



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"I Z T A C A L A"

ESTUDIO DEL ONCOGEN $c\text{-myc}$ EN TUMORES
DE CEREBRO HUMANO

T E S I S

QUE PARA OPTAR AL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

RENE SAUCEDA LOPEZ





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mi hermana Dora Elsa
a quien debo todo lo que soy.

A mis padres a quienes agradezco
infinitamente su apoyo para la
terminación de una etapa muy
importante de mi vida.

A mis hermanas, Manuela y Elva
Elena, a mi mejor amigo, mi
hermano H. Francisco.

A mi abuelita Francisca y mis
sobrinas, Elva Cecilia y Cecilia
Elena, con cariño.

A la memoria de mi hermano Jaime
y mi tío Armando.

A mi gran y extraordinario amigo fraternal Rodolfo (Wilox), quien sin su valiosa ayuda tanto en lo material y lo moral, este trabajo no hubiese sido terminado. Para él, mis más sinceros deseos en la realización de su vida.

A mis amigos Francisco J. León O., Eduardo Madrigal E., Pedro L. León O. y Mauricio Salcedo V. por su valioso apoyo en los buenos y malos momentos que pasamos juntos. Gracias por su extraordinaria y duradera amistad.

A la memoria de aquellas
personas que no han podido
ser salvadas del cáncer por
la ciencia.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Patricio Gariglio, por su asesoría y apoyo para la realización del presente trabajo.

Al Dr. H. Hugo Figueroa del I.N.N.N., quien sin su atinada colaboración, no se hubiera realizado este trabajo.

A mis primos Miguel A. Bojórquez e Iriné Bojórquez, por su apoyo y amistad.

A mis amigos de la carrera de Biología; Tzasná, Ma. de Jesús, Ena, Elisa, Rubén, German, Hector, Gerardo, David, Erwin y Cuper (Cugar).

A mis compañeros del grupo de oncogenes; Rodolfo Ocadiz, Mauricio Salcedo, Venancio Ortega y Manuel Bonilla por su ayuda y consejos.

A mis compañeros del laboratorio 24; Silvia, Edith, Paula, Ericka, Elizabeth, Luz María, Enrique, Edgar, Alejandro y muy especialmente para Lorena, Miriam, Ivonné, Roció, Consuelo, Pedro y Ulises (Ulalio).

A mis familiares y amigos por su estímulo, y su apoyo moral para seguir adelante, gracias.

A la familia Monroy, por su valiosa ayuda y amistad.

A la familia Ocadiz, especialmente al Dr. Benjamin Ocadiz (Papi).

Al I.B.Q. Abel Fuentes por sus valiosos consejos y amistad.

A la Q.F.I. Rosa M. Gutiérrez por darme la oportunidad de iniciarme en el campo de la investigación.

A la Srita. Rosa Ma. Cruces por su amistad.

A mis hermanitas "Náni y Chuy".

A mi gran amigo Huachochic por la transcripción de este trabajo.

A los sinodales de este trabajo, muchas gracias.

GRACIAS

INDICE

PAGINA

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
OBJETIVOS.....	24
MATERIAL Y METODOS.....	25
A) AMPLIFICACION DEL PLASMIDO HLM-Xba.....	25
B) AISLAMIENTO DEL PLASMIDO.....	27
C) PURIFICACION DEL PLASMIDO.....	28
D) MARCADO DEL PLASMIDO.....	31
E) HOMOGEGINIZACION DEL TEJIDO.....	32
F) ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.....	34
G) TRANSFERENCIA TIPO SOUTHERN.....	36
H) PREHIBRIDIZACION E HIBRIDIZACION.....	41
RESULTADOS.....	44
DISCUSION.....	53
CONCLUSIONES.....	56
APENDICE DE SOLUCIONES.....	58
BIBLIOGRAFIA.....	61

RESUMEN

En este trabajo se analizaron 17 tumores de cerebro humano (6 meningiomas, 4 astrocitomas, 3 adenomas, 2 glioblastomas, 1 craneofaringeoma y un meduloblastoma), proporcionados por el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, para el estudio de las posibles alteraciones del proto-oncogene celular myc (c-myc), en este tipo de cáncer. Se detectó un elevado porcentaje de alteraciones moleculares para los tumores benignos (70%) y de un 57% para los tumores malignos. El mayor grado de amplificación del gene fue de 40 veces y para el rearreglo, de tres fragmentos adicionales a los fragmentos de 13 y 12 Kpb correspondientes al tejido normal. Estos resultados sugieren un importante papel del oncogen c-myc en el desarrollo de tumores de cerebro humanos.

INTRODUCCION

El cáncer, en la actualidad, es un verdadero problema social para la humanidad, considerandose que anualmente en el mundo deben producirse unos seis millones de nuevos pacientes con esta enfermedad.

Las enfermedades neoplásicas constituyen un proceso patológico que no solo pertenece a la humanidad del presente, sino que aún desde la misma prehistoria ya existía, como ha podido ser observado en momias procedentes de 1,500 a 3,000 años A.C. mediante métodos radiológicos, que han mostrado signos de lesiones provocadas por tumores malignos en los huesos (1). También se tienen tratados sobre el cáncer desde los tiempos de Hipócrates (470-380 A.C.), registros de Celso, Galeno, Rhazes de Bassora, Andres Vessalio, entre muchos otros.

En cuanto a los conocimientos teóricos y morfológicos sobre el cáncer, el mayor progreso ha sido el descubrimiento de la especificidad celular cuando Virchow demuestra que todo cáncer está constituido por células que a su vez provienen de unidades celulares específicas iguales. Con esto se pudo establecer una clasificación de los cánceres en el siglo XIX, y para 1911 en Dinamarca, J. Fibiger logra la producción experimental sistemática de un cáncer de estómago en una rata al inocularla con Spiroptera neoplasticum.

El primer cáncer experimental por sustancias químicas fue obtenido en Japón, en 1915, por Yamagiwa e Itchikawa, los cuales desarrollaron cáncer de piel en conejos, por medio de

aplicaciones de alquitrán de hulla. Desde entonces, tanto en el campo experimental como en el terapéutico los trabajos se han multiplicado (1).

Una neoplasia (tumor), en el sentido bio-clínico, es una neoformación tisular originada a expensas de un grupo celular localizado en un área determinada de tejido, producto de un aumento absoluto de las células por una multiplicación progresiva y aparentemente autónoma del control de limitación del crecimiento del tejido (1).

Las propiedades biológicas que parecen ser características del cáncer, no solo están relacionadas con la información inherente al contenido de las células, sino también a factores medio-ambientales.

La incidencia de cáncer en la población humana varía marcadamente en relación a la clase social, medio de vida y zona geográfica. En la actualidad ocupa uno de los primeros 5 lugares como causa de defunción en países desarrollados, y en los subdesarrollados este valor es mayor del 10% (2, 3). En nuestro país se ha registrado un incremento importante en el porcentaje de mortalidad, el cual en la actualidad es cerca del 5%; falleciendo uno de cada 20 mexicanos por algún tipo de neoplasia. Debido a lo anterior, las neoplasias ocupan el sexto lugar como causa de la mortalidad en México (3).

En estudios realizados en el Noroeste de México, se encontró que el carcinoma cervicouterino ocupa el primer lugar, entre 1,760 casos de pacientes con cáncer, con un 34% de frecuencia seguido por el carcinoma broncogénico y el de mama con un 11% (4).

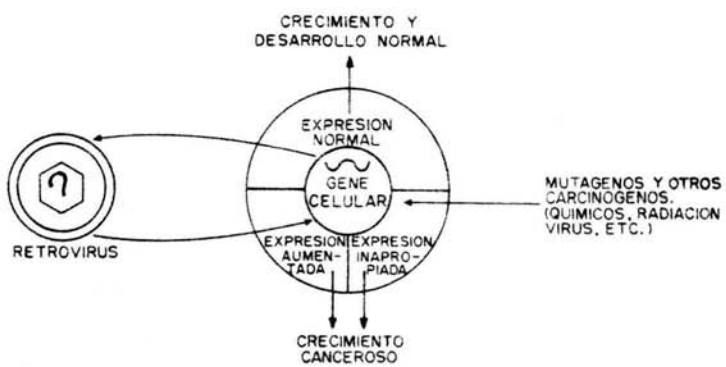
Los estudios epidemiológicos atribuyen múltiples causas a los cánceres humanos, como la exposición a sustancias químicas, a radiaciones y a virus (5, 6). Estos factores, biológicos, químicos y físicos actúan sobre el genoma celular dando una expresión celular inapropiada (Esquema 1).

Por otro lado, los progresos en el conocimiento de la Biología Molecular de los virus cancerígenos, han conducido a la identificación de genes del cáncer, cuyo funcionamiento parece ser responsable de la transformación de una célula normal en célula cancerosa.

Los descubrimientos modernos en la investigación del cáncer, parecen ofrecer una vía para el entendimiento de los procesos moleculares que desencadenan el crecimiento y multiplicación incontrolables de las células malignas (5).

Muchos de los recientes trabajos en oncología molecular son motivados por la propuesta que una célula neoplásica se desarrolla a partir de una progenitora normal como una consecuencia de cambios celulares (probablemente múltiples). Tales cambios pueden ser epigénicos; pero la creencia común sobre el cáncer es que tiene su origen en las mutaciones (7-9) y el poder persuasivo de alteraciones indefinidas en la estructura del DNA, teniendo enfocada la atención en los eventos genéticos. Los genes mutantes conocidos como oncogenes y que corresponden a alelos de diferentes tipos son llamados proto-oncogenes (genes celulares normales) (10).

Los miembros del gran grupo de proto-oncogenes han sido identificados experimentalmente por la homología de su secuencia



ESQUEMA I CONCEPTO GENE-CANCER

nucleotídica a oncogenes virales. Los genes celulares homólogos, conocidos por conveniencia como c-onc (11), son denominados proto-oncogenes porque ellos han servido aparentemente como blancos para la transducción por retrovirus y así ser los progenitores celulares normales de oncogenes virales (12-14).

En 1908 Ellerman y Bang reportaron que la sangre de pollos con leucemia contenía un agente infeccioso infiltrable capaz de causar leucosis en otros pollos (15) pero no se le dió importancia porque se creía que solo los tumores sólidos eran enfermedades cancerosas verdaderas y no fue sino hasta que R. Rous mostro en 1910-1911 que los tumores sólidos (sarcomas) en pollos son causados por virus (15). Independientemente de Rous, Fujinami e Imamoto en 1914 descubrieron un virus causante de tumores sólidos en pollos (15). Después se descubrió que estos virus oncogénicos pertenecen al grupo de virus que contienen RNA, ahora llamados retrovirus. Actualmente se sabe que no todos los virus de este grupo son oncogénicos (15).

