volumen tumoral máximo (cm ³)
N5	1/3	42	0.47
C4	1/3	96	0.06
C10	1/2	28	3.53
J3	3/3	6.0	5.00 1.19 9.18
J20	3/3	6.66	5.25 0.39 7.34

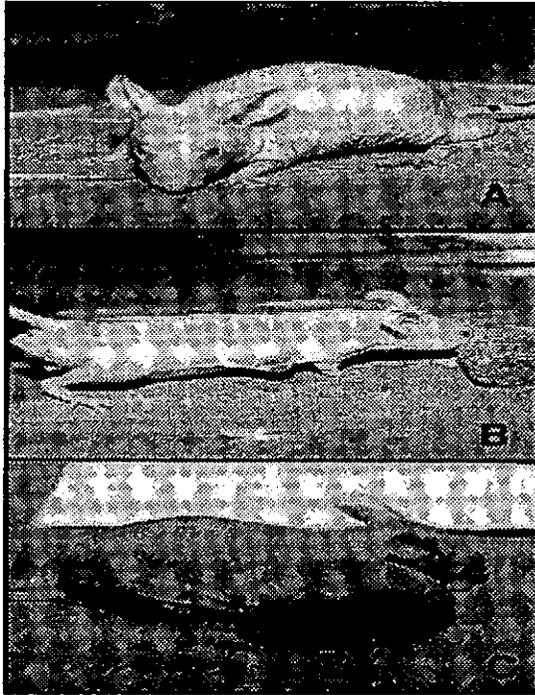


Figura 11. **Formación de tumores.**

Ejemplos del desarrollo tumoral observado en los ratones nu/nu inoculados subdermicamente con dos clonas. A) Testigo (T1), B) clona C10 y C) clona J20.

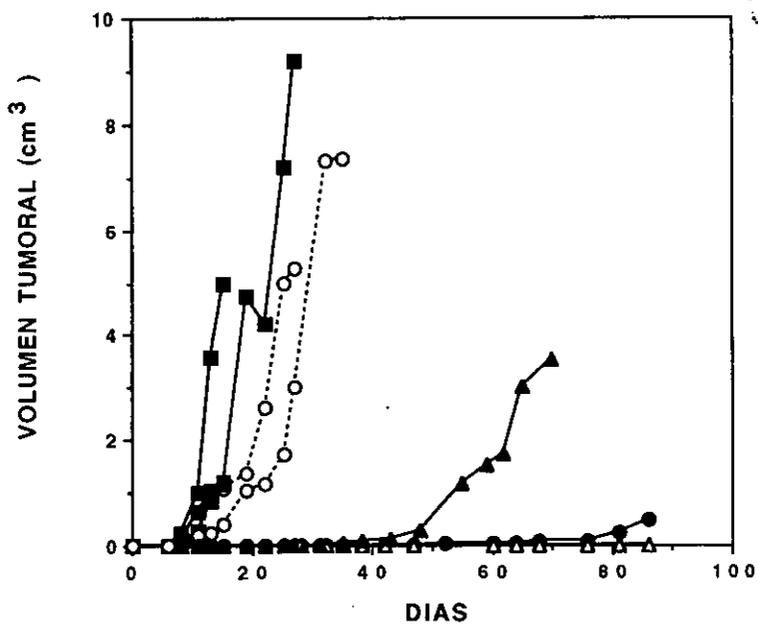


Figura 12. Curva de la determinación del volumen tumoral a lo largo del tiempo.

Cada clona fue inoculada en tres diferentes ratones: (●) clona N5, (Δ) clona C4, (▲) clona C10, (■) clona J3 y (○) clona J20 .

Identificación inmunohistoquímica de nm23 y myc en las células transfectadas y en los tumores generados por estas.

Al identificar inmunohistoquímicamente a la proteína de *nm23* en las células transfectadas *in vitro*, y comparando su expresión en los tumores generados por las mismas se pudo observar que: **N5**, presentó una expresión casi nula de la proteína Nm23 tanto en las células en cultivo como en el tumor generado (figuras 13B y 15B tabla 2); **T1**, se comportó de manera muy similar a **N5** sólo que su expresión fue un poco mayor (figura 13 A, tabla 2). Por otra parte, las clonas **C4** y **C10** presentaron *in vitro* e *in vivo* una expresión de Nm23 diferente, ya que la clona **C10** mostró un mayor número de células con una inmunotinción más intensa (Figuras 13C y D, 15C, Tabla 2). Las clonas transfectadas con *ras* mutado, **J3** y **J20**, fueron las que revelaron la mayor expresión de Nm23 con respecto al resto de las clonas, siendo ligeramente mayor en **J20** (Tabla 2 figuras 14 E y F, 16D y 16 E); cabe mencionar que en algunos casos no todas las células *in vitro*, ni todo el tejido tumoral expresaron dicha proteína. Las que lo hicieron, presentaron diferencias entre ellas, es decir, había células con una inmunotinción más intensa que en otras (Tabla 2).

En relación a la expresión de c-Myc se pudo observar que aunque la señal se identificó tanto en el núcleo como en el citoplasma, las células transfectadas con *ras* mutado **J3** y **J20** presentaron una mayor expresión de la proteína c-Myc (figura 18E y F y tabla 3) en comparación con las células transfectadas con *ras* normal (**C4** y **C10**) y la clona **N5** (figura 17 C, D, B respectivamente y la tabla 3); las células testigo **T1**, también expresaron esta proteína, tanto en el núcleo como en el citoplasma (figura 17 A, tabla 3); cabe mencionar que dicha expresión fue ligeramente menor a la encontrada en **C4**, **C10** y **N5**. En cuanto a los tumores, la proteína de c-Myc, presentó un comportamiento similar al encontrado en las células, aunque la tinción fue más heterogénea. Los tumores generados por las clonas **J3** y **J20** fueron los que presentaron mayor expresión de la proteína codificada por *myc* (figura 20 D, E, y tabla 3) siguiendo en orden decreciente el tumor generado por **C10** y **N5** (figura 19 C , B y tabla 3).

