



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

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

"ALTERACION DEL ONCOGENE c-myc HUMANO  
EN CANCER CERVICOUTERINO"

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O  
P R E S E N T A :

FRANCISCO PARRA DURAN



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.

A LA MEMORIA DE MI  
PADRE.

A MI MADRE Y HERMANOS.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Patricio Gariglio V. por su asesoría para la realización del presente trabajo.

A la profesora Dolores Paredes Sánchez, que despertó en mi el amor por la Biología.

A mis amigos de siempre: Jorge, Marco Antonio, Víctor Hugo, Luis, Mario, Antonio y Rodolfo por su amistad desinteresada.

A mis inseparables compañeros de la carrera Francisco León, Juan Carlos Flores, Carlos Vera y Patricia Ramírez por su amistad y su apoyo durante cuatro años.

A la Biól. Hilda Cecilia Tortajada Quiroz por infundirme el ánimo necesario para la realización de este trabajo y por ser ese motivo tan especial para mí.

A mis hermanos Alvaro, Celina, Evangelina y Guadalupe, pues siempre me han ayudado en todos los aspectos.

A mi hermana Teresa por hacer posible con su apoyo desinteresado la realización del presente trabajo.

A mi primo Luis Fernando Sosa Cerón, por ese apoyo tan valioso que nunca olvidaré.

A mi tío Felix Cerón Durán por su constante apoyo.

A mis compañeros de proyecto: QBP Mauricio Salcedo V., QBP -  
Rodolfo Ccaquiz D. y Biól. René Saucedo L. por su ayuda.

A mis compañeros de laboratorio: Alejandro, Floriberto, -  
Silvia, Rocío, Lorena, Consuelo, Enrique, Fernando Ulises, Manuel,  
Venancio, Edgar, Edith, Luz María, Elizabeth, Paula, y muy especial-  
mente a Pedro por su ayuda tan valiosa en la microscopía electróni-  
ca.

A todos aquellos profesores, amigos y familiares que de -  
alguna forma contribuyeron a la realización y la terminación de -  
este trabajo.

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO 24 DEL DEPARTAMENTO  
DE GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACION  
Y ESTUDIOS AVANZADOS (C.I.E.A.) DEL I.P.N. BAJO ASESORIA DEL  
DR. PATRICIO GARIGLIO V.

## INDICE

Página.

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
OBJETIVOS.....	16
MATERIALES Y METODOS.....	17

### I.- MATERIAL.

1).- Material Biológico.....	17
2).- Medios de Cultivo.....	19
3).- Soluciones.....	19
4).- Material Especial.....	24
5).- Enzimas.....	25

### II.- METODOS.

1).- Crecimiento de la cepa <u>E. coli</u> y amplificación del plásmido HLM-Xba.....	26
2).- Aislamiento del plásmido HLM-Xba lisis por alcali.....	26
3).- Purificación del plásmido HLM-Xba.....	30
4).- Concentración del plásmido.....	31
5).- Extracción de DNA tumoral.....	33
6).- Digestión del DNA tumoral.....	34
7).- Electroforesis de DNA tumoral digerido con enzimas de restricción.....	34
8).- Transferencia tipo Southern a filtro de nitrocelulosa del DNA tumoral.....	36
9).- Marcaje del plásmido HLM-Xba por Nick-Translation para usarse como sonda.....	38
10).- Hibridación.....	42
11).- Microscopía electrónica de macromoléculas, técnica para extendido de ácidos nucleicos...	44
RESULTADOS.....	48

I.- RESULTADOS DE EXPERIMENTOS PRELIMINARES.

1).- Crecimiento de la cepa <i>E. coli</i> y amplificación del plásmido HLM-Xba.....	48
2).- Purificación del DNA plasmídico.....	48
3).- Microscopía electrónica del plásmido HLM-Xba.....	48
4).- Extracción de DNA tumoral.....	51
5).- Digestión de DNA tumoral.....	51
6).- Transferencia tipo Southern a filtro de nitrocelulosa del DNA tumoral.....	51
7).- Marcaje del plásmido HLM-Xba.....	53
8).- Hibridación.....	54

II.- RESULTADOS (ALTERACION DEL ONCOGENE c-myc EN CANCER CERVICOUTERINO).

- EXPERIMENTO I.....	55
- EXPERIMENTO II.....	62
- EXPERIMENTO III.....	68
- TABLA DE RESULTADOS.....	77

DISCUSION.....	78
----------------	----

CONCLUSIONES.....	83
-------------------	----

ANEXOS

1).- Análisis por computadora.....	84
------------------------------------	----

BIBLIOGRAFIA.....	90
-------------------	----

## RESUMEN

El estudio de los oncogenes tiene gran relevancia en la actualidad, pues plantea la posibilidad de conocer las bases moleculares del cáncer.

El oncogene c-myc se ha encontrado involucrado en una gran variedad de procesos cancerosos; en líneas celulares de pulmón (SCLC), colon (COLO 320), estómago, neuroblastoma, retinoblastoma, mama etc., se le ha encontrado amplificado; en linfomas y algunas leucemias humanas y plasmocitomas de ratón se le ha encontrado translocado (8:14, 2:8, 8:22).

En nuestro país el cáncer cervicouterino ocupa el primer lugar de incidencia, principalmente en mujeres mayores de 40 años y multiparas, por lo que plantea un serio problema, pues en los próximos años esta incidencia se incrementará de acuerdo al grado de erradicación de enfermedades infecciosas, y al creciente número de mujeres en edad productiva (30 a 50 años), sujetas a riesgos.

En nuestro laboratorio, y en colaboración con el Centro Médico la Raza y el Centro Médico Nacional, hemos iniciado el estudio de este oncogene a partir de muestras obtenidas de tumores cervicouterinos primarios, con el objeto de detectar alteraciones en el oncogene c-myc.

La metodología que hemos empleado implica: Aislamiento de DNA tumoral, corte con enzimas de restricción Eco RI e Hind III que nos dan fragmentos de 12 y 13 Kb., respectivamente, en donde se encuentra contenido c-myc, corrimiento electroforético en geles de agarosa al 0.9%, transferencia a filtros de nitrocelulosa por técnica de Southern, hibridación con una sonda c-myc (plásmido HLM-Xba) previamente preparada por marcaje radioactivo con  $^{32}\text{P}$  (Nick-Transla-

tion), y autorradiografía.