Actualmente se conocen mas de 30 virus los cuales tienen aproximadamente 20 diferentes oncogenes (Tabla 1). También se conocen muchas proteínas oncogénicas de varios de estos virus. Con estos hallazgos, se habian relacionado los proto-oncogenes por su homología con oncogenes retrovirales (16). Sin embargo la demostración de que estos elementos genómicos pueden adquirir propiedades malignas sin la contribución de secuencias retrovirales exógenas fue primero obtenida por medio de experimentos de transferencia de genes (17). Estos ensayos revelan la presencia de genes transformantes en una fracción

Tabla 1. ONCOGENES CONOCIDOS ACTUALMENTE Y ALGUNAS CARACTERISTICAS

VIRUS	ORI.	DES. DEL ONC.	PROT.CEL.	LOC.CROM. HUMANO	LOC.PROT.
Sarcoma de Rous	Pollo	src	p60	20	Membrana Celular
Sarcoma de Felino	Gato	fes	p92	15	Membrana Celular
Sarcoma de Felino	Gato	fgr	-	6	Membrana Celular
Sarcoma de Felino	Gato	fms	p170	5	Membrana Celular
Sarcoma de Yagamuchi	Pollo	yes	p90	-	Membrana Celular
Leucemia de Abelson	Ratón	abl	p150	9	Membrana Celular
Sarcoma de Kirstein	Rata	K-ras	p21	12	Membrana Celular
Sarcoma de Harvey	Rata	H-ras	p21	11	Membrana Celular
Sarcoma de Rasheed	Rata	N-ras	p21	1	Membrana Celular
Mielocito- matósis aviar MC29	Pollo	myc	p53	8	Núcleo
Carcinoma de pulmón	Humano	L-myc	-	1	Núcleo (?)
Neuroblas- toma	Humano	N-myc	-	2	Núcleo (?)
Mielocito- matósis aviar BA1	Pollo	myb	p110	6	Núcleo
Eritroblas- tosis aviar	Pollo	erb-A	-	17	Citoplasma
Eritroblas- tosis Aviar	Pollo	erb-B	p45	7	Membrana Celular

Continua en la sig. pag.

TABLA 1. Continuación

Sarcoma de mono	Mono	sis	p56	22	Membrana Celular
Sarcoma de ratón	Ratón	mos	p37	8	Citoplasma
Osteosarcoma de ratón	Ratón	fos	p39	2	Núcleo
Sarcoma Aviar	Pollo	ski	-	1	Núcleo
Sarcoma de ratón	Ratón	raf	p90	3	Citoplasma
Mielocitomatosis aviar MH2	Pollo	mil	-	-	Citoplasma

ORI.: Origen del Oncogen Viral; DESC. DEL ONC.: Designación del Oncogen; PROT. CEL.: Proteína Celular; LOC. CROM. HUMANO: Localización Cromosómica en el Humano; LOC. PROT.: Localización de la proteína oncogénica en la célula.

significativa de cánceres humanos, así como en tumores animales
amente (18).

-oncogenes han sido altamente conservados en el
ucción; así por ejemplo, el proto-oncogene c-ras
nto en la levadura como en el hombre (19, 20), y
lo encontramos tanto en *Drosophila* como en todos
vertebrados (21); esto sugiere que los
realizan funciones cruciales en la célula.

982, estudio los niveles de actividad de diversos
c en embriones de rata tomados en diferentes
u desarrollo (Figura 1), concluyendo que
función de estos genes es necesaria en los
arios, donde no existe diferenciación (6).

is del origen común de los oncogenes es apenas
evidente que los productos de muchos oncogenes
v-fms, v-raf) no solamente poseen actividad de
que tales propiedades aparentemente juegan un
de tirosina protein-kinasa (22-24).

studios se ha podido dividir a los oncogenes en 5
un no se marcan definitivamente las diferencias.

La comprenden los oncogenes src, fps/fes, abl,
s productos de estos genes son tirosina
25, 26).

Comprende los oncogenes de la familia ras/bas:
Ki-ras, Ha-ras, N-ras y otros (27, 28). Proteínas que se unen al
GTP.

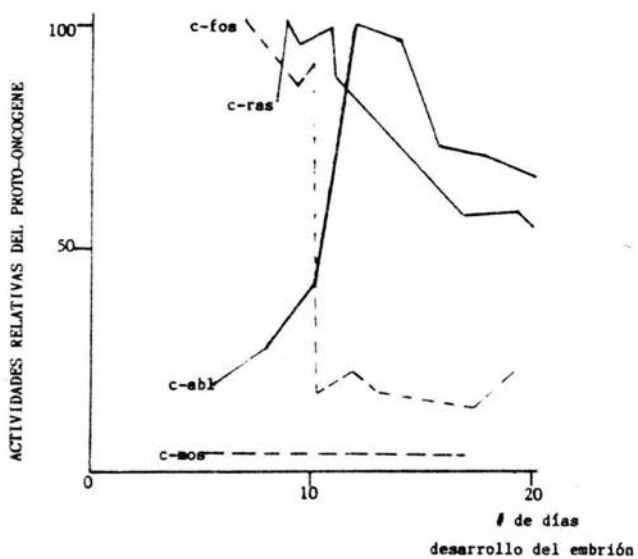


FIG. 1. ACTIVIDADES RELATIVAS DE ALGUNOS PROTO-ONCOGENES, CON RESPECTO AL DESARROLLO EMBRIONARIO EN RATA.

Familia 3. En esta están los oncogenes *myc* y *myb*, los cuales tienen productos con propiedades de enlace al DNA (Proteínas nucleares) (25).

Familia 4. Estos oncogenes, *fms*, *erb-B* y *sis* de los virus aviares AC-C13 sus productos son glicoproteínas. Probablemente estas proteínas juegan un papel muy importante en la membrana celular, y como factores de crecimiento.

Familia 5. En esta se encuentran los oncogenes B-lym que codifican para proteínas con funciones regulatorias de tipo hormonal (29).

Algunos oncogenes tienen características muy particulares, por ejemplo, *myc* es un oncogene que confiere a las células la habilidad de inmortalizarlas, entretanto ras las lleva a una transformación. El proto-oncogene *erb-B* codifica para un precursor del factor de crecimiento epidermal (EGF), ya que este factor aparentemente posee propiedades de proteína-cinasa (fosforilación de la tirosina) (Figura 2).

Recientemente se ha empezado a entender como funcionan las proteínas codificadas por algunos proto-oncogenes; estos estudios sugieren que dichas proteínas desarrollan un número limitado de funciones (29-31). Podríamos mencionar que algunas de las proteínas (*yes*, *fgr*, *abl*, *fps*, *fes* y *ros*) son tirosina-cinasas (32); otras, son factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas conocido como PDGF (29, 30).

El producto de algunos proto-oncogenes actúa en el núcleo celular, oncogenes de esta familia que se expresen en forma

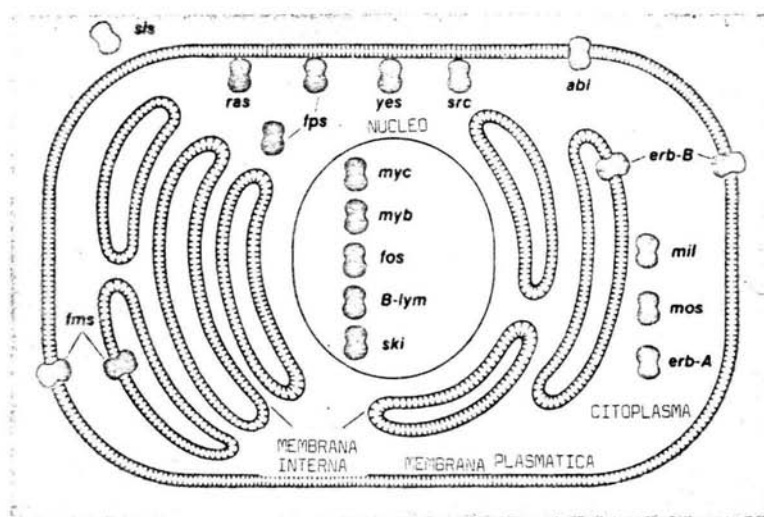


FIGURA 2. SITIOS DE ACCION DE LOS PRODUCTOS EN LAS CELULAS
DE ALGUNOS PROTO-ONCOGENES
(TOMADO DE T. HUNTER, REF. 32)

desregulada podrían alterar tal vez la transcripción de muchos genes necesarios para un crecimiento y proliferación descontrolados de las células cancerosas como para que estas lleven a cabo el temible proceso de metástasis. Lo mencionado anteriormente podría explicar el elevado número de alteraciones que presentan las células tumorales; entre estos proto-oncogenes podemos citar myc, myb, fos, mlf y ski. Se piensa que una función desregulada de myc hace de la replicación del DNA celular un proceso continuo en las células tumorales; la presencia en una célula de grandes cantidades de myc podría traer como consecuencia la inmortalidad de las células y su replicación indefinida, contrariamente a lo que sucede en células normales, las cuales tienen una capacidad de división finita. La inmortalización por sí sola no convierte necesariamente una célula normal en tumoral (Figura 3); la activación de un segundo oncogen sería un paso necesario para provocar las otras respuestas que caracterizan el estado canceroso (33), se ha descrito que ciertos pares de oncogenes (por ejemplo myc y ras, o bien el antígeno T de SV40 y ras) pueden cooperar para transformar cultivos primarios de células.

El proto-oncogene c-myc es tal vez uno de los más estudiados actualmente, no solo porque está alterado (amplificado, translocado y mutado) en diversos tipos de cáncer humano, sino por sus interesantes características en células normales. Por ejemplo, el grupo R. Watt (34) y más recientemente el grupo de D. Stehelin (14) determinó la secuencia del gen c-myc humano normal; este gene posee tres exones y dos largos intrones; tanto el

COMPLEMENTACION

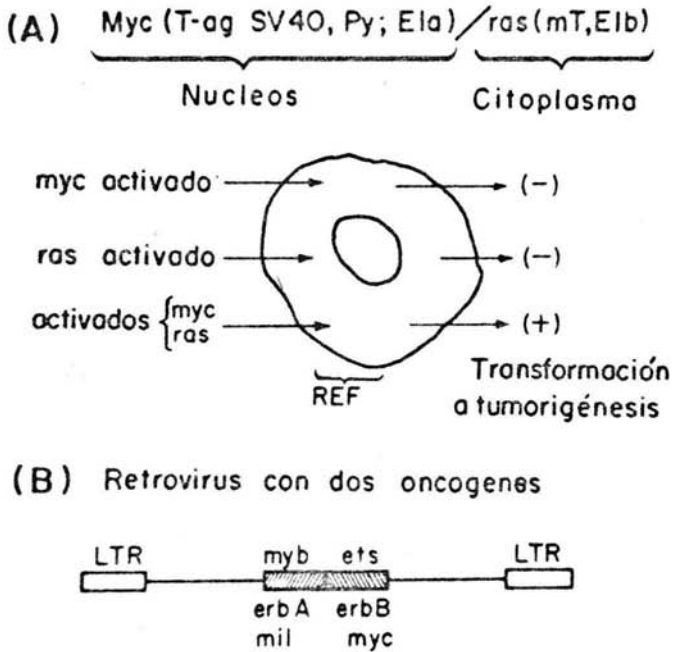


FIGURA 3. TRANSFORMACION DE UNA CELULA NORMAL EN CANCEROSA, POR LA COLABORACION DE DOS ONCOGENES. RETROVIRUS PORTANDO DOS ONCOGENES, ESTABLECIENDOSE UNA COMPLEMENTACION

primer exón como otras secuencias adicionales del lado 5' están altamente conservados entre la rata y el hombre; esta región es la más frecuentemente alterada en los linfomas de Burkitt (7). En un trabajo reciente (35), se analizó la hipersensibilidad a DNasa I del extremo 5' del gen c-myc encontrándose patrones de sensibilidad que correlacionan con el estado de actividad del gen, tanto en células normales como en tumorales (linfoma).