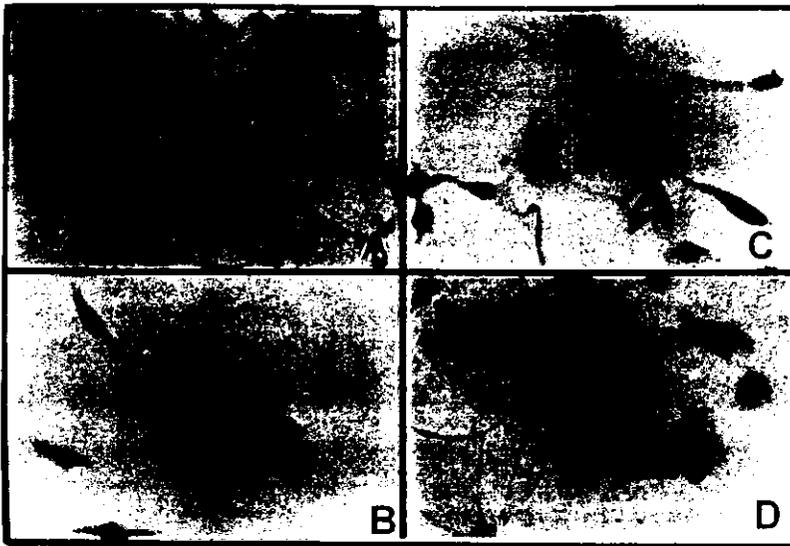


Figura 13. Análisis inmunohistoquímico de Nm23 en las clonas transfectadas con pSV2neo y ras normal *in vitro*.

A) Clona T1, B) Clona N5, C) Clona C4 y D) Clona C10. Notese la diferencia en la intensidad de la tinción citoplasmática (color café) entre las figuras C y D, que demuestra el grado de expresión de la proteína Nm23 en las células, la cual es mayor en la clona C10.

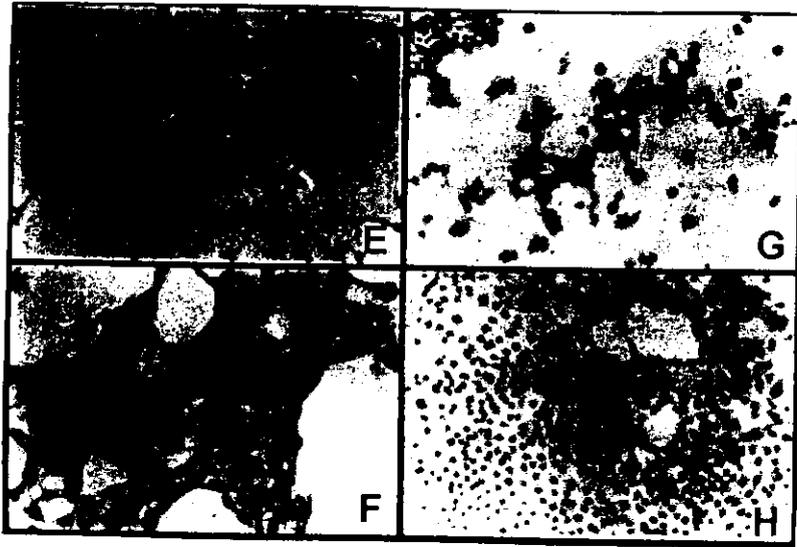


Figura 14. Identificación inmunohistoquímica de Nm23 en las clonas transfectadas con *ras* mutado y células control *in vitro*.

E) Clona J3, F) clona J20, G) células MCF7 (control positivo para Nm23) y H) clona J20 control negativo. Las figuras F y H son la misma clona, observese la diferencia entre una tinción positiva (Color café-anaranjado) y una negativa, además en E y F se puede apreciar una tinción nuclear (núcleos de color café).

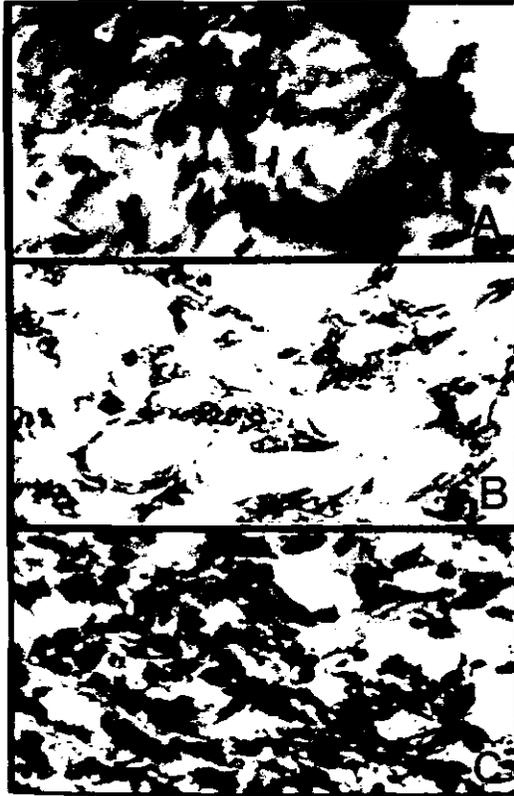


Figura 15. Identificación Inmunohistoquímica de Nm23 en los tejidos tumorales generados por las clonas transfectadas con pSV2neo y ras normal.

A) Tejido de Cáncer de mama (control positivo para Nm23), B) tumor generado por la clona N5, C) tumor generado por la clona C10. Observese en C, la diferencia en la intensidad de la tinción (color café-anaranjado) entre las células del tejido tumoral, es decir como la expresión de Nm23 varío en el mismo tejido. Compare la homogeneidad en la tinción entre A y C.