Los resultados obtenidos a partir de 8 tumores estudiados - indican que el oncogene c-myc se encuentra alterado en todos - (100%); en todos los tumores se encontró amplificación (de 2 a 12 veces por genoma diploide) de c-myc; en cinco de los tumores se - encontró tanto amplificación como rearrreglos, apareciendo en dos casos presencia de pseudogenes, y sólo en tres casos se observó - únicamente amplificación.

Los tipos histológicos estudiados son: adenoescamoso y epidermoide, observándose en este estudio ser el epidermoide el más frecuente.

## INTRODUCCION:

La incidencia del cáncer en la población humana varía marcadamente en relación a la clase social, medio de vida y zonas geográficas. En la actualidad ocupa uno de los primeros cinco lugares como causa de defunción en países desarrollados; en países subdesarrollados este valor es mayor al 10% (16).

El cáncer ocurre principalmente en personas de edad productiva (de 30 a 60); cada año más de 50,000 mexicanos mueren por esta enfermedad. Esta cifra aumentará al disminuir la mortalidad por enfermedades parasitarias y al aumentar el promedio de vida de la población mexicana.

En México las estadísticas reportan que la mortalidad por neoplasias es del 11% (16)(14), donde el cáncer cervicouterino ocupa el primer lugar (38), respecto a incidencia y mortalidad; en otros países este carcinoma es poco frecuente y por lo tanto poco estudiado.

A nivel nacional (14), en su revisión de datos de la Dirección General de Estadística de la S.I.C. encontraron que en 1970, de un total de 407,848 casos de cáncer, correspondieron 41,454 al de cuello uterino, o sea cerca del 10% del total. Entre 1965 y 1975 (38), reunieron 23,824 casos de cáncer en el Centro Médico Nacional del I.M.S.S. en la Ciudad de México, de los cuales 8,907 fueron de carcinoma cervicouterino, el más frecuente. En Sonora, (57) encontraron que en 1973 la tasa de mortalidad para el cáncer cervicouterino fue de 50.4 mientras que en toda la República fue de 52.9; en ambos casos, este tumor tuvo el primer lugar en frecuencia con 13.8 y 15.5 por ciento para Sonora y todo el país, respectivamente.

En el Hospital del I.M.S.S. de Cd. Obregón, Sonora, en un -

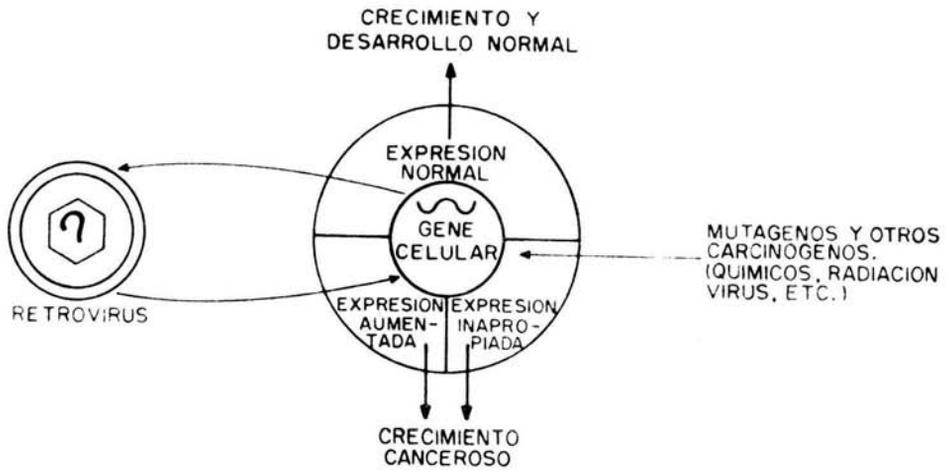
trabajo realizado por M.E. Piña Flores, encontraron que entre 1973 y 1979, 478 casos de carcinoma cervicouterino contra 120 de cáncer de mama, el segundo en frecuencia (42)(12), encontraron datos similares, tanto a nivel nacional como en cada estado de la República Mexicana, tras el estudio de las estadísticas vitales de certificados de defunción durante el año 1973(12)(13).

El carcinoma cervicouterino constituye un problema de graves repercusiones nacionales, y es una enfermedad que comparten los países con atención médica insuficiente y marcada influencia de factores socioculturales adversos, que la hacen la neoplasia --maligna más frecuente en nuestro medio (57), y sin duda, nuestro problema básico en el campo de la oncología en nuestro país, por lo que consideremos indispensable un conocimiento directo de esta enfermedad en nuestro medio, para poder planear políticas de --prevención, diagnóstico y tratamiento, (42).

Los estudios epidemiológicos atribuyen múltiples causas a los cánceres humanos (3)(15), como la exposición a sustancias químicas cancerígenas, a radiaciones y a virus. Las anteriores causas, actúan sobre el genoma celular dando una expresión celular inapropiada, tal como se observa en el esquema 1.

Los mecanismos que controlan la proliferación celular, --normalmente no se conocen con precisión a nivel molecular, en --tanto el crecimiento maligno se conoce aun menos (3).

Los descubrimientos modernos en la investigación genética del cáncer, parecen ofrecer una vía para el entendimiento de los hechos moleculares que desencadenan el crecimiento irrestricto de las --células malignas (3). Gran cantidad de estos estudios están enfocados hacia el estudio de una de las posibles causas de esta enferme-



ESQUEMA 1. CONCEPTO GENE-CANCER

dad. La naturaleza de los eventos genéticos asociados con el -  
 cáncer empieza a ser entendida. Recientemente, se han descubierto  
 alrededor de 26 proto-oncogenes, los cuales desempeñan funciones  
 de gran importancia para el crecimiento y diferenciación de las  
 células (codifican para factores de crecimiento, para receptores  
 de dichos factores, etc.).

En el año de 1978, M.S. Collett y R.L. Erikson en Estados -  
 Unidos, demostraron que la carcinogénesis requería la expresión  
 de un gene particular, en el caso de los sarcomas, el oncogene -  
 "src", presente en el genoma del virus encontrado en estos tipos  
 de cáncer, por P.E. Rous (15). El estado canceroso de las células  
 es, consecuencia directa de la actividad de una proteína trans-  
 formante, producida por oncogenes.

Collett y Erikson también demostraron que el producto de -  
 este gene, una proteína suplementaria entre los miles que hay en  
 una célula, puede hacer que ésta se haga neoplásica gracias a una  
 función particular; la de una proteincinasa, es decir, una enzima  
 que fosforila a otras proteínas, modificando profundamente su fun-  
 ción (3)(15)(25). La actividad transformante es asignada a una -  
 proteína codificada por uno o varios genes, los oncogenes (8)(55).