Por otro lado, los grupos de R. Weinberg, G. Cooper, M. Wigler y M. Barbacid, han descubierto en los últimos 5 años oncogenes en diversos tumores humanos. El DNA de tumores, al ser introducido por transfección en células normales en cultivo es capaz de transformarlas en cancerosas.

Como se activan los oncogenes?

1. Activación por medio de mutaciones puntuales.

Estudiando las líneas celulares T24, EJ, SK-N-SN, Calu-I, HL-60 y otras se encontró que los genes con actividad transformante son estructuralmente indiferenciados de los mismos genes en células normales (mapeo con enzimas de restricción). Además el nivel de expresión de estos oncogenes en tumores es aproximadamente el mismo como en las células normales; sin embargo, estos genes poseen actividad transformante, mientras sus análogos de células normales no la tienen (36, 37). Una determinación de la estructura primaria del oncogene de células normales y tumorales muestran que la diferencia está solamente en una substitución nucleotídica, como en el caso de los tumores T24

y EJ la substitución es un G por T, resultando el cambio de una valina por glicina (Tabla 2).

Recientemente, tres oncogenes ras han sido caracterizados en humanos: H-ras, K-ras y N-ras; estos genes codifican para proteínas de 189 aminoácidos. La caracterización molecular de los loci K-ras y H-ras indica que ellos han adquirido propiedades malignas a causa de una sola mutación puntual, la cual afecta la incorporación de los aminoácidos 12 y 61 de la proteína. Mutaciones en el codón 12 de K-ras alteran secuencias reconocidas por enzimas de restricción (Figura 4). Comparativamente con genes H-ras transformantes, los oncogenes K-ras han sido detectados en un número mucho más alto de neoplasias humanas (38,39).

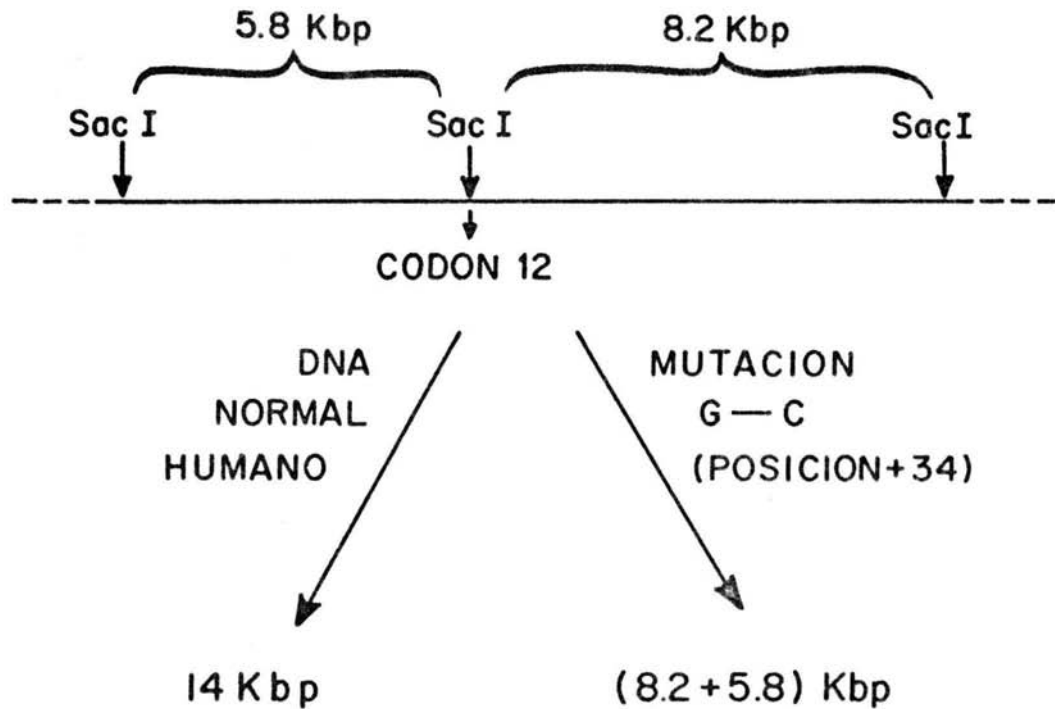
2. Activación por medio de amplificación del oncogene.

En líneas celulares HL-60 se encontró un pronunciado incremento de la expresión del gen c-myc; un aumento de la expresión del gen c-Ki-ras en líneas celulares Y1; de c-abl en líneas celulares de CML; y del gen c-myb, en un tumor del intestino grueso (38-40). Simultaneamente fue posible establecer que estos oncogenes estaban amplificados en estas líneas celulares, por ejemplo, si en una línea celular la expresión del gen c-myc esta aumentada de 30-40 veces, entonces el número de copias de este gen en la célula esta aumentado equivalentemente (Tabla 3).

Como el gen c-onc es amplificado, aún no se conoce exactamente, pero este proceso ocurre por medio de una etapa de la formación de una doble minuta (es la región del cromosoma que

TABLA 2. MUTACIONES PUNTUALES DEL ONCOGEN c-ras HUMANO

FUENTE DEL ALELO	ONCOGEN ras HUMANO	CODONES		
		12	59	61
Normal	c-H-ras1	GGC Gly	GCC Ala	CAG Gln
Línea celular de vejiga EJ/T24	c-H-ras1	GTC Val	GCC Ala	CAG Gln
Línea celular de pulmón HS242	c-H-ras1	GGC Gly	GCC Ala	CTG Leu
Normal	c-K-ras2	GGT Gly	GCA Ala	CAA Gln
Línea celular de pulmón	c-K-ras2	TGT Cys	GCA Ala	CAA Gln
Línea celular de colon SW480	c-K-ras2	GTT Val	GCA Ala	CAA Gln
Línea celular de carcinoma de pulmón LL-10	"	CGT Arg	- -	- -
Línea celular de vejiga A1698	"	CGT Arg	- -	- -
Normal	N-ras	GGT Gly	GCT Ala	CAA Gln
Línea celular de neuroblastoma SK-N	"	GGT Gly	GCT Ala	AAA Lys
Línea de carcinoma de pulmón SW1271	"	GGT Gly	GCT Ala	CGA Arg



POLIMORFISMO A Sac I EN EL GENE K-ras HUMANO

FIGURA 4. PATRON DE RESTRICCIÓN PARA LA ENZIMA SacI; AL OCURRIR UNA MUTACION PUNTUAL, ESTE PATRON CAMBIA PROVOCANDO UN POLIMORFISMO ENZIMATICO

TABLA 3. AMPLIFICACION DE ONCOGENES CELULARES HUMANOS

ONCOGENES	TUMOR O LINEA CELULAR	GRADO DE AMPLIFICACION
c-myc	Línea celular de leucemia promielocítica, HL-60 y tumor primario.	20X
c-myc	Línea celular APUDoma, COLO 320.	40X
c-myc	Líneas celulares de carcinoma de pulmón en células pequeñas.	5-30X
N-myc	Neuroblastoma primario (estadio III y IV) y líneas celulares de neuroblastoma.	5-1000X
N-myc	Línea celular de retinoblastoma, Y79 y tumores primarios.	10-200X
N-myc	Líneas celulares de carcinoma de pulmón en células pequeñas y tumor.	50X
c-abl	Línea celular de leucemia mieloide crónica, K562.	5-10X
c-myb	Líneas celulares de carcinoma de colon, COLO 201/205.	10X
c-myb	Leucemia mieloide aguda	5-10X
c-erb-B	Línea celular de carcinoma epidermoide A431.	30X
c-K-ras2	Carcinoma primario de pulmón, colon, vejiga y recto.	4-20X
N-ras	Línea de carcinoma de mama.	5-20X

carece de un centrómero) y termina con la aparición de cromosomas con zonas homogéneamente teñidas (HSR) (39). En otras palabras, las regiones del DNA amplificadas con la ayuda de los cromosomas DM y conteniendo un gene onc insertado entre uno de los cromosomas (no necesariamente el mismo cromosoma donde el oncogene se encuentra usualmente), resultando de la formación de regiones homogéneamente teñidas. La amplificación de los oncogenes en ningún caso es un evento raro y esto juega un papel muy importante en la oncogénesis natural (10, 39-42).

Recientemente se ha determinado que tanto myc como ras están amplificados (44). En estos caso el aumento en la concentración celular de los mRNA de los oncogenes no se debe probablemente a que dichos genes sean altamente transcritos sino que aumente el número de genes que pueden ser transcritos en ciertos tejidos.

3. Activación por integración de elementos genéticos móviles, cerca de un oncogen.

La expresión del gen c-mos ha sido demostrada en plasmacitoma XPC-24 de ratón. Aparentemente la activación de este gen fue debido a la integración de una partícula A, semejante a retrovirus, del lado 5' del exón del gen c-mos proviral (45).

De hecho la célula puede tener muchos elementos móviles semejjando a transposones, capaces de cambiar su posición en el genoma (45, 46).

4. Activación por rearrreglos cromosomales.

En un estudio del linfoma de Burkitt en el hombre y plasmacitoma en ratón, se encontró que estas enfermedades están caracterizadas por rearrreglos cromosomales específicos. Para el hombre esta es una translocación cromosómica (un segmento de DNA cercano a la punta de un cromosoma pasa a formar parte de otro cromosoma), entre el cromosoma 8 y el 14 (raramente al 2 ó 22) (Figura 5), mientras que en el ratón es del 15 al 11 (raramente al 6). También se encontró que en el cromosoma 8 en el hombre y 15 en el ratón tienen el gen c-myc, mientras que en los cromosomas 2, 14 y 22 (del hombre), 6 y 11 (del ratón) poseen los genes de inmunoglobulinas (47); la expresión del gen c-myc se aumenta como resultado de la translocación cromosómica, probablemente a causa de que está controlado por nuevos elementos regulatorios de la transcripción (en el cromosoma al cual se transfirió) como si fuera un gen para inmunoglobulinas, los cuales son altamente transcritos (48, 49) (Tabla 4).

En muchos casos, no se ha encontrado, aumentado el nivel de transcripción de c-myc en algunos tumores, pero aparece alterada la transcripción de RNA (50). Otros estudios muestran directamente que la parte terminal del exón 5' se pierde durante la translocación (51).

Consecuentemente, el potencial oncogénico del gen c-myc puede ser activado durante la translocación o por otros medios, como una intensificación de su transcripción o cambios en su estructura.