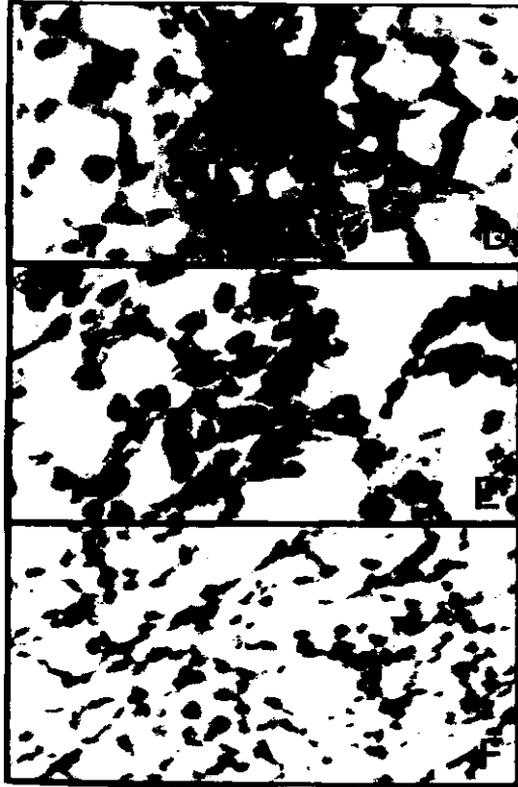


Figura 16. Identificación Inmunohistoquímica de Nm23 en los tejidos tumorales generados por las clonas transfectadas con *ras* mutado.

D) Tumor generado por la clona J3, E) Tumor generado por la clona J20 y F) Tumor generado por la clona J20 (control negativo de la técnica). Nótese en D como a pesar de la intensidad de la tinción hay zonas del tejido que presentan una intensidad de tinción más bajas, además, observe la gran cantidad de núcleos teñidos en D y E.

Tabla 2. Análisis de la inmunotinción realizada para *nm23* en las clonas y en los tejidos tumorales.

CLONA	INTENSIDAD DE LA TINCION	PORCENTAJE DE CELULAS QUE MUESTRAN LA TINCION	OBSERVACIONES
T1	+	80 %	Tinción citoplasmática homogénea
N5	+	5-10 %	Tinción citoplasmática homogénea
C4	+	5 %	Tinción citoplasmática homogénea
C10	++ ++	40 - 50 %	Tinción citoplasmática y nuclear, heterogénea
J3	++ +++	70-90 %	Tinción citoplasmática y nuclear, heterogénea
J20	++ +++	70-90 %	Tinción citoplasmática y nuclear, heterogénea

Tejidos Nm23

TUMOR	INTENSIDAD DE LA TINCION	PORCENTAJE DE CELULAS QUE MUESTRAN LA TINCION	OBSERVACIONES
N5	+	10 %	Tinción citoplasmática homogénea
C10	++ ++	80 %	Tinción citoplasmática homogénea
J3	++ +++	80 %	Tinción citoplasmática, y nuclear heterogénea
J20	++ +++	90 %	Tinción citoplasmática, y nuclear heterogénea

Intensidad de la tinción: - nula; + baja; ++ media; +++ alta

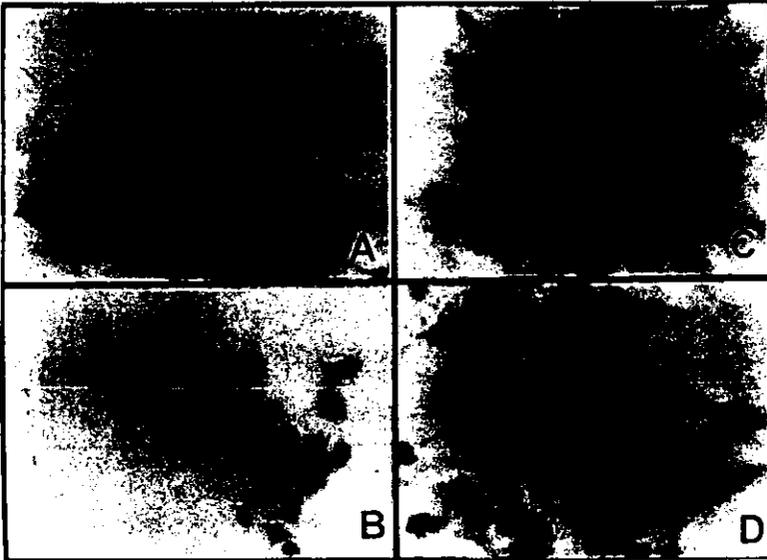


Figura 17. Identificación inmunohistoquímica de c-Myc en las clonas transfectadas con pSV2neo y ras normal *in vitro*.

A) Clona T1, B) clona N5, C) clona C4 y D) clona C10. Nótese que aunque en C y D la tinción es ligeramente mayor que en A y B (color café) la expresión de c-Myc en las clonas es muy similar, tanto citoplasmática como nuclear.

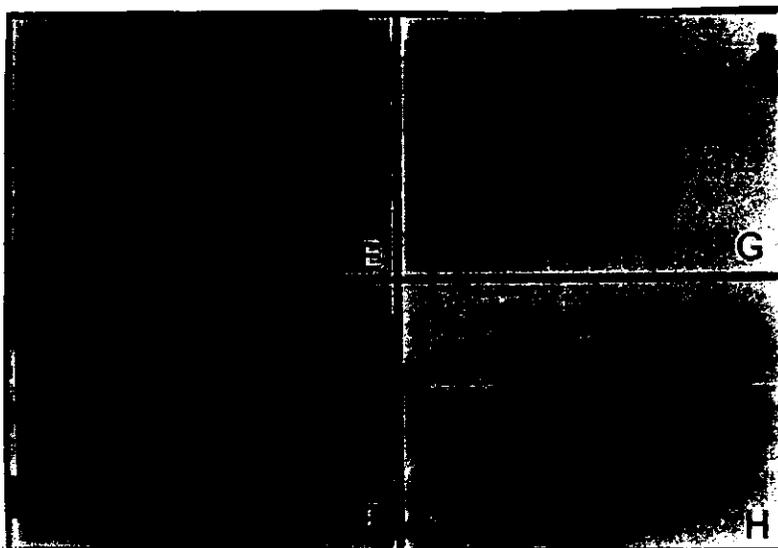


Figura 18. Identificación inmunohistoquímica de c-Myc en las clonas transfectadas con *ras* mutado y en células control mantenidas *in vitro*.