Hasta el momento se han descubierto 26 oncogenes en tejidos  
 animales (15), los cuales se presentan en la tabla I.

Los genes v-onc llevados por retrovirus se denominan mediante  
 un código de tres letras, que recuerdan el tumor de origen. Cada  
 uno es llevado por virus distintos, lo que no excluye la existen-  
 cia de parentesco entre ellos.

En 1982, en Cold Spring Harbor, U.S.A., Miller comunicó los  
 niveles de actividad de diversos genes del cáncer en embriones de

TABLA 1

Abreviación	Origen	Virus	Producto	Cromosoma Humano	Referencia
Src	Virus de sarcoma de rous ( Pollo )	Rsv	P60	20	(43)
Abl	Virus de leucemia Abalson ( ratón )	AMuLV	P90	q(q34)	(40)
Fps	Virus de sarcoma Fujinami ( Pollo )		P140		(40)
Fes	Virus de sarcoma felino ( gato )	STTeSU	Gap95	15(q25-26)	(23)
Yes	Virus del sarcoma Yamaguchi ( pollo )	Y 73	P90		(40)
Fms	Virus de sarcoma Mc Donough ( gato )	SM-IeSV	P170	5	(40)
Ros	virus de sarcoma Rochcistar-2 ( pollo )	UR-2	P68		(40)
Mos	Virus de sarcoma Moloney ( ratón )	Mo-MSV	P37	8(q22)	(35)
Raf	36 M - MSV (ratón)	36M-MSV	P75	3	(20)
Rel	Reticuloendo Teliosis ( pájaros )		P64		(40)
ab-B	Erythroblastosis ( Pájaros )		P45		(40)
N-ras	DNA Humano	No Hay	P21	14	
H-ras-1	virus de sarcoma de Haruay ( rata y ratón )	Ki-MSV	P21	11 (p 14-1 ) (p 1j.1-15.3)	(27) (27)
H-ras-2			P29	X	(27)
Ki-ras-1	Virus de Sarcoma de Kirstan ( rata )	Ki-MSV	P21	6	(27)
Ki-ras-2				12(p12.1 ó q24.2)	(27)
SIS	Virus de sarcoma de Simio	SSV	P28	22	(40)
myc	Virus de sarcoma Parodi-Irgens(gato)				
	Virus de Mielocitomatosis(pollo)	MC29	P110	8(q24)	(35)
	Virus de carcinoma(pollo)	MH2	P100 p57		
	Mielocitomatosis 15(pollo)	OK10	P200		
myb	Virus de Mieloblastosis(pollo)	AMV	P30P44/48	6(q22-24)	(23)
	Mieloblastosis / eritoblastosis	E26	P135		
fos	Virus de Osteosarcoma ( ratón )	FBJ-MSV	P35	6	(20)
bas	Virus Sarcoma de ratón ( ratón )	balb	P21		(40)
Ala	Virus de Sarcoma de mono ( monos )				(40)

Abreviación	Origen	Virus	Producto	Crosoma Humano	Referencia
L-myc	Carcinoma de pulmón linea celular NCI-H378 ( Humano )			1P32	(33)
fgr	Sarcoma felino Gardner-Rasheed GR-FeSV ( gato )			1P36.1-36.2	(49)
N-myc	Retinoblastoma, neuroblastoma ( Humano )			13 q 14	(54)(29)
V-Kit	Fibrosarcoma felino ( gato )	HZ4-FeSV	P80		(4)

rate tomados de diferentes estadios de su desarrollo, ver esquema 2, concluyendo que posiblemente la función de estos genes es necesaria en los estadios embrionarios, donde no existe diferenciación (15).

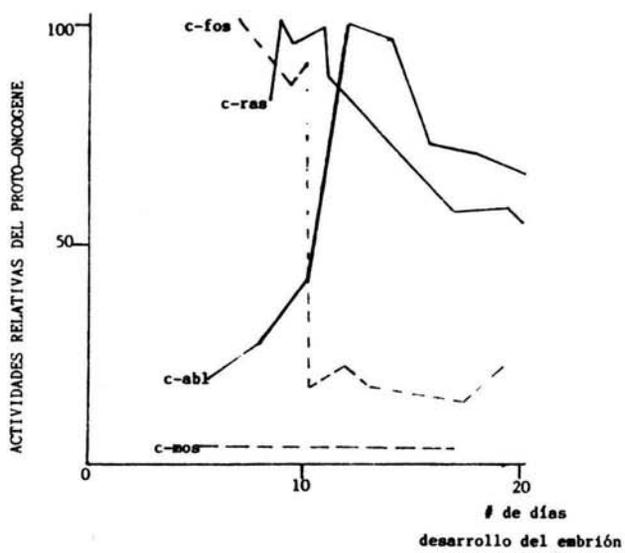
En el National Cancer Institute (N.C.I.), demostraron que - los oncogenes son una versión alterada de genes normales, a los - cuales llamaron proto-oncogenes. Encontraron también que un proto-oncogene se activa, es decir da lugar al oncogene, por medio de cuatro mecanismos independientes: Mutación puntual, rearrreglo - cromosómico, amplificación del gene y activación retroviral (7)-(25).

Los productos de los oncogenes difieren en su función, -- existiendo varias clases, según Hunter y colaboradores (25):

CLASE	FUNCION	ONCOGENE
I	Tirosina proteína cinasa	v-fes, v-fgr, v-fps v-abl y v-ros.
II	Proteínas que se unen a GTP y Adenilato-Ciclase (19)	c-ras, v-ras.
III	Factores de Crecimiento	c-sis.
IV	Proteínas nucleares	v-myc, c-myc.

Las células tumorales de pacientes con Linfoma de Burkitt - mostraron ciertas anomalías cromosomales, de las cuales la más común consiste en un cambio de segmentos entre los cromosomas 8 y 14 (26).

Hacia fines de 1982, diferentes grupos de trabajo encontraron que una consecuencia de esta anomalía es la translocación del gene myc celular, de su posición normal en el cromosoma 8 a una -



ESQUEMA 2. ACTIVIDADES RELATIVAS DE ALGUNOS PROTO-ONCOGENES, CON RESPECTO AL DESARROLLO EMBRIONARIO EN RATA.

nueva localización en los cromosomas 14 en la banda q32 en la - región que contiene los genes que codifican para producir las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas. Una translocación similar - fue también encontrada en células de un tumor análogo, en el plasmacitoma de ratón (22).