5. Activación por demetilación del oncogen.

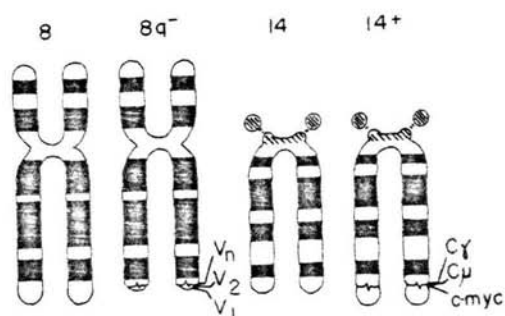


FIGURA 5. EN EL LINFOMA DE BURKITT EXISTE UNA TRANSLOCACION, ENTRE LOS CROMOSOMAS 8 Y 14, EN DONDE EL ONCOGEN *c-myc* CAMBIA DE POSICION (8:14) TRANSLOCANDOSE AL LOCUS DE LAS CADENAS PESADAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS

TABLA 4. ONCOGENES TRANSLOCADOS EN LINEAS CELULARES

LINEAS CELULARES	ONCOGEN	CROM.ORI.	CROM.TRANS.	TRANS. AL LOCUS
Plasmacitoma de ratón	c-myc	15 (D2/3)	12 (F1)	IgH
Inmunocitoma de rata	c-myc	7	6	-
Linfoma de Burkitt (Humano)	c-myc	8 (q24)	14 (q32) 2 (p13) 22 (q11)	IgH IgK Igλ
Leucemia mielogénica crónica (Humano)	c-abl	9 (q34)	22 (q11)	ber
Linfoma y células B leucemia (Humano)	bd-1	11 (q13)	14 (q32)	IgH

CROM.ORI.= Cromosoma de Origen; CROM.TRANS.= Cromosoma al que se Translocó; TRANS. AL LOCUS= Translocado al locus.

Actualmente se le esta dando también importancia al grado de metilación de los genes en la regulación de su transcripción (52). Es posible que la demetilación de los proto-oncogenes puede resultar en una activación de estos, sin embargo, los datos de este problema son pocos y solo se tienen como un medio de activación hipotética.

Como se mencionó anteriormente, es posible que más de un oncogen deba ser activado para que se desarrolle un tumor (33) (Figura 3). Este tipo de estudios ha venido a confirmar, a un nivel molecular, la evidencia clínica y los estudios en células y tejidos tumorales que postulaban que la carcinogénesis es un proceso de etapas múltiples. Esto podría explicar también el hecho de que en general un tumor tarda años en desarrollarse y que los cánceres más comunes tienen lugar en tejidos de rápida proliferación, como son: paredes intestinales, pulmón, piel y tejido cervicouterino.

Es ampliamente conocida la estrecha relación entre la incidencia de cáncer en la población humana y clase social, zona geográfica y medio de vida. El cáncer ocurre principalmente en personas de edad productiva que va de 30 a 50 años. En México las estadísticas reportan que la mortalidad por neoplasias es de un 11% (2, 53), donde el cáncer de cerebro ocupan el 2% (54).

El objetivo central del presente trabajo es el determinar las posibles alteraciones del oncogen c-myc y caracterizar su comportamiento a nivel molecular en neoplasias intracraneales humanas, ya que como se mencionó en la introducción, esta implicado en varios tipos de tumores humanos. Tratar de

establecer la posible correlación clínica entre el grado de alteración del oncogen c-myc y el tipo histológico. Así esperamos encontrar, que si el oncogene c-myc está amplificado la banda de 13 y 12 kb (EcoRI e HindIII) va a ser mas intensa que las del tejido normal. Cuando aparezcan mas bandas de las esperadas en las muestras tumorales con respecto al tejido normal entonces sera un rearrreglo que pudiera ser translocación o mutación puntual.

MATERIAL Y METODOS

La metodología utilizada en este trabajo, comprende las técnicas más empleadas en Ingeniería Genética y Biología Molecular, las cuales estan completamente desarrolladas y estandarizadas en el Laboratorio del Dr. Patricio Gariglio del CINVESTAV-IPN. También se cuenta con el plásmido HLM-Xba, el cual consta de un fragmento del gene c-myc humano que mide 3.5 kb, y que comprende el primer exón, parte del primer intrón (Fig. 6) y el plásmido pBR322 de 4.3 kb, con el cual se transformó una cepa de Escherichia coli K12 donada por el Dr. Dominique Stehelin del Instituto Pasteur de Francia. En nuestro laboratorio fue aislado, purificado y caracterizado (55) con diferentes enzimas de restricción.

La amplificación, aislamiento y purificación del plásmido HLM-Xba es como sigue:

I). Amplificación del plásmido HLM-Xba.

a) Se inocularon 25 ml de medio Luria con ampicilina a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$. Se incubó a 37°C, en agitación constante (200 rpm) durante 12 a 16 horas.

b) Con los 25 ml de cultivo anterior (a) se inoculó un matraz conteniendo 1 litro de medio de cultivo Luria con ampicilina.

Se incubó a 37°C, en agitación constante durante 2.5 horas.

c) Se agregó cloranfenicol a una concentración final de 170 $\mu\text{g/ml}$ y se incubó a 37°C, con agitación de 12 a 16 horas.

d) Se determinó el crecimiento midiendo su densidad óptica a 600 nm.

II). Aislamiento del plásmido. Lisis por alcalí.

a) El cultivo obtenido anteriormente, se centrifugó 10 min. a 7000 rpm.

b) Se desechó el sobrenadante.

c) Se resuspendió el paquete bacteriano en 20 ml de Solución I (ver Apéndice de Soluciones) y se agregó lisozima a una concentración final de 5 mg/ml. Esto es para romper la pared celular.

d) Se dejó a temperatura ambiente durante 5 min.

e) Se añadieron 40 ml de Solución II (Apéndice), recién preparada. Se mezcló gentilmente por inversión varias veces. Dejándose a 4°C durante 10 min. Con esto se rompen las células.

f) Se agregó 30 ml de solución fría de acetato de potasio (Apéndice), mezclándose por inversión y dejándose en hielo 10 min. Con esto se logró precipitar los restos celulares, menos el plásmido.

- g) Se centrifugó a 8000 rpm por 1.5 horas a 4°C.
- h) Se transfirió el sobrenadante a tubos Corex de 150 ml.
- i) Se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol y se dejaron 15 min. a temperatura ambiente. Esto es con la finalidad de precipitar el plásmido.
- j) Se centrifugó durante 30 min. a 7000 rpm a temperatura ambiente, porque las sales pueden precipitar a 4°C.
- k) El sobrenadante se desechó y se lavó con etanol 70% y se secó al vacío.
- l) Se resuspendió el plásmido en 5 ml de buffer TE (pH 8.0).

III) Purificación del plásmido.

La purificación se hizo por la técnica de gradiente isopícnico de cloruro de cesio-bromuro de etidio.

- a) Se incubó el plásmido resuspendido en buffer TE (pH 8.0), con RNasa a una concentración de 50 µg/ml, 45 min a 37°C.
- b) Se disolvió 30 g de CsCl en 35 ml de TE.
- c) Se transfirió con una jeringa estéril la solución de CsCl a un tubo de polialomero para rotor VTi 50 de la ultracentrífuga Beckman L8-55.
- d) Se transfirió el plásmido con jeringa estéril. Este paso se hizo con mucho cuidado para evitar romper el DNA.
- e) Se mezcló gentilmente por inversión, eliminando las burbujas que se hallan formado.
- f) Se añadió 6 µl de una solución de bromuro de etidio. El bromuro de etidio debe manejarse con guantes.

Se mezcló gentilmente por inversión, protegiendo los tubos de la luz, ya que el bromuro de etidio es fotosensible.

g) Se eliminaron todas las burbujas, debido a que el tubo se puede colapsar al ser centrifugado a alta velocidad. Para evitar lo anterior, se agregó al final una capa de aceite mineral.

h) El tubo se taro a un peso igual al contrapeso.

i) Una vez equilibrados, se selló por la parte superior y se volvió a tarar.

j) Se centrifugó en rotor VTi50 a 45000 rpm, en un rango de temperatura de 15 a 25°C, al vacío, durante 16 horas.

k) Después de centrifugar, se recuperaron los tubos y se observaron en un cuarto oscuro con una lámpara de U.V. de onda larga para localizar las bandas de DNA (Figura 7).

l) Se recuperaron las bandas por punción, manteniendo el bisel de la aguja hacia arriba por abajo de la banda a recuperar y se desechó el resto del tubo en un lugar especial.

m) Se agregó un volumen de alcohol isoamílico o butanol saturado con agua. Se mezcló vigorosamente. Esto se hizo con la finalidad de extraer el bromuro de etidio de la muestra.

n) Se centrifugó a 10000 rpm por 5 min.

o) Se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio.

p) Se repitió varias veces hasta que el color rosa de la fase acuosa desapareció.

q) Se dializó contra buffer TE (pH 8.0), para eliminar el CsCl, haciendo dos cambios del buffer, de 2 litros cada uno.

r) Después de 6 horas de diálisis, se le agregaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío por cada mililitro de solución, y se ajustó a 100mM de NaCl.

s) Se dejó a -70°C por 40 min o a -20°C toda la noche.

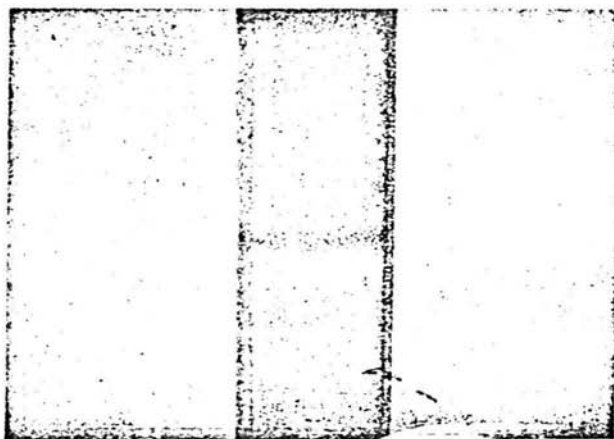


FIGURA 7. GRADIENTE ISOPICNICO DE CLORURO DE CESIO,
USADO PARA LA PURIFICACION DEL PLASMIDO
HLM-Xba

t) Se centrifugó a 10000 rpm por 30 min.

u) El sobrenadante se recuperó y se secó el precipitado al vacío.

v) Se resuspendió el paquete en un mínimo de volumen de TE (pH 8.0) (p. ej. 100-200 μ l).

w) La concentración del DNA se determinó en un espectrofotómetro (260 nm).

Sobre la caracterización del plásmido con enzimas de restricción, ver referencias 24 y 55.

Marcado del plásmido HLM-Xba

La DNA polimerasa I de E. coli, añade residuos nucleotídicos en el extremo 3' el cual es creado cuando una de las dos cadenas de la molécula de DNA es abierta. Además la enzima, por medio de su actividad exonucleasa, puede remover nucleótidos del extremo 5' de la abertura. La eliminación de nucleótidos del extremo 5' y la adición secuencial de nucleótidos al extremo 3', da como resultado el movimiento del rompimiento y la sustitución (Nick Translation) a lo largo del DNA. Reemplazando los nucleótidos preexistentes con nucleótidos altamente radiactivos, es posible preparar DNA marcado con ^{32}P con una alta actividad específica (56, 57).