E) Clona **J3**, F) clona **J20**, G) células HL60 (control positivo para c-Myc) y H) clona **J20** control negativo. Observese la diferencia entre una tinción positiva (color café) y una negativa fig. G y H. Cabe resaltar la diferencia de la tinción entre las clonas con *ras* mutado y normal tanto nuclear como citoplasmática, la cual es mayor en las clonas **J3** y **J20** (figuras E y F). Notese también que la expresión de Myc en E y F es mayor que en las células control HL60 (G).

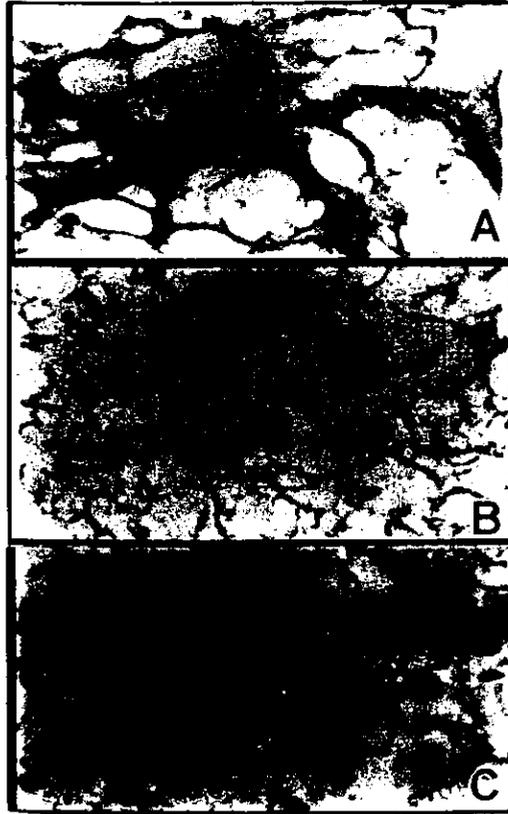


Figura 19. **Identificación Inmunohistoquímica de c-Myc en los tejidos tumorales generados por las clonas transfectadas con pSV2neo y ras normal.**

A) Tejido de Cáncer de pulmón (control positivo para c-Myc), B) tumor generado por la clona **N5**, C) tumor generado por la clona **C10**. Observese la diferencia de tinción (color café-anaranjado) entre las figuras B y C, en donde el tumor generado por **C10** presenta una expresión mayor de la proteína c-Myc. Notese también la morfología que presentan las células en un tejido tumoral humano y de ratón (A y C).

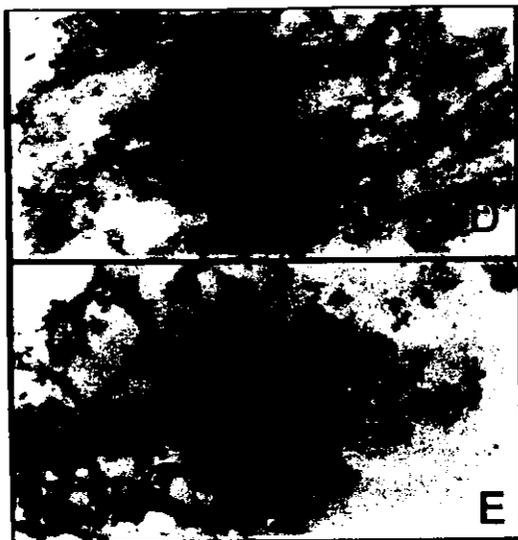


Figura 20. Análisis Inmunohistoquímico de c-Myc en los tejidos tumorales generados por las clonas transfectadas con *ras* mutado.

D) Tumor generado por la clona J3 y E) tumor generado por J20. Nótese la similitud de la tinción entre ambas figuras (color café-anaranjado), aunque en J20 (E) es más notoria. Además de que la expresión de la proteína c-Myc varía en diferentes zonas del tejido (diferencia en la intensidad de la tinción).

Tabla 3. Análisis de la inmunotinción realizada para *c-myc* en las clonas y en los tejidos tumorales.

CLONA	INTENSIDAD DE LA TINCION	PORCENTAJE DE CELULAS QUE MUESTRAN LA TINCION	OBSERVACIONES
T1	+	90 %	Tinción citoplasmática y nuclear, homogénea
N5	+ ++	10 %	Tinción citoplasmática heterogénea
C4	+ ++	60 %	Tinción citoplasmática y nuclear, heterogénea
C10	+ ++	70 %	Tinción citoplasmática y nuclear, heterogénea
J3	++ +++	95 %	Tinción citoplasmática y nuclear, heterogénea
J20	++ +++	70-90 %	Tinción citoplasmática y nuclear, heterogénea

Tejidos Myc

TUMOR	INTENSIDAD DE LA TINCION	PORCENTAJE DE CELULAS QUE MUESTRAN LA TINCION	OBSERVACIONES
N5	+	5 %	Tinción citoplasmática homogénea
C10	+ ++	80 %	Tinción citoplasmática y nuclear, heterogénea
J3	++	100 %	Tinción citoplasmática y nuclear, heterogénea
J20	++ +++	60-90 %	Tinción citoplasmática y nuclear, heterogénea

Intensidad de la tinción: - nula; + baja; ++ media; +++ alta

Características histopatológicas de los tumores generados por las células transfectadas en los ratones nu/nu.

Histopatológicamente se encontró que los todos los tumores generados fueron fibrosarcomas. Pero en el caso de los tumores formados por **N5, C4 y C10**, las células presentaban una morfología mixta, es decir, de aspecto fusiforme y epiteliode, que a diferencia de las células de los tumores desarrollados por **J3 y J20** eran únicamente fusiformes (Tabla 4). Al analizar otras características morfológicas, como es el pleomorfismo (que es la regularidad del tamaño y forma del núcleo en todas las células que constituyen el tumor) y el grado de diferenciación, estos fueron similares. Sin embargo, los tumores generados por las clonas **J3 y J20** mostraron un mayor número de células en mitosis y un mayor numero de vasos sanguíneos en neoformación (angiogénesis). Cabe mencionar que al analizar a los animales anatomopatológicamente no se observaron metástasis en ningún órgano al realizar la autopsia de los mismos.