El descubrimiento de que en varios tumores llevan consigo una alteración del oncogene c-myc atrajo un gran interés, lo que sugiere que el oncogene está directamente involucrado en la etiología del tumor.

En 1983, se detectó un incremento en la expresión del oncogene c-myc (aumentó en la transcripción), en células tumorales, acompañado de una translocación cromosómica, lo que indicaba que una translocación afecta la regulación del oncogene c-myc (34)(37).

La determinación de la secuencia nucleotídica del oncogene c-myc (18), revela, que el primer exón, el cual consiste de más de 650 pares de bases, no codifica para proteínas activas. Aún así, - la secuencia del primer exón se ha conservado no en su totalidad filogenéticamente hablando, en contraste con lo encontrado usualmente para segmentos de genes que no codifican, lo cual sugiere - que el primer exón sirve de alguna manera en alguna función esencial. La función del primer exón puede ser el controlar la expresión del gene myc. El primer exón contiene un segmento de casi 70 pares de bases, el cual es homólogo a un segmento del segundo exón. Estos segmentos pueden combinarse para formar una estructura (tallo y asa), la cual podría impedir la traducción del RNA mensajero del oncogene c-myc. La pérdida del primer exón puede dar lugar a un - incremento de los productos del oncogene c-myc y un aumento en la vida media del RNA mensajero de myc (18)(17).

En estudios recientes (44), se observó el aumento de expresión de 15 oncogenes celulares en 20 tumores diferentes encontrándose una mayor incidencia en el oncogene c-myc (93%).

Así mismo el grupo de Danuta Kozbor y Carlo M. Croce (8), encontró la expresión del oncogene c-myc amplificada en una de cinco líneas celulares de carcinoma humano (representando el 20%). En otros estudios se observó que el oncogene myc se encuentra amplificado en diferentes cánceres, como se observa en la tabla II.

Estudios más recientes, muestran que existe una combinación de la amplificación de c-myc y c-k-ras, acompañados por una activación por mutación puntual de c-k-ras en cáncer humano de pulmón - (51).

Para el estudio de los oncogenes se cuenta con técnicas de Biología molecular ya establecidas (32). El oncogene se aísla a partir de muestras de DNA humano obtenido de los tumores, el cual se digiere con enzimas de restricción para poder separar el fragmento que contiene el oncogene, esquema 3.

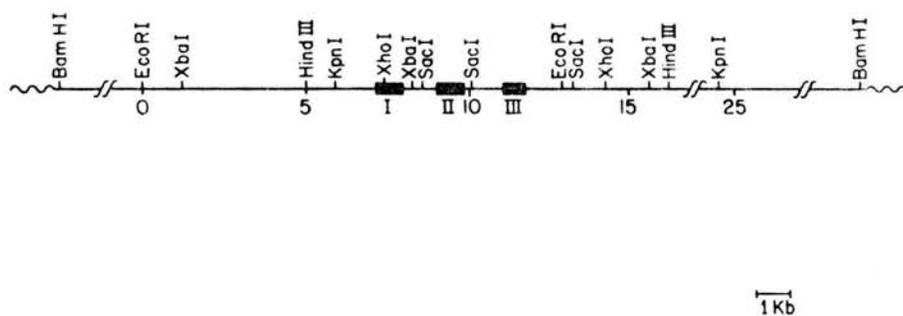
Estos fragmentos se separan por electroforesis para luego ser clonados en vehículos tales como el plásmido pBR322 etc. (5). De esta manera se construyen los plásmidos híbridos, y éstos se introducen (transformación) a bacterias (p. ejem. Cepa Escherichia coli C-600, Cepa E. coli HB-101 etc.), para su mejor manipulación y uso en experimentos de hibridización con DNA tumoral, para la determinación de las posibles alteraciones del oncogene (amplificación o rearreglo cromosómico).

Para poder llevar a cabo estas determinaciones, es necesario tener la seguridad de estar manejando el plásmido construido (y por lo tanto el oncogene de interés). Para este efecto el Q.B.P. Rodolfo

TABLA 11: AMPLIFICACION DE ONCOGENE MYC HUMANO

ONCOGENE	TUMOR	GRADO DE AMPLIFICACION	REFERENCIA
C-myc	Línea celular de leucemia promielocítica HL-60 y tumor primario	20 X	(q)
C-myc	Línea celular APUDoma, COLO 320	40 X	(1)
C-myc	Líneas celulares de Carcinoma de pulmón en células pequeñas ( aunantes )	5-30 X	(31)
N-myc	Neuroblastoma primario ( Estadio 111 y IV ) y líneas celulares de Neuroblastoma	5-1000 X	(45),(46),(6)
N-myc	Línea celular de Retinoblastoma, Y 79 y Tumores primarios	10-200 X	(6),(29)
N-myc	Líneas celulares de carcinoma de pulmón en células pequeñas y tumor	50 X	(53)
L-myc	Línea celular de pulmon SCLC	10-20 X	(33)
C-myc	Tumores primarios cervicouterinos ( Estadio 11A )	2-12 X	

\* Datos reportados en el presente trabajo.



ESQUEMA 3. MAPA DE RESTRICCIÓN DEL ONCOGENE  
c-myc HUMANO.

Ocadiz Delgado, caracterizó el plásmido  $\mu$ LV-Xba (donado por el Dr. Dominique Stehelin del Instituto Pasteur), el cual contiene un fragmento del oncogene humano c-myc (primer exón) clonado en el vehículo pBR322 para utilizarlo como sonda marcada ( $^{32}\text{P}$ ), en el estudio de la amplificación o rearrreglo de este oncogene en muestras tumorales de cáncer cervicouterino.

El empleo de estas técnicas específicas de gran sensibilidad, nos permitirán hacer una valoración a nivel molecular de los oncogenes en células tumorales.

Cabe mencionar que en México no se cuenta con este tipo de estudios siendo el presente trabajo, el inicio del análisis de los oncogenes de tumores malignos en el país, sin olvidar las colaboraciones de : Q.B.P. Rodolfo Ocadiz Delgado, Q.B.P. Mauricio Salcedo Vargas y el Biol. René Saucedo López, bajo asesoría del Dr. Patricio Gariglio Vidal del CINVESTAV, I.P.N.