A continuación se da el protocolo estandar para marcajes con ^{32}P utilizando DNA polimerasa I de E.coli:

- 1) Solución de DNA (plásmido)
- 2) Buffer de nucleótidos

3) dNTP marcado radiactivamente

4) Agua desionizada estéril

5) Solución enzimática

a) Se incubó a 15°C por 3 horas la mezcla de reacción.

b) Se paso por cromatografía a través de Sephadex G-50 para separar el DNA marcado de los nucleótidos no incorporados, y se colectaron fracciones de 1ml.

c) El DNA se excluye en el volumen vacío (aproximadamente el 30% del volumen total de la columna).

d) Se tomaron alícuotas de 1µl de cada fracción y se contó la radiactividad incorporada en un contador de centelleo líquido.

El primer pico consiste en la sonda de DNA con los nucleótidos incorporados, mientras que el segundo consiste en los nucleótidos no incorporados (Figura 8).

Por otro lado se trabajaron las muestras tumorales y tejido normal de cerebro las cuales fueron proporcionadas por el Dr. Hector H. Figueroa T. del Departamento de Genética del I.N.N.N. de la S.S. Las muestras de tejido fueron congeladas a -70°C hasta el momento de su procesamiento. A todas las muestras se les practicó un estudio histopatológico el cual fue realizado en el mismo Instituto de Neurología.

Al tejido tumoral y normal se le extrajo el DNA de acuerdo al siguiente protocolo:

1) Se homogenizó el tejido en solución de NaCl al 0.9%

2) Se lavó tres veces en solución de NaCl al 0.9%, centrifugando cada vez a 3000 rpm por 10 minutos.

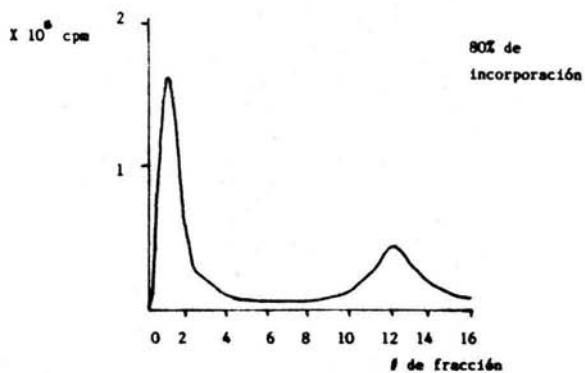


FIG. 8. DETERMINACION DE LA INCORPORACION DE δ CTP RADIOACTIVA EN EL PLASMIDO HLM-1ba, POR EL METODO DE ROMPIMIENTO Y SUSTITUCION, (NICK TRANSLATION).

3) El paquete celular se resuspendió en buffer de lisis, 0.2% de SDS y 500 $\mu\text{g/ml}$ de Proteinasa K (Ver Apéndice de Soluciones).

4) Se incubó a 37°C de 6 a 12 horas con agitación constante.

5) Se extrajo con fenol saturado con TE, 3 veces, con centrifugaciones de 10 minutos a 3000 rpm. Recuperandose siempre la fase acuosa.

6) Se extrajo una vez con fenol-cloroformo (1:0.5).

7) Extraer una vez con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1).

8) A la fase acuosa se agregó etanol absoluto frío, para precipitar el DNA celular.

9) Se incubó a -70°C por 30 minutos o a -20°C toda la noche.

10) Se centrifugó a 6000 rpm por una hora.

11) La pastilla se secó al vacío.

12) El DNA se resuspendió en TE (pH 7.5)

13) La concentración se determinó al espectrofotómetro (260/280nm).

Cuando ya se tuvo el DNA aislado y purificado, se digirió con las enzimas de restricción EcoRI e HindIII, las cuales originan fragmentos de 13 y 12 Kpb respectivamente y que contienen al gen c-myc completo (Figura 9).

Electroforesis en gel de agarosa.

Con la digestión anterior se facilita que el DNA celular penetre en el gel de agarosa al 0.9% y puedan ser separados los fragmentos de 13 y 12 Kpb del resto del genoma.

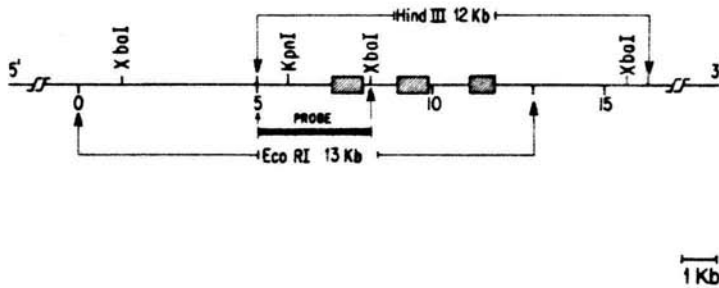


FIGURA 9. MAPA PARCIAL DE RESTRICION DEL ONCOGEN c-myc HUMANO. LA SONDA UTILIZADA (PROBE) ES EL FRAGMENTO HindIII-XbaI, INDICADO CON LA BARRA GRUESA. LOS RECTANGULOS CORRESPONDEN A LOS TRES EXONES DEL GEN. TAMBIEN SE INDICAN ALGUNOS SITIOS DE RESTRICION

1) Se fundió la agarosa al 0.9% en buffer TPE (pH 7.8) (Ver Apéndice de Soluciones).

2) Se dejó enfriar a 50°C y se agregó bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml de una solución patrón de 10mg/ml.

3) La cámara de electroforesis se preparó según la Figura 10.

4) La agarosa se vertió en la cámara de electroforesis y se dejó gelificar.

5) Se agregó el buffer TPE (de corrida) hasta que sobrepaso la superficie del gel.

6) Las muestras de DNA se agregaron con una micropipeta.

7) Se inició la electroforesis a 50V durante 16 horas a temperatura ambiente.

8) Se recuperó el gel de agarosa y se observó en un transiluminador de luz U.V. para posteriormente tomarle una foto utilizando película tipo 57 o 55, ASA 3,000, Polaroid (Figura 11).

Transferencia tipo Southern a papel de nitrocelulosa

1) Se agregó solución desnaturalizadora al gel y se incubó a temperatura ambiente con agitación constante por dos horas.

2) Se desechó la solución desnaturalizadora y se lavó dos veces con agua bidestilada.

3) Se agregó solución neutralizadora, a temperatura ambiente con agitación constante por dos horas.

4) Se lavó tres veces con agua bidestilada.

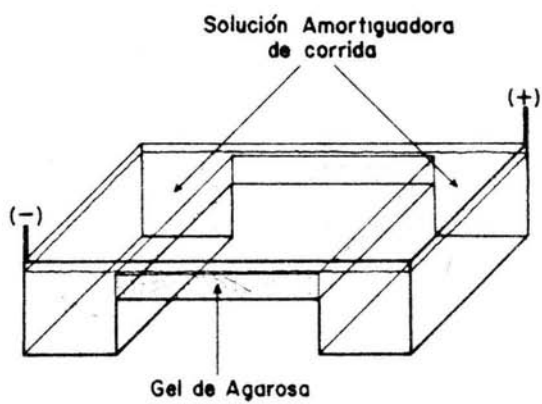


FIGURA 10. CAMARA DE ELECTROFORESIS

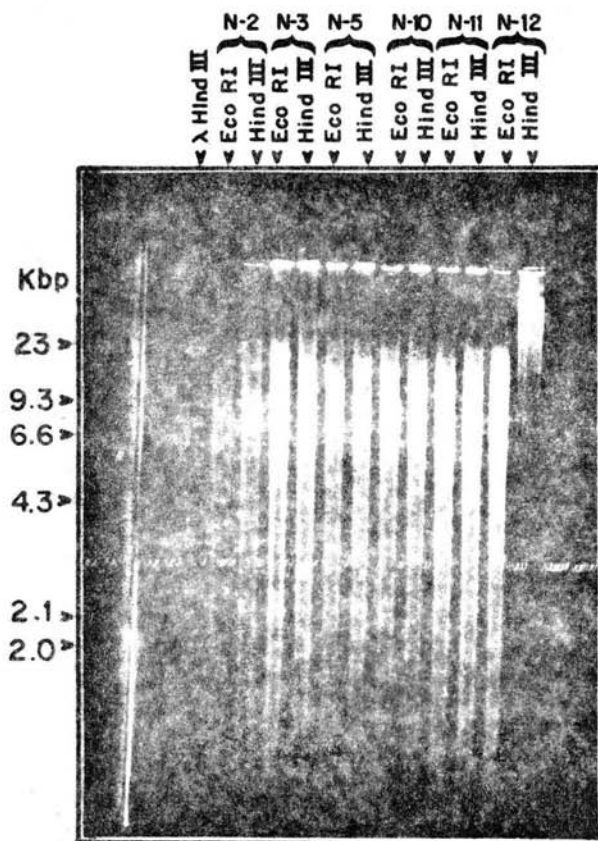


FIGURA 11. GEL DE AGAROSA (0.9%) DESPUES DE LA ELECTROFORESIS TEÑIDO CON BROMURO DE ETIDIO

Después de este punto el DNA se transfirió por capilaridad al papel de nitrocelulosa (56, 58).

5) En un recipiente con buffer de transferencia, SSC 10X (ver Apéndice), con una placa de lucita (Figura 12), se colocó un papel Whatman 3MM, humedecido en solución SSC 10X, sirviendo como puente para el flujo del buffer de transferencia.

6) Se colocó el gel de agarosa encima del papel Whatman 3MM y se eliminaron las burbujas con ayuda de una pipeta.

7) Se humedeció el filtro de nitrocelulosa (del tamaño del gel), en una solución SSC 2X, hasta que estuvo totalmente humedo por 2 minutos.

8) Se colocó el filtro sobre el gel y se eliminaron las burbujas.

9) Se humedecieron 2 piezas de papel Whatman 1MM en solución SSC 2X y se colocaron encima del filtro de nitrocelulosa, eliminando siempre las burbujas.

10) Se cortaron toallas de papel absorbente, suficiente para alcanzar una altura de 7 a 10 cm, colocandose sobre el papel Whatman 1MM y sobre estas toallas un peso de aproximadamente 500g (Figura 12).

El objetivo fue el permitir que se forme un flujo de líquido del tanque a través del gel y del filtro de nitrocelulosa, de tal manera que los fragmentos de DNA fueron eluidos del gel y depositados en el filtro de nitrocelulosa. Para esto se dejó la transferencia de 12 a 20 horas.

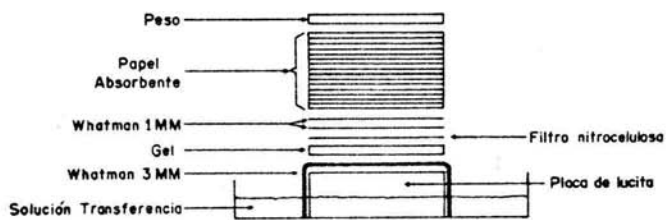


FIGURA 12. TRANSFERENCIA DE DNA POR LA TECNICA DE SOUTHERN

11) Se removieron las toallas y los papeles IMM. El filtro de nitrocelulosa se sumergió en SSC 6X a temperatura ambiente por 5 minutos. Se desechó el gel de agarosa.

12) Se secó el filtro entre dos hojas de papel Whatman IMM y se horneó durante dos horas a 80°C al vacío. Se guardó el filtro de nitrocelulosa en una bolsa sellada hasta su uso.

Cuando ya se tuvo el filtro de nitrocelulosa con el DNA tumoral y normal por un lado, y por el otro la sonda radiactiva se llevo a cabo la prehibridización e hibridización (56) según se describe a continuación:

Prehibridización e Hibridización

1) Se humedeció el filtro en SSC 6X por dos minutos.