Tabla 4. Características Histopatológicas de los tumores desarrollados en los ratones nu/nu.

Clona	Morfología celular	Pleomorfismo	Mitosis	Vascularización	Grado de diferenciación
N5	Mixta	++	+	++	++
C4	Mixta	++/+++	+	+	++
C10	Mixta	++/+++	+	+	++
J3	Fusiforme	++	++	+++	++
J20	Fusiforme	++	++	+++	++

+: bajo ++: medio +++: alto

DISCUSION

La transfección de *ras* normal o mutado generó cambios en la morfología y en el comportamiento celular. Esto se vio reflejado particularmente en las clonas **J3** y **J20**, ya que formaban focos de crecimiento y ésta es una característica de transformación puesto que se pierde la inhibición por contacto. Al comparar con las células testigo y las transformadas por *ras* normal, éstas no presentaron dicho comportamiento.

La transfección de *ras*, es un modelo ampliamente utilizado para transformar células (particularmente fibroblastos), aunque cabe señalar que la simple introducción del plásmido no es suficiente para obtener esta característica celular, ya que en nuestro modelo la clona **N5** no produjo los cambios mencionados. Al corroborar por Western blot éstos cambios en la expresión de Ras normal o mutado, se observó que las clonas **J3** y **J20** presentaron una expresión similar de la proteína p21 mutada, la cual no se observó en las otras clonas. Además, al analizar la expresión para la proteína codificada por *ras* normal en las clonas **C4**, **C10** y **N5**, ésta también fue muy similar entre ellas, aunque en el caso de la clona **C10** la expresión se ve disminuida debido a que la cantidad de proteína adicionada en el gel fue menor, lo cual fue corroborado y ajustado por análisis densitométrico. Los resultados aquí expuestos no fueron los esperados, ya que la expresión de Ras normal debió estar aumentada en las clonas transfectadas con este gen. Esto puede deberse, a que como no se inmunoprecipito la proteína p21^{gly 12}, lo cual se recomienda para dicha técnica (Dra. Lourdes Gutiérrez, comunicación personal), no se detectó la diferencia en la expresión de Ras en estas clonas. En la literatura se menciona que la proteína Ras normal presenta una vida media menor que cuando se encuentra mutada (12). Ello también podría explicar el hecho de que no hubiéramos detectado un incremento en la expresión de ésta proteína en el caso de **C4** y **C10**.

En cuanto al desarrollo tumoral, las clonas **J3** y **J20** fueron las que presentaron el comportamiento más agresivo, lo cual se vio reflejado por un menor tiempo de aparición, un mayor crecimiento tumoral, e histopatológicamente una mayor angiogénesis así como un mayor número de mitosis; siguiendo en orden decreciente de agresividad, las clonas **C10**, **N5** y **C4**. Cabe señalar, que en el caso de éstas dos últimas esperábamos

encontrar un comportamiento inverso, es decir, que **C4** fuera más agresivo que **N5**. Sin embargo, el tumor generado por **N5** apareció en un menor tiempo que el tumor generado por la clona **C4**, además de presentar un mayor volumen tumoral. Ello puede deberse a varios factores: A) en la literatura se ha visto que las células 3T3/NIH silvestres son capaces de formar tumores en ratones nu/nu, pero su capacidad tumorigénica es muy baja (5,9); B) por el método de transfección usado no es posible controlar el sitio de inserción del plásmido, por lo que no sabemos si en el caso de la clona **N5** se introdujo en un sitio del genoma celular que favoreciera la capacidad de formar tumores; C) en el caso de la clona **C4**, aunque tenga la resistencia a la genética se observó por el Western blot que no expresaba más la proteína Ras normal, lo cual nos indica que probablemente la expresión sea similar a la control. Una manera de resolver este problema sería determinando la expresión de RNAm de Ras por Northern blot.

En ninguno de los ratones inoculados con las clonas, se observó la presencia de metástasis en otros órganos. Es importante mencionar que al realizar una inoculación subdérmica como se hizo en este modelo, las células tienen que atravesar músculo y generar vasos sanguíneos (angiogénesis) para poder incorporarse posteriormente al torrente sanguíneo, donde tendrán que vencer a la respuesta inmunológica del huésped e invadir otros tejidos, por lo que las células requieren un tiempo mayor para poder adquirir un comportamiento metastásico en comparación a un tumor primario (9). Bajo nuestras condiciones experimentales los animales fueron sacrificados cuando se presentaba disfunción, como era sangrado intenso, gran necrosis en el tumor y una baja en la condición general del animal. Dada la rápida velocidad de crecimiento de los tumores en comparación a los descritos en la literatura (5) y por evitar el canibalismo entre los mismos animales, no se pudo dejar el tiempo suficiente para poder observar la presencia de metástasis en los mismos.

Respecto al análisis inmunohistoquímico de Nm23, se observó una clara tendencia a aumentar su expresión en las clonas que fueron transfectadas con *ras* mutado y los tumores generados por éstas (**J3** y **J20**). La inmunotinción presentada fue citoplasmática y nuclear en algunos casos, como se mostró en la tabla 2, sin embargo, la tinción citoplasmática fue la que predominó. Cabe señalar que el anticuerpo empleado para este ensayo, reconoce tanto a la proteína citoplasmática (Nm23-H1), como a la nuclear (Nm23-H2), por lo que se pudo observar inmunotinción en ambos

compartimentos celulares. Las clonas **T1**, **N5** y **C4** presentaron tinción homogénea pero en un muy bajo porcentaje (0-10 %). Si se compara con las clonas **C10**, **J3** y **J20**, que generaron los tumores de más rápida aparición y crecimiento, fueron los que presentaron un mayor porcentaje de Nm23 (del 50 % para **C10** y del casi 90 % para **J3** y **J20**) y una mayor heterogeneidad. Esto puede explicarse ya que Caligo demostró que la expresión de *nm23* se ve favorecida en la fase S del ciclo celular y disminuida en las otras, por lo que la expresión de Nm23 varía dependiendo de la etapa del ciclo celular en que se encuentren las células. Ha sido ampliamente demostrado, que las células transfectadas con *ras*, ya sea normal o mutado, aumentan su velocidad de crecimiento (6,9), por lo que es factible que al ser más rápida la proliferación de esas células, se encuentren zonas en el tumor en diferentes estadios de crecimiento.