El presente trabajo corresponde a un proyecto del CINVESTAV-UANL, con apoyo del Centro Médico la Raza y Centro Médico Nacional, el cual tiene como objetivo general el de cuantificar la expresión y las alteraciones del oncogene c-myc en tumores cervicouterinos.

**OBJETIVOS:****OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO:**

Determinar y caracterizar el comportamiento de el oncogene c-myc humano, que pudiese estar implicado en carcinoma cervicouterino; ésto podría llevarnos a la detección de un patrón anormal (amplificación o rearrreglo del oncogene) en diferentes casos - clínicos.

**OBJETIVO PARTICULAR:**

Determinar las posibles alteraciones del oncogene c-myc humano en cáncer cervicouterino.

## MATERIALES Y METODOS:

### I.- MATERIAL:

#### 1).- MATERIAL BIOLÓGICO:

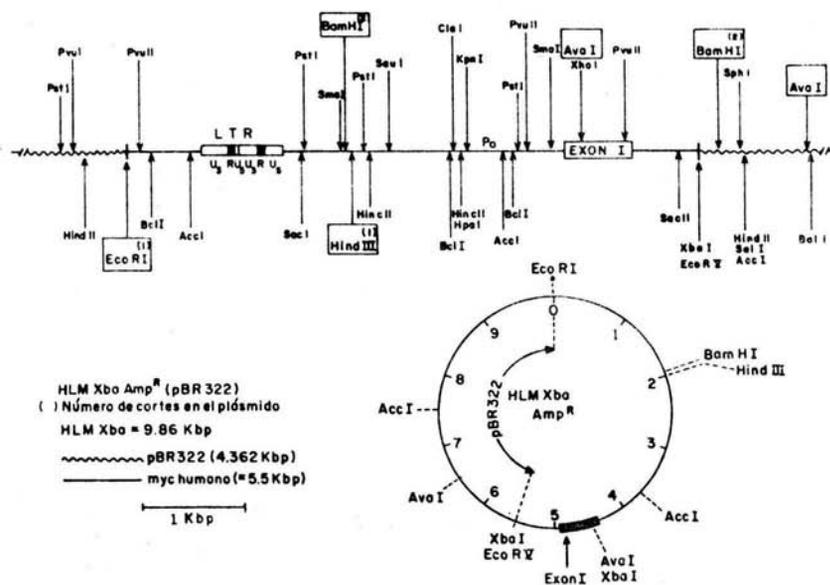
-Cepa K12 de Escherichia coli, que contiene el plásmido HLI-Xba (9.86 Kb.) donado por el Dr. Dominique Stehelin del Instituto Pasteur (Lille, Francia).

Este plásmido confiere la resistencia a ampicilina y es -- tetraciclina sensible, el plásmido consiste en un fragmento del -- oncogene humano c-myc (5.5 Kb.), clonado en el vehículo de clonación p BR 322 (5). Adjunto con la cepa se tiene el mapa de restricción, esquema 4, el cual fue caracterizado por el Q.B.P. Rodolfo Ocadiz Delgado.

Como se observa en el mapa (esquema 4); el plásmido sólo -- contiene la región del primer exón (5.5 Kb.) del oncogene c-myc. El vehículo, pBR 322 (4.361 Kb.), perdió un fragmento pequeño de un poco más de 150 pares de bases al hacer la construcción, el -- sitio Xba I fue reconstituido, (información proporcionada por el Dr. Dominique Stehelin por correspondencia).

La cepa crece bien en medio de cultivo Luria, con ampicilina a una concentración de 50µg/ml, y se mantiene tanto en gelosa -- especial (medio de conservación a medio plazo 6 meses), así como en medio Luria-ampicilina en placa (resiembras semanales).

-Muestras de tejido de diferentes pacientes con cáncer cervico-uterino de aproximadamente 5g por muestra, así como tejido sano. Estas muestras fueron donadas por el Centro Médico la Raza y el -- Centro Médico Nacional, por medio del Q.B.P. Miguel Cruz López y el Dr. Carlos Cordillo respectivamente.



ESQUEMA 4. MAPA DE RESTRICCIÓN DEL PLÁSMIDO HLM-Xba QUE CONTIENE EL PRIMER EXON DEL ONCOGENE c-myc.

-Marcador de peso molecular: Se utilizó el DNA del fago lambda cortado con la enzima de restricción Hind III. El valor en pares de bases de cada una de las bandas que aparecen en los geles se describen en la siguiente tabla:

FRAGMENTO	Kb	DALTONES
1	23.1	$15 \times 10^6$
2	9.4	$6.12 \times 10^6$
3	6.5	$4.26 \times 10^6$
4	4.3	$2.84 \times 10^6$
5	2.3	$1.51 \times 10^6$
6	2.0	$1.32 \times 10^6$
7	0.5	$0.37 \times 10^6$

## 2).- MEDIOS DE CULTIVO:

-Gelosa especial (medio de conservación de cepas)

Base agar sangre	20g
Peptona	2.5g
Agar	15.5g
Extracto de Carne	1.5g

Agregar agua destilada a 1 litro (esterilizar en autoclave)

-L B; L-Broth; Luria.

Bactotripton	10g
Extracto de levadura	5g
Cloruro de Sodio	10g

Agua destilada a 1 litro (pH 7.0), (esterilizar en autoclave)

## 3).- SOLUCIONES:

-Acetato de Sodio 1 M.

-Acetato de potasio 5 M, pH 4.8

Acetato de potasio 5 M.            60ml

Acido acético glacial            11.5ml

Agua bidestilada                    28.5ml

Ajustar a pH 4.8 con ácido acético glacial.

-Ampicilina.

25mg/ml en agua bidestilada, esterilizar por filtración y almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ ., concentración de trabajo: 35-50 $\mu\text{g/ml}$ .

-Bromuro de etidio (10mg/ml).

Bromuro de etidio                    0.1g

Agua bidestilada                    10ml

Agitar varias horas, almacenar en frascos ámbar a  $4^{\circ}\text{C}$ . Es un agente mutagénico. Usar guantes y máscara para trabajarlo.

-Cloruro de Magnesio 1 M.

-Cloranfenicol.

34mg/ml en etanol al 100%, almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

-Cloruro de Sodio 2 M. y 0.9%.

-Colorante 6X (indicador para seguir corrimiento en geles de agarosa)

Azul de bromofenol                    25%

Sacarosa en agua (peso-volumen) 40%

Almacenar a  $4^{\circ}\text{C}$ .

-DNA desnaturalizado de esperma de salmón.