2) Se colocó el filtro dentro de bolsas sellables y resistentes a 50°C (p.ej. Sears/ Seal-n-Save).

3) Se agregaron 0.2ml de solución prehibridizadora por cada cm^2 del filtro (Ver Apéndice).

4) Se eliminaron todas las burbujas posibles, se selló la bolsa y se incubó en un baño de agua a 42°C de 12 a 24 horas.

5) Se desechó la solución de prehibridización y se agregaron 50 μl de solución de hibridización por cada cm^2 , 480 μl de EDTA 0.25M y la sonda radiactiva (previamente calentada en un baño María a ebullición durante 10 minutos y sumergida inmediatamente en hielo), 1 a 4 X 10^8 cpm/ μg .

6) Se incubó a 42°C durante 24 horas.

7) Se recuperó la sonda y se realizaron los siguientes lavados al filtro.

a) Solución I: SSC 2X; se lavaron 3 veces a 50°C, durante 15 minutos cada lavado.

b) Solución II: SSC 0.1X y SDS 0.1%, 2 veces a 50°C por 30 minutos.

8) Se secó el filtro a temperatura ambiente sobre una hoja de papel Whatman 3MM.

Autorradiografía

1) Se colocó el filtro en plástico especial (p. ej. Egapack).

2) Primero se colocó una placa de rayos X en el cassette para autorradiografías. Después el filtro y al último otra placa de rayos X. El cassette ya tiene incluidas las pantallas intensificadoras, una a cada lado (Figura 13).

3) Se expusó el tiempo necesario a -70°C, utilizando una película Kodak X-Omat AR y se reveló como sigue.

Revelador	1.5 minutos
Solución Stop	30 segundos
Fijador	3 minutos
Agua	10 minutos

4) Se secó a temperatura ambiente.

5) Se leyó la autorradiografía en un espectrofotometro a 560nm (densitometría).

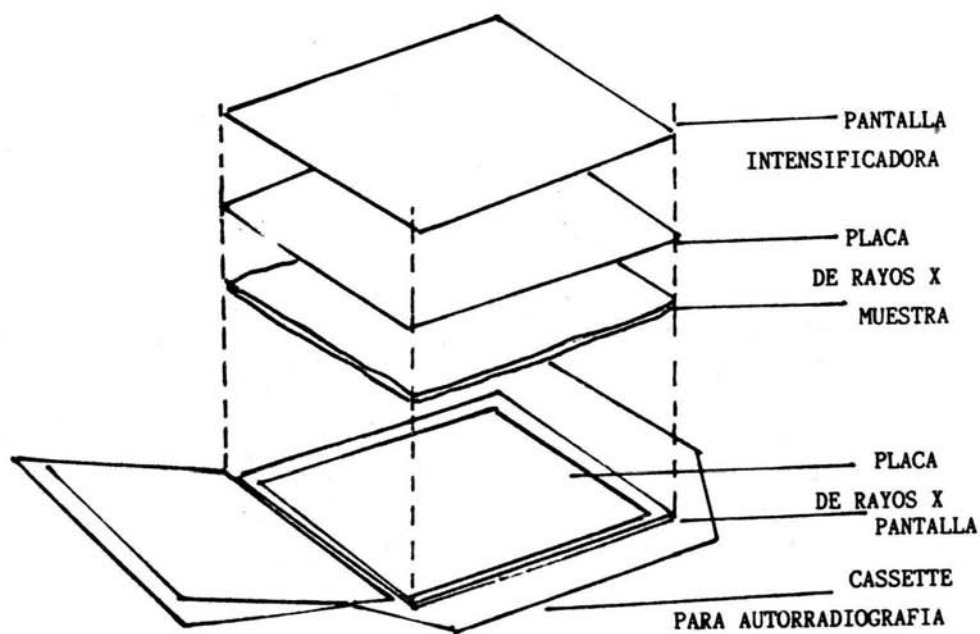


FIGURA 13. REPRESENTACION DE UN SISTEMA DE AUTORADIOGRAFIA

RESULTADOS

Las muestras de tumores intracraneales (6 meningiomas, 4 astrocitomas, 3 adenomas, 2 glioblastomas, 1 craneofaringeoma y 1 meduloblastoma) y tejido normal, proporcionadas por el Dpto. de Genética del I.N.N.N. se mantuvieron a -70°C hasta el momento de su procesamiento.

En la figura 14 se pueden apreciar las huellas dejadas por la sonda radiactiva al encontrar secuencias homólogas; observándose fragmentos de 13 y 12 Kpb del gene *c-myc*, las cuales coinciden con las esperadas para el tejido normal (carril N), mientras que para las muestras tumorales T-2, T-5 y T-8 presentan bandas mas intensas. En el caso de T-8 se observan fragmentos adicionales a los de 13 y 12 Kpb por lo que pensamos que es un rearrreglo del oncogene *c-myc*. Sobre el tipo de alteración detectada en los tumores T-2 y T-5, solo se detectó amplificación, ya que el tamaño en peso molecular de las bandas corresponde a los fragmentos del tejido normal. El grado de amplificación va de 4 a 32 veces del oncogene *c-myc* (determinado por densitometría, ver Tabla 5), siendo específicamente de 11 veces para el T-2, 32 veces para el T-5 y para el T-8 que además presento rearrreglo, la amplificación es de 4 a 18 veces. Los tumores intracraneales T-2 y T-5 son histopatológicamente meningiomas (tumor benigno) ambos del sexo femenino con 2 y 4 años de evolución del tumor respectivamente, mientras que el paciente T-8, era del sexo masculino del tipo histopatológico astrocitoma (tumor maligno) con 15 días de evolución (Tabla 6). La edad de estos tres casos era de 22 años para el T-2, 55 años

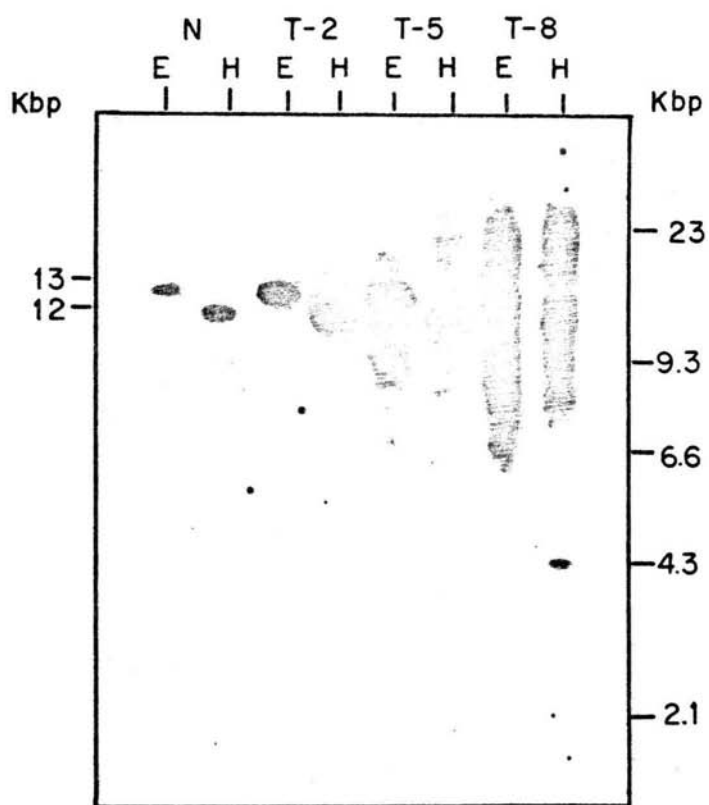


FIGURA 14. AUTORRADIOGRAFIA DE DNA DE TUMORES DE CEREBRO HUMANO Y TEJIDO NORMAL, DIGERIDOS CON EcoRI (E) e HindIII (H)

TABLA 5: LECTURAS EN EL ESPECTROFOTOMETRO DE LAS BANDAS DE DNA

TUMOR	LECTURA A 560nm	GRADO DE AMPLIFICACION
FIGURA 14		
N	0.6	1X
T-2	6.6	11X
T-5	19.2	32X
T-8	10.8, 7.2	18X, 12X
	6.6, 2.4	11X, 4X
FIGURA 15		
N	0.3	1X
T-10	1.2, 0.6	4X, 2X
T-11	0.29	1X
T-12	1.2	4X
T-13	4.8, 0.91	16X, 3X
FIGURA 16		
N	0.76	1X
T-15	15.2, 30.4, 1.52	20X, 40X, 2X
T-16	9.12	12X
T-18	12.92	17X
T-19	12.16, 8.36	16X, 11X
FIGURA 17		
N	0.33	1X
T-22	0.34	1X
T-24	0.32	1X

TABLA 6: TUMORES DE CEREBRO HUMANOS ANALIZADOS

TUMOR	SEXO	EDAD	DX.HISTOPAT.	PROCEDENCIA	EVOLUCION	ONCOGEN A	c-myc R
2	F	22	Meningioma ^b	Edo.de Méx.	2 años	11X	-
5	F	55	Meningioma	D.F.	4 años	32X	-
8	M	53	Astrocitoma ^m	Edo.de Méx.	15 días	18X, 12X 11X, 4X	+
10	F	44	Meningioma	D.F.	3 años	4X, 2X	+
11	F	65	Meningioma	D.F.	3 años	1X	+
12	M	37	Glioblastoma ^m	Oaxaca	3 meses	4X	-
13	F	68	Meningioma	D.F.	5 años	16X, 3X	+
15	F	22	Adenoma ^b	Edo.de Méx.	2 años	20X, 40X 2X	+
16	F	44	Astrocitoma	Veracruz	1 mes	12X	-
18	F	20	Astrocitoma	Guerrero	5 meses	17X	-
19	M	25	Craneofarin- geoma ^b	D.F.	1.5 años	16X, 11X	+
21	M	50	Meningioma	D.F.	2 meses	1X	-
22	M	19	Adenoma	Edo.de Méx.	6 años	1X	-
23	F	22	Meduloblas- toma ^m	D.F.	2 meses	1X	-
24	M	16	Astrocitoma	D.F.	3 meses	1X	-
25	M	43	Adenoma	Morelos	5 años	1X	-
26	F	52	Glioblastoma	Hidalgo	3 meses	1X	-

DX. HISTOPAT.= Diagnóstico Histopatológico; A= Amplificación; R= Rearreglo; F= Femenino; M= Masculino; D.F.= Distrito Federal
b= Tumor benigno; m= Tumor maligno.

para T-5 y 53 años para el T-8, dos provenientes del Edo. de México (T-2 y T-8) y uno del Distrito Federal (T-5) (Tabla 6).

Para los casos de la Figura 15 se observan ambas alteraciones (amplificación y rearreglo) para el oncogen c-myc. Los tres tumores del tipo histopatológico meningioma que presentaron ambas alteraciones fueron T-10, T-11 y T-13. Con amplificaciones del oncogene c-myc de 2 a 16 veces, además del rearreglo para ambos alelos, de 9.3 y 7.0 Kpb para el T-10 y de 9.3 Kpb para el T-11, mientras que para el T-13 se detecta una banda de 13 Kpb con un grado de amplificación de 16 veces (mayor a los muestras T-10, T-11 y T-12) y una banda adicional de 4.3 Kpb con amplificación de 3 veces para la cual no encontramos explicación. Para la muestra tumoral T-12, que histopatológicamente es un glioblastoma (tumor maligno), procedente de Oaxaca, del sexo masculino con una evolución del tumor de 3 meses, solamente se detectó amplificación de 4 veces del oncogene c-myc (Tabla 6).