En el estudio realizado en los tumores desarrollados por las diferentes clonas, se encontraron resultados muy similares a los observados en las células, es decir los tumores generados por **J3** y **J20** presentaron un mayor porcentaje de inmunotinción, tanto citoplásmica como nuclear, pero heterogénea, en comparación con los tumores generados por **N5** y **C10**. De forma similar a lo explicado con las líneas celulares, los tumores presentan diferencias en la expresión de Nm23 por su velocidad de proliferación. Los tumores generados por **J3** y **J20** demuestran una mayor proliferación celular, lo cual se demuestra por un mayor volumen tumoral a lo largo del tiempo y un mayor número de mitosis, de esta forma se generan zonas dentro del tumor en diferentes estadios y con ello una inmunotinción heterogénea, en comparación con los tumores generados por **N5** y **C10** (51).

Diversos autores proponen que *nm23* puede ser un supresor de la metástasis en ciertos modelos animales y tumores humanos (10,19,20,31 y 52), esperándose que la expresión de dicho gen no correlacionara con la expresión de Ras, ya que es un oncogen que favorece el comportamiento metastásico. Sin embargo, nuestros resultados se comportan de manera inversa, es decir, a mayor expresión de Ras mayor expresión de Nm23, sugiriendo que ambos genes pudieran estar favoreciendo un comportamiento tumoral más agresivo, lo cual coincide con los reportes de diferentes autores (19,20,30,32), donde se ha demostrado que la expresión de *nm23* está a favor del proceso tumorigénico. Pareciera ser que la contradicción de ambos reportes proponen que la supuesta supresión metastásica del gen *nm23* depende de la estirpe celular, tal y como lo propuso

Mieroff (33). El aumento en la expresión de Nm23 en las clonas que presentan **C10**, **J3** y **J20** es explicado por Bommarito en 1993 (27), cuando establece que Ras al ser una proteína G, que requiere GTP para su actividad y Nm23 tiene actividad de NDPK, ésta última proveería de GTP a Ras, por lo que al aumentar la expresión de Ras, Nm23 también aumenta. Otros reportes (54,55) proponen que al transformarse las células normales y hacerse tumorales, Nm23 se sobreexpresa como un intento de la célula de regresar a la normalidad, lo cual ocurre con otros genes supresores como p53 al mutarse (2).

Analizando los resultados inmunohistoquímicos de c-Myc tanto en las células cultivadas como en los tumores generados por éstas, el comportamiento encontrado fue muy semejante al mostrado por Nm23, es decir, que la expresión de la proteína codificada por *myc* aumenta en las células **J3** y **J20** y en sus respectivos tumores, y disminuye su expresión en las células **C10**, **C4**, **T1** y **N5**. La diferencia en la intensidad de la tinción no es tan marcada como la presentada en el análisis inmunohistoquímico de Nm23, más bien, las células transfectadas con *ras* mutado y sus respectivos tumores presentaron mayor cantidad de núcleos teñidos y mayor intensidad en la tinción. Cabe señalar que también se observó tinción citoplasmática lo cual pudo deberse a 2 cosas: 1) que el anticuerpo éste reconociendo proteína inmadura de c-Myc y/o 2) que el anticuerpo cruce con alguna proteína citoplasmática, lo cual se ha observado en previos estudios (57). Por lo que respecta a las células testigo y a las transfectadas con *ras* normal, presentaron una inmunotinción muy similar para c-Myc, por lo que la diferencia más notoria se dio en las clonas **J3** y **J20** así como en los tumores generados por éstas.

Los resultados obtenidos son similares a los reportados en la literatura (14) ya que se sabe que la expresión de c-Myc se ve favorecida en la etapa proliferativa de las células así como cuando Ras se encuentra activado, y como se mencionó anteriormente, c-Myc es uno de los productos que se genera cuando se activa la cascada a través de la cual Ras transduce su señal, además de que se ha establecido una relación entre ambos genes, puesto que en diversos estudios, Myc potencia la actividad transformante de Ras (25,54,55), sugiriendo de ésta manera que estos oncogenes correlacionan con el proceso tumorigénico. Honoki Kanya en 1993, reportó un estudio en donde se determinó la expresión de *nm23*, *myc* y *H-ras*, en metástasis pulmonares, encontrando que la expresión de *nm23* y *H-ras* (normal) aumentan en las metástasis formadas, concluyendo que ambos genes cooperan en la transducción de las señales. aunque estos autores no

encontraron diferencias en la expresión de Myc. En nuestro estudio la expresión de c-Myc en las células transfectadas con *ras* normal fue muy similar entre ellas (C4 y C10), lo cual sugiere que *myc* correlaciona con *ras* mutado al igual que *nm23* a favor del proceso tumorigénico.

Finalmente es importante remarcar que debido a las características de los anticuerpos empleados para Nm23, no se pudo establecer una correlación entre la expresión de Nm23(H2) y c-Myc, ya que dicho anticuerpo reconoce tanto a la proteína citoplásmica como a la proteína nuclear (H1 y H2). Aunque no debemos olvidar que en el análisis inmunohistoquímico de Nm23, como ya se mencionó anteriormente, la mayor tinción nuclear se observó en las células transfectadas con *ras* mutado y en los tumores generados por éstas, ocurriendo el mismo comportamiento con la expresión de c-Myc, por lo que es posible que la expresión de ambos genes éste correlacionada con el proceso tumorigénico como lo sugieren algunos autores (25,54,55 y 20).