DNA (Sigma tipo III de sal de sodio), en agua a 10mg/ml

Agitar de 2-4 horas a  $t^{\circ}\text{C}$ . ambiente. Romper el DNA por pasajes en jeringa. Hervir 10 minutos y guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$  en alicuotas.

-EDTA pH 8.0 ; 0.5 y 0.25 M.

-Formamida (desionizada):

Formamida 50ml

Resina de intercambio

iónico (Bio-Rad AG 501-X 8) 5g

Agitar 30 minutos a temperatura ambiente.

-Glucosa 1 M.

-Líquido de centelleo:

PPO (2,5 difeniloxazol) 5g

POPOP (p-bis-(2-(5-feniloxazolil))-bengeno 0.3g

llevar a un litro con tolueno.

-Solución amortiguadora del marcador de peso molecular:

Tris-HCl (pH 8.0) 2 mM

EDTA 1 mM

NaCl 20 mM

-Solución amortiguadora de lisis:

Tris-HCl (pH 8.0) 20 mM

Na<sup>+</sup>Ac<sup>-</sup> 300 mM

EDTA 1 mM

Ajustar a pH 7.5, almacenar a 4°C.

-Solución amortiguadora para la enzima Eco RI 10X:

Tris-HCl (pH 8.0) 500 mM

Cloruro de Magnesio 100 mM

Cloruro de Sodio 500 mM

Ditiotreitol 10 mM

-Solución amortiguadora de columna:

NaCl 150 mM

EDTA 10 mM

SDS 0.1 %

Tris-HCl (pH 7,5) 50 mM

-Solución amortiguadora "Core-buffer" 10X:

Tris-HCl (pH 8.0) 500 mM

Cloruro de Magnesio 100 mM

Cloruro de Sodio 500 mM

Almacenar a -20°C.

-Solución para prehibridación:

Formamida 50 %

Sol. Denhart's 5 X

SSPE 5 X

SDS 0.1 %

DNA de esperma de Salmón 100 µg/ml

-Solución para hibridación:

Formamida 50 %

Sol. Denhardt's 5 X

SSPE 5 X

SDS 0.1 %

DNA de esperma de Salmón 100 µg/ml

DNA con alfa-(<sup>32</sup>P)d CTP (1x10<sup>7</sup>-1x10<sup>8</sup> cpm)

EDTA 0.01 M

-Solución Denhardt's 50 X:

Ficoll 5 g

Polivinilpirrolidona 5 g

Albúmina Bovina 5 g

Agua bidestilada a 500 ml

Esterilizar por filtración (filtro milipore 0.45 µm)

-Solución amortiguadora TE (Tris-EDTA):

Tris-HCl (pH 7.5)            10 mM

EDTA                            1 mM

Ajustar a pH 7.5

-Solución amortiguadora de corrida TPE (Tris-fosfatos-EDTA):

Tris-fosfatos                0.08 M

EDTA                            0.008 M

-Solución desnaturalizadora:

NaCl                    1.5 M

NaOH                    0.5 M

-Solución neutralizadora:

Tris-HCl (pH 8.0)        1 M

NaCl                    1.5 M

-Solución SSC (Citrato de sodio salino) 20 X:

NaCl                    175.3 g

Citrato de Sodio 88.2 g

Ajustar a pH 7.0 con NaOH, aforar a 1 litro con agua.

-Solución I, para aislamiento de plásmido:

Glucosa                    50 mM

Tris-HCl (pH 8.0)        25 mM

EDTA                        10 mM

Lisozima                    5 mg/ml Agregar en el momento de usar.

-SSPE (Solución salina fosfatos EDTA) 20 X:

NaCl                        3.6 M

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O (pH 7.4) 200 mM

EDTA                        20 mM

Ajustar a pH 7.4

-Soluciones para lavados de hibridación:

Solución I	SSC 20X	50 ml
	SDS 10%	25 ml
Solución II	SSC 20X	50 ml
	SDS 10%	5 ml
Solución III	SSC 20X	2.5 ml
	SDS 10%	25 ml

Llevar en todos los casos a 500 ml con agua bidestilada.

-Solución II, para aislamiento de plásmido:

NaOH	0.2 N
SDS	1 %

-SDS (dodecil sulfato de sodio) al 10 %

#### 4).- MATERIAL ESPECIAL:

-Equipo para realizar la técnica de rompimiento y sustitución (Nick-Translation Kit, Amersham) (2).

Solución 1.- Solución amortiguadora con nucleótidos.

Solución 2.- Solución enzimática (DNA polimerasa I y DNasa I).

Solución 3.- Solución acarreadora de DNA.

Solución 4.- Solución de DNA estandar.

Solución 5.- Agua desionizada.

-Bolsas de diálisis:

Sectrapor 0.29 mm. Calentar a ebullición 10 minutos con bicarbonato de sodio al 2 %; EDTA 1 mM, enjuagar. Esterilizar al autoclave, guardar a 4°C.

-Sephadex G-50:

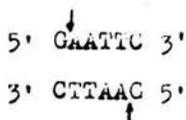
Agregar amortiguador TE (pH 8.0), dejar a temperatura ambiente toda la noche, ó a 65°C de 1 a 2 horas, ó al autoclave 15 minutos. Decantar el sobrenadante y reemplazar a un volumen igual

de TE (pH 8.0), almacenar a 4°C en botella con tapón de rosca.

5).- ENZIMAS:

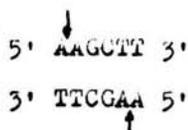
- Eco RI .- Aislada de E. coli N1 13

Sitio de corte y secuencia



- Hind III .- Aislada de Haemophilus influenzae Rd

Sitio de corte y secuencia



**Nota:** Una unidad de enzima de restricción, es definida como - la cantidad de enzima requerida para la completa digestión de 1 µg de DNA del fago lambda en 60 minutos, a 37°C y a pH 7.5.

- RNase .- Solución patrón 10mg/ml en Tris-HCl 10 mM, pH 7.5; NaCl 15 mM. Calentar a 100°C durante 15 minutos y permitir enfriar a temperatura ambiente. Guardar alícuotas a -20°C  
Concentración de trabajo: 50µg/ml.
- Lisozima .- Preparar en el momento de utilizar, a una concentración de 5mg/ml.
- Proteinasa K .- Stock 20mg/ml en agua, almacenar a -20°C  
concentración de reacción 450µg/ml.