Las alteraciones detectadas con la sonda radiactiva HLM-Xba, en la figura 16, fueron amplificación y rearreglo para los tumores T-15 y T-19, el primero del Edo. de México y el segundo del Distrito Federal, con un promedio de edad de 23 años. El grado de amplificación en ambos alelos fue de 2 a 20 veces para la muestra T-15 (adenoma; tumor benigno) y de 6 a 16 veces para el T-19 (craneofaringeoma; tumor benigno). El rearreglo fue solo para un alelo, observandose bandas de aproximadamente 10 Kpb y 5.5 Kpb para el tumor T-15 y de 9.3 Kpb para el T-19, el cual en el carril E se obserban dos bandas a la altura de 13 Kpb, este se

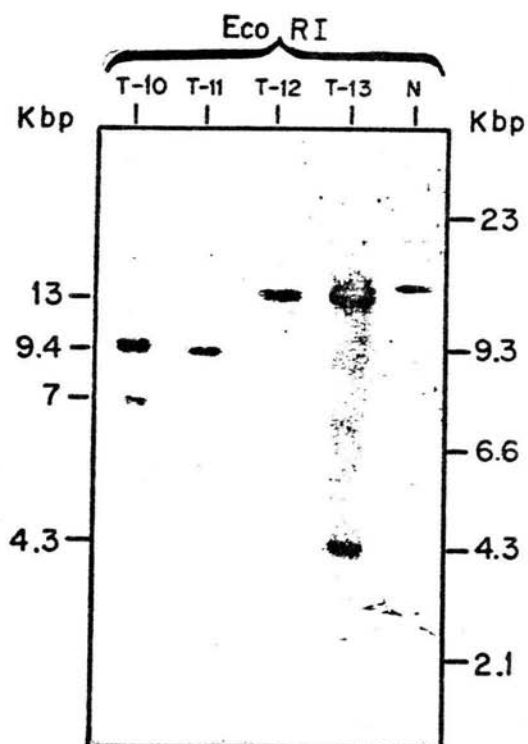


FIGURA 15. AUTORADIOGRAFIA DE DNA TUMORAL Y TEJIDO NORMAL, DIGERIDOS CON LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN EcoRI

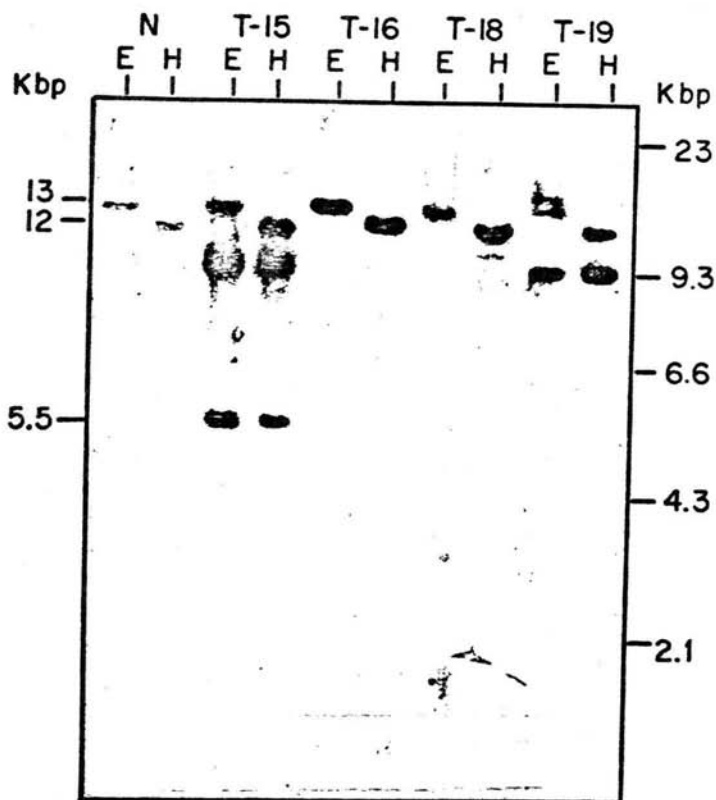


FIGURA 16. AUTORADIOGRAFIA DE DNA DE TUMORES DE CEREBRO HUMANO Y TEJIDO NORMAL DIGERIDOS CON LAS ENZIMAS DE RESTRICION *EcoRI* (E) E *HindIII*, MOSTRANDO ALTERACION DEL GEN *c-myc* (AMPLIFICACION Y REARREGLO)

debio probablemente a que la enzima EcoRI tuvo una digestión parcial. Para las muestras intracraneales T-16 y T-18, ambos del tipo histopatológico astrocitoma y del sexo femenino, con evolución del tumor de 1 a 5 meses respectivamente, solo presentaron amplificación con un grado de 12 veces para el T-16 y de 17 veces para el T-18. El carril del tejido normal se detectaron los fragmentos de 13 y 12 Kpb para las enzimas EcoRI e HindIII respectivamente.

Para las muestras de tumores cerebrales del T-21 al T-26 (representados por los tumores T-22 y T-24 en la Figura 17) el patrón de bandeo fue similar al presentado por el tejido normal (carril N) no detectándose algún tipo de alteración (amplificación y rearrreglo) para el oncogene c-myc. En esta figura hay dos adenomas, un glioblastoma, un meningioma un astrocitoma y un meduloblastoma (tumor maligno) (Tabla 6).

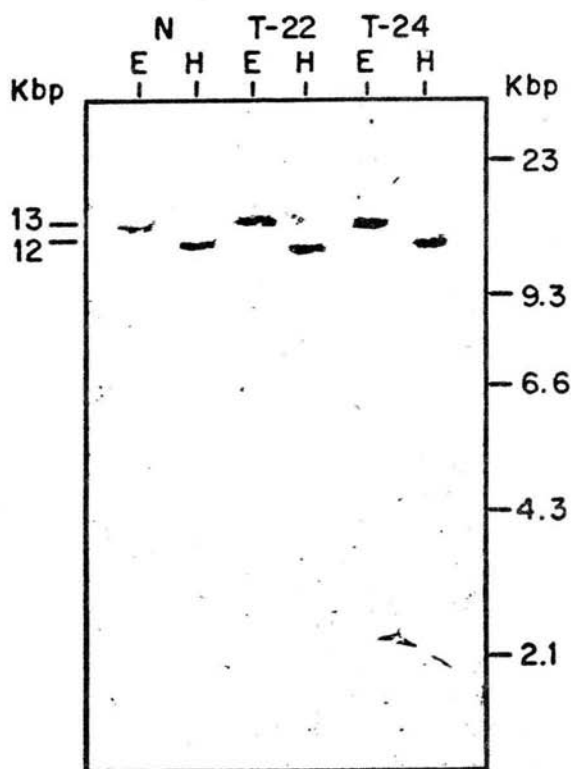


FIGURA 17. AUTORRADIOGRAFIA DE DNA DE TEJIDO TUMORAL Y NORMAL DE CEREBRO. EcoRI (E), HindIII (H). OBSERVANDOSE QUE LAS MUESTRAS T-22 Y T-24, NO PRESENTAN ALTERACION DEL PROTO-ONCOGEN *c-myc*

DISCUSION

Mediante este trabajo se tiene la evidencia de la alteración génica del oncogene celular myc (c-myc); se ha detectado amplificación, rearrreglo o ambas alteraciones del gene en tumores sólidos de cerebro humano.

Este tipo de estudio viene a representar, junto con otros trabajos (24, 59-61), el inicio de la Oncología Molecular en México, siendo importante no solo para el ambito científico de nuestro país, sino a los múltiples factores asociados al desarrollo del cáncer ya antes descritos (factores socio-económicos, geográficos, etc...) (4).

El cáncer en el sistema nervioso central ocupa un lugar importante entre las enfermedades que afectan a la población mexicana en un 2%, por lo que se hace necesario un estudio no solo clínico de este padecimiento, de hecho, se busca que los datos proporcionados por los estudios a nivel molecular ayuden a esclarecer los mecanismos por los cuales una célula normal entra en un proceso de transformación. Estos conocimientos junto con los proporcionados por la investigación clínica nos llevarán a encontrar las causas del cáncer, su eficaz tratamiento y probablemente la forma de prevenirlo.

Este tipo de investigación se ha enfocado principalmente al estudio del estado del oncogen c-myc, inicialmente en tumores sólidos; es más confiable utilizar este tipo de material ya que en un momento dado, representa fielmente el estado génico de una célula cancerosa; los cultivos celulares se han relegado a un

segundo termino ya que las células al ser cultivadas ocurren cambios genéticos, de hecho, existen varios ejemplos en donde se muestra que la heterogeneidad encontrada en líneas celulares puede no reflejar la situación en el organismo. Por ejemplo, la línea celular P3HR1 derivada de linfoma de Burkitt, presenta un rearrreglo del oncogen c-myc el cual no es detectado en pasajes tempranos de las células (62); por otro lado se ha determinado que en sublíneas de MCF7 (línea celular de carcinoma de pulmón humano), seriadamente pasadas en diferentes laboratorios, tienen diferentes grados de amplificación del oncogen N-ras (63).

En este estudio se analizaron 17 muestras de las cuales pueden separarse en dos grupos: el primer grupo formado por tumores benignos y el segundo de malignos.

De los 10 casos de tumores benignos analizados, 7 presentaron algún tipo de alteración (amplificación, rearrreglo o ambas), lo cual da un 70% de tumores alterados para el oncogen c-myc, y un 30% que no presentó ningún tipo de alteración. Mientras que en el segundo grupo se detectó alteración del oncogen c-myc en el 57%, ya sea amplificación, rearrreglo o ambas, y el 43% no tuvo ninguna alteración.

Como se puede ver (Tabla 6), al menos para los tumores benignos el oncogen c-myc está rearrreglado con mayor frecuencia que en los malignos.

Estos resultados van de acuerdo a los encontrados en otros tipos de tumores estudiados en nuestro laboratorio, como son en carcinoma cervico-uterino, donde se detectaron diferentes grados de amplificación de c-myc y rearrreglo en un 97% de las muestras

analizadas (59). En cáncer de mama el porcentaje de alteración del oncogen c-myc fue del 50% (60). En tumores de cerebro (las mismas muestras analizadas para c-myc) hemos detectado alteraciones para el oncogen N-myc, en un 49%.