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- 1) La transfección del gen *H-ras* normal (gly 12) y mutado (val 12) transforma tanto morfológicamente y en su comportamiento biológico a las células 3T3 NIH.
- 2) Las clonas con *ras* mutado presentan un comportamiento mas agresivo que las clonas transfectadas con *ras* normal o con el plásmido testigo (pSV2neo) lo cual se vio reflejado en que los tumores generados por esas clonas presentaron un mayor volumen tumoral, menor tiempo de aparición, mayor número de mitosis y una mayor capacidad angiogénica.
- 3) *nm23* y *myc* correlacionan con *ras* a favor del proceso tumorigénico.
- 4) No se observaron diferencias en la expresión de p21^{gly12} en las células transfectadas con *ras* normal con respecto a las células testigo. Aunque la clona **C10** presentó un comportamiento más agresivo contra ellas.
- 5) No se pudo diferenciar la participación de los dos genes de la familia de *nm23*: H1 y H2 en el comportamiento tumorigénico. Sin embargo, al observar la inmunotinción citoplasmática y la nuclear, podríamos pensar que ambos correlacionan en favor del proceso tumorigénico.

Propuesta

Finalmente, nuestro estudio da pie a determinar con mayor precisión el papel de *nm23* como supresor de metástasis en tumores humanos, ya que no solo su participación depende de la extirpe celular y del tipo de tumor, sino que también dicho gen podrá o no colaborar con el proceso tumorigénico cooperando con otros genes involucrados, particularmente oncogenes como *ras* y *myc*, los cuales tienen un papel preponderante en el desarrollo neoplásico.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Cairns J. El problema del Cáncer. **Sci Amer** 1976: 13-17.
- 2.- Sobel M. E. Metastasis Suppressor Genes. **J Natl Cancer Inst** 1990: 82 ; 267-276.
- 3.- Liotta L. Cancer Cell Invasion and Metástasis. **Sci Amer** 1992: 34-41.
- 4.- Liotta L. y Stetler-Stevenson W. **Principles of Molecular Cell Biology of Cancer: Cancer Metastasis**. DeVita V, Hellman S, Rosenberg S. Eds. (1993) **Cancer: principles and practice of oncology**. J.B. Lippincott. EUA pp 134-150.
- 5.- Bradley M, Kraynak A, Storer R, *et al.* Experimental metástasis in nude mice of NIH/3T3 cells containing various ras genes. **Proc Natl Acad Sci USA** 1986; 83: 5277-5281.
- 6.- Cooper, G. **Oncogenes**. Jones and Bartlett. EUA 1995; pp 67-80 y 145-173.
- 7.- Perkins A, Vande Woude G. **Principles of Molecular Cell Biology of Cancer; Oncogenes**. DeVita V, Hellman S, Rosenberg S. Eds. (1993) **Cancer: principles and practice of oncology**. J.B. Lippincott. EUA. pp 134-150 .
- 8.- Cantley L, Auger K, Carpenter C, *et al.* Oncogenes and signal transduction. **Cell** 1991; 64: 281-302.
- 9.- Greig R, Koestler T, Trainer D, *et al.* Tumorigenic and metastatic properties of normal and ras-transfected NIH/3T3 Cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 1985; 82: 3698-3701.
- 10.- Su Z-Z, Austin V, Zimmer S, *et al.* Defining the criticals gene expression changes associated wiyh expression and suppression of the tumorigenic and metastatic phenotype in Ha-ras-transformed cloned rat embryo fibroblast cell. **Oncogene** 1993; 8: 1211-1219.
- 11.- Maher J, Baker D, Manning M, *et al.* Evidence for cell-specific differences in transformation by N-H and K ras. **Oncogene** 1995; 11: 1639-1647.
- 12.- Lowly D, and Willumsen B. Function and regulation of ras. **Annu Rev Biochem**. 1993; 62: 851-891.
- 13.- Chambers A. Ras responsive genes and tumor metastasis. **Critical Rev Oncogenesis** 1993; 4: 95-114.
- 14.- Maruta H. and Burgess A. Regulation of the ras signalling network. **BioEssays** 1994; 16: 489-496.

- 15.- Marshall C. Ras effectors. **Curr Opin Cell Biol** 1996; 8: 197-204.
- 16.- Steeg P, Bevilacqua G, Sobel M, *et al.* Identification and characterization of differentially expressed genes in tumor metastasis: The nm23 gene. **Basic Life Sci** 1991, 57: 355-361.
- 17.- Steeg P, Cohn K. and Leone A. Tumor metastasis and nm23: Current concepts. **Cancer Cells** 1991; 3: 257-262.
- 18.- Steeg P, Bevilacqua G and Kopper G. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. **J Natl Cancer Inst** 1988; 80: 200-204.
- 19.- Rosa A, Williams R. and Steeg P. nm23/nucleoside diphosphate kinase: Toward a structural and biochemical understanding of its biological functions. **BioEssays** 1995; 17: 53-62.
- 20.- Freije J, Macdonald N. and Steeg P. Differential gene expression in tumor metastasis: nm23. **Curr Top Microbiol Immunol** 1996; 213: 215-231.
- 21.- Gilles A, Presecan E, Vonicas A. *et al.* Nucleoside diphosphate kinase from human erythrocytes. **J Biol Chem** 1991; 266: 8784-8789.
- 22.- Biggs J, Hersperger E, Steeg P, *et al.* A *Drosophila* gene that is homologous to a mammalian gene associated with tumor metastasis codes for a nucleoside diphosphate kinase. **Cell** 1990; 63: 933-940.
- 23.- Muñoz Dorado, J Inove M. and Inove S. Nucleoside diphosphate kinase from *Myxococcus xanthus* **J Biol Chem** 1990; 265: 2702-2707.
- 24.- Wallet V, Mutzel R, Troil H, *et al.* *Dictyostelium* nucleoside diphosphate kinase highly homologous to nm23 and awd proteins involved in mammalian tumor metastasis and *Drosophila* development. **J Natl Cancer Inst** 1990; 82: 1199-1202.
- 25.- Postel E, Berberich S, Flint S, *et al.* Human c-myc transcription factor Puf identified as nm23-H2 nucleoside diphosphate kinase, a candidate suppressor of tumor metastasis. **Science** 1993; 261: 478-479.
- 26.- Okabe-Kado J, Kasukabe T, and Honma Y. Identity of a differentiation inhibiting factor for mouse myeloid leukemia cells with nm23/nucleoside diphosphate kinase. **Biochem Biophys Res Comm** 1992; 182: 987-994.
- 27.- Bominar A, Molijn A, Pestel M, *et al.* Activation of G proteins by receptor-stimulated nucleoside diphosphate kinase in *Dictyostelium*. **EMBO** 1993; 12: 2275-2279.
- 28.- Lascu A, Veron M, Anderson J, *et al.* NDP-K/nm23 expression in human breast cancer in relation to relapse, survival and other prognostic factors; an immunohistochemical