## II.- METODOS:

### 1).- CRECIMIENTO DE LA CEPA E. coli Y AMPLIFICACION DEL PLASMIDO HLM-Xba;

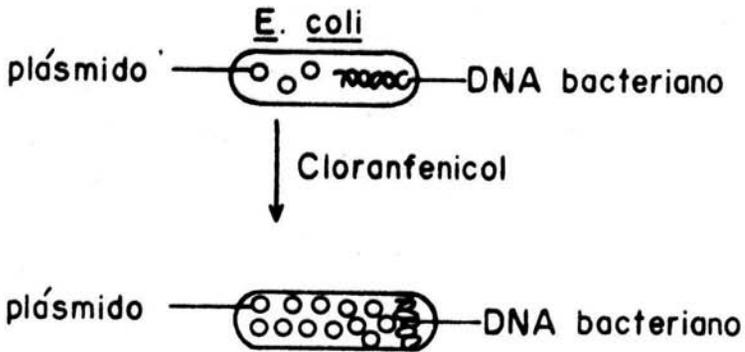
La bacteria Escherichia coli que contiene al plásmido HLM-Xba es mantenida en placas de medio Luria-ampicilina a 4°C; siempre se trabaja la ampicilina a una concentración de 50 µg/ml.

- a).- Tomar un inóculo de bacterias a partir de la placa y sembrar en 25 ml de medio Luria con ampicilina, e incubar a 37°C en agitación constante (200 rpm), durante toda la noche (12 a 16 horas).
- b).- Inocular con los 25 ml de cultivo del paso anterior, a un matraz conteniendo 1 litro de medio de cultivo Luria-ampicilina. Incubar a 37°C en agitación constante durante 2.5 horas.
- c).- Agregar cloranfenicol a una concentración final de 170 µg/ml, para amplificación del plásmido (esquema 5), incubar toda la noche (12 a 16 horas), a 37°C, con agitación, (nunca se debe exceder de 16 horas).
- d).- Determinar crecimiento midiendo la densidad óptica (OD) a 600 nm. Considerando que  $1 \text{ OD}_{600} = 8 \times 10^8$  cél/ml de cultivo.  
Se realizaron dos modificaciones a esta técnica, por un lado se obtuvo un cultivo de la misma forma que el anterior, pero sin hacer amplificación con cloranfenicol.

### 2).- AISLAMIENTO DEL PLASMIDO HLM-Xba, LISIS POR ALCALI (32).

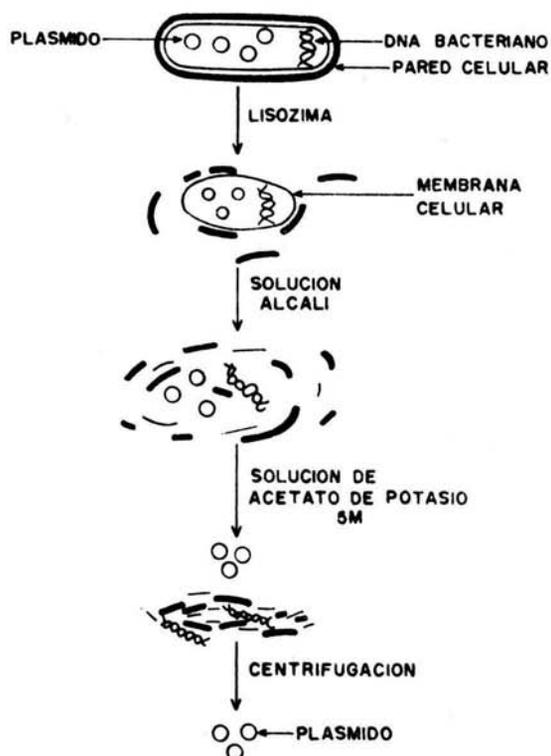
Para obtener una eficiencia aceptable en el aislamiento del plásmido, es necesario no exceder los tiempos especificados y conservar el material en frío.

- a).- Centrifugar el cultivo obtenido anteriormente en jarras de -



ESQUEMA 5. AMPLIFICACION DEL PLASMIDO

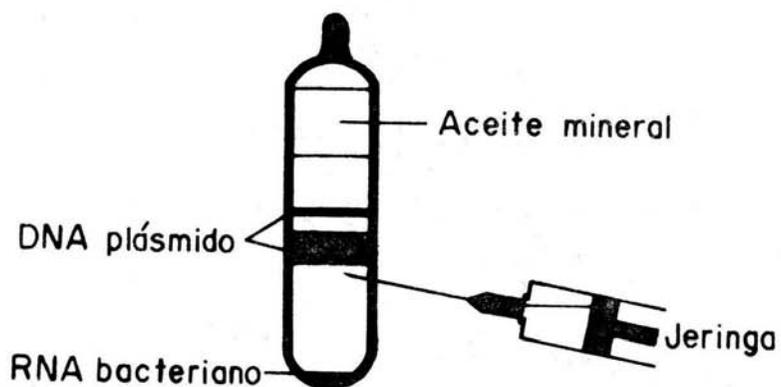
- 500 ml estériles para rotor GS-3, centrifugar a 7000 rpm - durante 10 minutos a 4°C, en una centrífuga Sorvall RC-5B.
- b).- Desechar el sobrenadante en un recipiente que contenga hipoclorito de sodio 30 % (v/v).
- c).- Resuspender el paquete en 20 ml de solución I (ver soluciones). Consiguiendo con esto romper la pared celular (esquema 5).
- d).- Pasar esta suspensión a un tubo COREX de 150 ml, tapar el tubo con parafilm, mezclar delicadamente y dejar 5 minutos a temperatura ambiente.
- e).- Añadir 40 ml de solución II (ver soluciones), recién preparada y mezclar suavemente (observar la viscosidad de la solución), dejar 10 minutos en hielo, (las células se rompen)(esquema 6).
- f).- Añadir 30 ml de la solución fría de acetato de potasio 5 M, - tapar y mezclar suavemente de dos a cuatro veces, observar un precipitado grueso de color blanco, dejar 10 minutos en hielo. (precipitan los restos celulares y el SDS, menos el plásmido) (esquema 6).
- g).- Centrifugar esta suspensión para separar el precipitado del sobrenadante, a 7000 rpm durante una hora a 4°C en un rotor GSA, en una centrífuga Sorvall RC-5B.
- h).- Transferir el sobrenadante a tubos COREX de 150 ml, limpios y estériles.
- i).- Añadir 0.6 volúmenes de isopropanol, tapar y mezclar por inversión,dejar 15 minutos a temperatura ambiente para precipitar el plásmido.
- j).- Centrifugar a 7000 rpm durante una hora a 15°C, en una centrífuga Sorvall RC-5B, no centrifugar a 4°C, porque esto ayuda a la precipitación de sales.