Normalmente el gen c-myc esta aparentemente modulado en forma rapida dado que el correspondiente mRNA tiene una vida media corta (62). En casos anormales, la sobreproducción del mRNA del c-myc puede ser resultado de la amplificación del gen(10); además, posiblemente el primer exón de myc juega un papel importante en la transcripción (23) o en la degradación post-transcripcional (27), por lo tanto, un rearrreglo puede conducir a la acumulación de transcritos de myc y promover la transformación de una célula normal en una cancerosa por los mecanismos antes expuestos (ver Introducción), es por esto que el hecho de encontrar a este oncogen c-myc, ya sea amplificado, rearrreglado o ambas sugiere fuertemente que esta implicado en el desarrollo de un tumor, además el tamaño de los fragmentos del c-myc pueden ser alterados por varios mecanismos, tales como mutaciones puntuales, pequeñas deleciones, inserciones o rearrreglos mayores (translocaciones); los fragmentos rearrreglados que se observan pueden deberse a estos mecanismos moleculares, los cuales pueden llevar a la tumorigénesis (12).

CONCLUSIONES

Mediante las técnicas actuales de la Biología Molecular, podemos detectar alteraciones a nivel de DNA de genes específicos, en este caso en particular de un oncogen. Dado que este trabajo (junto con otros trabajos de nuestro laboratorio) representa el inicio de la Oncología Molecular en México, es de gran importancia el hecho de que esta tecnología especializada ya este dando frutos a solo dos años de iniciada. Asimismo estamos concientes de que el análisis de los oncogenes no solo debe limitarse a las alteraciones del DNA sino también desarrollar estudios mas finos en los cuales podamos estudiar tanto la expresión como la función de los productos de los oncogenes (proteínas).

El hecho que el oncogen c-myc se haya encontrado rearrreglado y amplificado en el 70% de los tumores benignos y en un 57% en los malignos, pero no en el tejido normal, sugiere que las alteraciones moleculares de este gen, pueden ser importantes en la génesis o progresión de los tumores intracraneales humanos.

Para un estudio mas completo, se requiere de un numero mayor de muestras y de diversos tipos histológicos para dar una conclusión definitiva sobre la posible correlación existente entre las alteraciones de c-myc y los estadios clínicos de los tumores intracraneales.

Este tipo de estudio esta encaminado a elucidar el posible mecanismo molecular por el cual se desarrolla un tumor; de hecho, se pretende encontrar el posible origen del cáncer y de esta manera en un futuro cada vez mas cercano, llegar a establecer un diagnóstico y tratamiento efectivos del cáncer.

APENDICE DE SOLUCIONES

Acetato de Potasio 5M, pH 4.8

60 ml de acetato de potasio 5M
 11.5ml de ácido acético glacial
 28.5ml de agua
 Ajustar a pH 4.8 con ácido acético glacial

Ampicilina

25mg/ml en agua
 Esterilizar por filtración y almacenar a
 -20°C
 Concentración de trabajo: 35-50 µg/ml

Bromuro de etídio (10mg/ml)

0.1g de bromuro de etídio
 10 ml de agua
 Agitar varias horas
 Envasar en frasco ambar y almacenar a 4°C

Buffer (10X) del marcador lambda-HindIII

Tris-HCl (pH 8.0) 20mM
 EDTA 1mM
 NaCl 20mM

Buffer Tris-EDTA (TE)

Tris-HCl 10mM
 EDTA 1mM

Buffer Tris-Fosfato-EDTA (TPE)

Solución de trabajo
 0.08M Tris-fosfato
 0.008M EDTA
 Solución patron concentrada (10X)
 Tris base 108g
 Acido fosfórico al 85% 15.1ml
 EDTA 0.5M (pH 8.0) 40 ml

Buffer de transferencia (10X SSC) Citrato de sodio salino

NaCl 175.3g
 Citrato de sodio 88.2g
 Agua 800 ml
 Ajustar a pH 7.0 con NaOH, esterilizar en
 autoclave

Cloranfenicol

34mg/ml en etanol absoluto
 Almacenar a -20°C
 Concentración de trabajo 170 µg/ml

Colorante 6X

Azul de bromofenol al 0.25%
 Sacarosa en agua (p/v) 40%
 Almacenar a 4°C

DNA desnaturalizado de esperma de salmón

DNA (Sigma Tipo II de la sal de sodio) en agua a 10mg/ml. Agitar de 2 a 4 horas a temperatura ambiente. Romper el DNA por pasaje en jeringa, hervir 10 minutos y guardar en alícuotas de 1ml a -20°C. Antes de usarlo calentarlo por 5 minutos en baño María, sumergirlo inmediatamente en hielo por 5 minutos.

Líquido de centelleo

5 g PPO (2-5 difeniloxazol)
 0.3 g POPOP p-bis,2-(5-feniloxazolil)-benceno
 Llevar a un litro de tolueno

Solución de prehibridización

SSPE 5X
 SDS 0.5%
 Sol. Denhardt 5X (ver más adelante)
 DNA desnaturalizado de esperma de salmón (100 µg/ml)

Solución de Hibridización

SSPE 5X
 SDS 0.5%
 Sol. Denhardt 5X
 DNA desnaturalizado de salmón (100µg/ml)
 DNA ³²P
 EDTA 0.01M

Solución de Denhardt

Ficoll 5g
 Polivinilpirrolidona 5g
 Albumina Sérica Bovina 5g
 Agua a 500 ml
 Esterilizar por filtración. Hacer alícuotas y almacenar a -20°C.

Solución desnaturalizadora

NaCl 1.5M
 NaOH 0.5M

Solución neutralizadora

Tris-HCl (pH 8.0) 1M
 NaCl 1.5M

Solución I. Para el aislamiento de plásmido

Glucosa 50mM

Tris-HCl 25mM

EDTA 10mM

Agregar en el momento de usarse lisozima, a
una concentración de 5mg/ml

Solución II. Para el aislamiento de plásmido

NaOH 0.2N

SDS 1%

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Zoilo, M. 1983. Nociones y reflexiones sobre el cáncer. Ed. Científico-Técnica. La Habana, Cuba.
- 2.- Fernandez, R.M. 1983. Salud Pública de México. SSA 25(3):50.
- 3.- Olper, P. M. y col. 1977. Rev. Méd. IMSS (Méx.) 16(1):39.
- 4.- Slamon, D. J. y col. 1984. Science 224:256.
- 5.- Rodríguez, P. J. 1983. Rev. Méd. IMSS (Méx.) 21:183.
- 6.- Benítez, B. L. 1984. Rev. Méd. IMSS (Méx.) 22:53.
- 7.- Dulbecco, R. 1983. Mundo Científico 3(22):383.
- 8.- Varmus, E. H. 1984. Ann. Rev. Genet. 18:553.
- 9.- Cairns, J. 1981. Nature 255:197.
- 10.- Cairns, J. 1981. Nature 289:353.
- 11.- Alitalo, K., Schwab, M., Lin, C.C., Varmus, E.H., Bishop, J.M. 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1707.
- 12.- Coffin, J.M. y col. 1981. J. Virol. 40:953.
- 13.- Bishop, J.M., Varmus, E.H. 1982. RNA Tumor Virus. Cold Spring Harbor, New York.
- 14.- Stehelin, D., Varmus, E.H., Bishop, J.M., Vogt, P. K., 1976. Nature 260:170.
- 15.- Zabarovski, R. E. 1985. Mol. Biol. 19(1):1.
- 16.- Frankel, A.E. y Fischinger, P.J. 1976. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:3705.
- 17.- Shih, C. y col. 1979. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76:5714.
- 18.- Cooper, G.M. 1982. Science 217:801.
- 19.- Gallwitz, D. y col. 1983. Nature 306:704.
- 20.- Defeo-Jones, D. 1983. Nature 306:707
- 21.- Hoffman, F.M. 1983. Cell 35:393.
- 22.- Besmer, W.D.P. y col. 1983. Nature 303:825
- 23.- Bayle, W.J. y Lipsick, J.S. y Reddy, E.P. y Baluda, M.A. 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2834.
- 24.- Salcedo, V.M. 1985. Tesis Profesional. E.N.C.B., I.P.N.
- 25.- Donner, P. y Greiser-Wilke, I. y Moelling, K. 1982. Nature 296:262.
- 26.- Kloetzer, W.S. y Maxwell, S.A. y Arlinghaus, R.B. 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:412.
- 27.- Chattopadhyay, S.K. y col. 1982. Nature 296:361.
- 28.- Andersen, R.P. y col. 1981. Cell 26:129.
- 29.- Waterfield, M.D. y col. 1983. Nature 304:35.
- 30.- Doolittle, R.F. y Hunkapiller, M.W. 1983. Science 221:275.
- 31.- Willingham, C.M. y col. 1979. Cell 18:125.
- 32.- Hunter, T. 1984. Sci. Am. 251:60.
- 33.- Lend, H. y Parada, F.L. y Weinberg, A.R. 1983. Nature 304:596.
- 34.- Watt, R. y col. 1983. Nature 303:725.
- 35.- Siebenlist, U. y col. 1984. Cell 37:381.
- 36.- Taparowsky, E. y col. 1982. Nature 300:162.
- 37.- Reddy, E.P. y Reynolds, K.R. 1982. Nature 300:149.

- 38.- Schwab, M. y col. 1983. Nature 303:497.
- 39.- Collins, S. y col. 1982. Nature 298:679.
- 40.- Dalla-Favera, R. y col. 1982. Nature 299:61.
- 41.- Little, D.C. y col. 1983. Nature 306:194.
- 42.- Nowell, y col. 1983. Nature 306:494.
- 43.- Kozbor, D.ñ Croce, C. 1984. Canc. Res. 44:438.
- 44.- Taya, Y. y col. 1984. EMBO J. 3:2943.
- 45.- Shibuya, M.ñ Hanafusa, M.ñ Balduzi, P.C. 1982. J. Virol. 42:143.
- 46.- Gonda, Y.T.ñ Sheiness, K.D.ñ Bishop, M.J. 1982. Mol. Cell. Biol. 2:617.
- 47.- Cotton, C.P.ñ Brugge, S.J. 1983. Mol. Cell. Biol. 3:1157.
- 48.- Hayday, C.A. y col. 1984. Nature 304:334.
- 49.- Croce, C. y col. 1984. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3170.
- 50.- Takeya, T.ñ Hanefusa, H. 1983. Cell 32:881.
- 51.- Shanley, J.D. y col. 1983. J. Biol. Chem. 258:810.
- 52.- Hireno, A.ñ Neil, C.J.ñ Vogt, K.P. 1982 Virol. 131:144.
- 53.- Díaz, P.R., Zaragoza, T.R. 1974. Memorias de las Jornadas Médicas del Centro Médico Privado :Hospital Francés:.
- 54.- Figueroa, H.H. comunicación personal.
- 55.- Ocadiz, R. 1986. Tesis profesional E.N.C.B., I.P.N.
- 56.- Maniatis, T.ñ Fristch, E.F.ñ Sambrook, J. 1982. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- 57.- Rigby, P.J. y col. 1977. J. Mol. Biol. 113:237.
- 58.- Southern, E.M. 1975. J. Mol. Biol. 98:503.
- 59.- Ocadiz, R.; Saucedo, R.; Cruz, M.; Graef, A.M. y Gariglio, P. 1986. Canc. Res. En revisión.
- 60.- Bonilla, M. Alteración del oncogen c-myc en carcinoma de mama. Comunicación Personal.
- 61.- Ortega, V. Estudio del oncogen c-myc en pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico. Comunicación Personal.
- 62.- Rabbitts, T. H. y col. 1984. Nature 309:592-597.
- 63.- Dalla-Favera, R. y col. 1982. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6497-6501.