- study. **J Pathol** 1994; 172: 27-34.
- 29.- Koder Y, Isobe K, Masaji, *et al.* Expression of nm23-H1 RNA levels in human gastric cancer tissues. **Cancer** 1994; 73: 259-265.
- 30.- Haut M, Steeg P, Willson J, *et al.* Induction of nm23 gene expression in human colonic neoplasms and equal expression in colon tumors of high and low metastatic potential. **J Natl Cancer Inst** 1991; 83: 712-716.
- 31.- Higashiyama M, Doi O, Yokouchi, *et al.* Immunohistochemical analysis of nm23 gene product/NDP kinase expression in pulmonary adenocarcinoma: lack of prognostic value. **J Cancer** 1992; 66: 533-536.
- 32.- Firshman J, Gumerlock P, Meyers F, *et al.* Quantitation of nm23 expression in human prostate tissues. **J Urol** 1994; 152: 202-207.
- 33.- Myeroff L. and Markowitz S. Increased nm23-H1 and nm23-H2 messenger RNA expression and absence of mutation in colon carcinomas of low and high metastatic potential. **J Natl Cancer Inst** 1993; 85: 147-152.
- 34.- Marcu K, Bossone S, and Postel A. Myc function and regulation. **Annu Rev Biochem** 1992; 61: 809-860.
- 35.- Chi V. Dang. c-myc oncoprotein function. **Biochem Biophys Acta** 1991; 1072: 103-113.
- 36.-Ramsay G, Evan G, and Bishop J. The protein encoded by the human proto-oncogen c-myc. **Proc Natl Acad Sci** 1984; 81: 7742-7746.
- 37.- Amati B, and Land H. Myc-Max-Mad: a transcription factor network controlling cell cycle progression, differentiation and death. **Curr Opin Genetics Develop** 1994; 4: 102-108.
- 38.- Born T, Frost J, Schönthal A, *et al.* c-myc cooperates with activated Ras to induce the cdc2 promoter. **Mol Cell Biol** 1994; 5710-5718.
- 39.- Taylor W, Chadee D, Allis D, *et al.* Fibroblasts transformed by combinations of ras, myc and mutant p53 exhibit increased phosphorylation of histone H1 that is independent of metastatic potential. **Febs Lett** 1995; 377: 51-53.
- 40.- Lin ji, Arcinas M, and Boxer L. The transcription factor nm23-H2, binds to and activates the translocated c-myc allele in Burkitts Lymphoma. **J Biol Chem** 1995; 270: 13392-13398.
- 41.- Berberich S, and Postel E.H. Puf/nm23-H2/NDPK B transactivates a human c-myc promoter-cat gene via a functional nuclease hypersensitive element. **Oncogene** 1995; 10: 2343-2347.

- 42.- Sullivan N, Green C, Pasdar M, *et al.* Characterization and nuclear localization of the v and c-myc proteins current. **Top Microbiol Immunol** 1986; 132: 355-361.
- 43.-Stahl J, Leone A, Rosengard A, *et al.* Identification of a second human nm23 gene: nm23-H2. **Cancer Res** 1991; 51: 445-449
- 44.-Kraeft S, Traincart F, Mensnildrey S, *et al.* Nuclear localization of nucleoside diphosphate kinase type B (nm23-H2) in cultured cells. **Exp Cell Res** 1996; 227: 63-69.
- 45.- Patterson H. Approaches to proto-oncogene and tumor suppressor gene identification. **Eur J Cancer** 1992; 28: 258-263.
- 46.- Mooi W. and Peterse J. Progress in molecular biology of breast cancer. **Eur J Cancer** 1992; 28: 623-625.
- 47.- Rosengard A, Krutzch H, Shearn A, *et al.* Reduced NM23/Awd protein in tumor metastasis and aberrant *Drosophila* development. **Nature** 1989; 342: 177-180.
- 48.- Bradfor M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal Biochem** 1976; 72: 248-254.
- 49.- Bishop J. Molecular themes in oncogenesis. **Cell** 1991; 64: 235-248.
- 50.- Jaince A. Bourne. **Handbook of immunoperoxidase staining methods**. Dako Corporation USA 1983. pp 7-36.
- 51.- Caligo M, Cipollini G, Fiore L, *et al.* nm23 gene expression correlates with cell growth rate and S-phase. **Int J Cancer** 1995; 60: 837-842.
- 52.- Wang L, Patel U, Ghosh L, *et al.* Mutation in the nm23 gene is associated with metastasis in colorectal cancer. **Cancer Res** 1993; 53: 717-720.
- 53.- Born T, Frost J, Schönthal A, *et al.* C-myc cooperates with activated Ras to induce the Cd2 promoter. **Mol Cell Biol** 1994; 5710-5718.
- 54.- Coith K, Wang F, Desoto F, *et al.* Association of nm23-H1 allelic deletions with distant metastases in colorectal carcinoma. **Lancet** 1991; 338: 722-724.
- 55.- Wang L, Patel U, Ghosh L, *et al.* Mutation in the nm23 gene is associated with metastases in colorectal cancer. **Cancer Res** 1993; 53: 717-720.
- 56.- Honoki K, Tsutsumi M, Miyauch Y, *et al.* Increased espression of nucleoside diphosphate kinase/nm23 and C-Ha-ras mRNA is associated with spontaneous lung metastasis in rat transplantable osteosarcomas. **Cancer Res** 1993; 53: 5038-5042.