ESQUEMA 6. AISLAMIENTO DEL PLAMIDO

- k).- Eliminar el sobrenadante, lavar con etanol al 70 % y secar al vacío 16 horas a 4°C.
- l).- Resuspender el paquete en 5 ml de solución amortiguadora TE (ver soluciones), y guardar a 4°C.
- 3).- PURIFICACION DEL PLASMIDO pLM-Xba (32).  
Equilibrio en gradiente isopícnico de cloruro de cesio-bromuro de etidio:
- a).- Incubar el plásmido resuspendido en amortiguador TE con RNAsa a una concentración final de 50 µg/ml, durante 45 minutos a 37°C.
- b).- Disolver 30 g de cloruro de cesio en 35 ml de amortiguador TE.
- c).- Transferir con una jeringa estéril, la solución de cloruro de cesio a un tubo de polialómero para el rotor VTi 50 de la ultracentrifuga Beckman L8-55.
- d).- Transferir el plásmido con una jeringa estéril, con aguja de gran calibre (p. ej. 18 X 32). Este paso debe hacerse lentamente para no romper el plásmido.
- e).- Añadir 200 µl de bromuro de etidio (Bet. 10mg/ml); USAR GUANTES DE AQUI EN ADELANTE.  
Mezclar gentilmente por inversión y cubrir al tubo de la luz.
- f).- Eliminar todas las burbujas, debido a que el tubo se puede colapsar al ser centrifugado a alta velocidad. Además, para evitar lo anterior, se agrega al final una capa de aceite mineral.
- g).- Balancear el tubo con un contrapeso y sellar el tubo al calor.
- h).- Centrifugar en una ultracentrifuga L8-55 Beckman usando un rotor vertical de titanio VTi-50, a 45,000 rpm durante 16 horas a un rango de 15 a 25°C al vacío y sin freno.

- i).- Después de la centrifugación sacar el tubo con mucho cuidado para evitar deshacer el gradiente formado y observar contra una lámpara de UV de onda larga; comúnmente se observan dos bandas. Para coleccionar las bandas es necesario cortar la parte superior del tubo y por punción lateral (esquema 7), usando una jeringa extraer lentamente las bandas presentes por separado.
  - j).- Desechar el resto del tubo en un depósito especial para cancerígenos.
  - k).- Para eliminar el bromuro de etidio en las muestras coleccionadas, se hacen extracciones con alcohol isoamílico, un volumen, se mezcla vigorosamente, y se centrifuga a 8000 rpm durante 10 minutos a 15°C en un rotor SS-34.
  - l).- Se elimina la fase superior (orgánica). Repetir este procedimiento de dos a cuatro veces hasta que desaparezca el color rosa de la fase orgánica.
  - m).- Dializar la fase acuosa contra amortiguador TE a 4°C, para eliminar el cloruro de cesio, (hacer dos cambios de 2 litros cada uno).
- 4).- CONCENTRACION DEL PLASMIDO (32).
- a).- Agregar 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío por cada ml. de solución, y ajustar a 100 mM de cloruro de sodio. Mezclar gentilmente.
  - b).- Dejar a -20°C durante toda la noche ó a -70°C durante 40 minutos.
  - c).- Centrifugar a 10,000 rpm durante 30 minutos en un rotor HB-4.
  - d).- Resuspender el paquete en un mínimo volumen de TE (p. ej. 100-200 µl). Hacer una dilución 1:100 en TE a un volumen mínimo -



ESQUEMA 7. EXTRACCION DE BANDAS EN GRADIENTE  
ISOPICNICO DE CLORURO DE CESIO

de 500  $\mu$ l, y determinar la concentración en un espectrofotómetro Beckman DU-7 leyendo a 260 nm.

5).- EXTRACCION DE DNA TUMORAL (11).

- a).- Cortar el tejido tumoral (cáncer cervicouterino), aproximadamente 0.5 g.
- b).- Homogenizar el tejido, con una solución de NaCl 0.9 % en un homogenizador tipo Potter, hasta disgregar lo más posible el tejido.
- c).- Realizar varios lavados del tejido con NaCl 0.9 %, aproximadamente 3 ml por lavado, para eliminar la mayor sangre posible.
- d).- Resuspender el tejido en solución amortiguadora de lisis.
- e).- Añadir Proteinasa K y SDS a una concentración final de 450 $\mu$ g/ml y 0.2 % respectivamente.
- f).- Incubar a 37<sup>o</sup>C con agitación toda la noche (de 12 a 16 horas).
- g).- Realizar de 3 a 4 extracciones de proteínas agregando un volumen de Fenol-Cloroformo (1:1), se toma la fase superior acuosa sin tocar la interfase.
- h).- Realizar de 4 a 6 extracciones del fenol agregando un volumen de éter etílico saturado con agua. Deshechar la fase superior (éter) y guardar la fase inferior.
- i).- Para concentrar el DNA tumoral agregar 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío por cada mililitro de solución, y ajustar a 100 mM de Cloruro de sodio y mezclar gentilmente.
- j).- Dejar a -70<sup>o</sup>C por 40 minutos o a -20<sup>o</sup>C toda la noche.
- k).- Centrifugar a 10,000 rpm durante 20 minutos en un rotor HB-4
- l).- Resuspender el paquete en TE (p. ej. 100  $\mu$ l), hacer una dilución 1:100 ó 1:200 y leer en un espectrofotómetro Beckman DU-7 a 260 nm y determinar la concentración de DNA. Consideran-

do que a 260 nm 1 OD = 50 µg/ml de DNA, y la relación  $OD_{260}/OD_{280} = 1.8$  se refiere a preparaciones puras de DNA(32).

6).- DIGESTION DEL DNA TUMORAL (32)(17).

Una vez determinada la concentración de DNA tumoral digerir con enzimas de restricción ; Eco RI que da un fragmento de 13 Kb donde se encuentra el oncogen (esquema 8), Hind III que da un fragmento de 12 Kb donde se encuentra el oncogen (esquema 8).

Procedimiento:

a).- Mezclar en el siguiente orden:

Solución amortiguadora TE.

Solución amortiguadora para cada enzima.

DNA tumoral.

Enzima.

b).- Incubar a 37°C durante 16 horas, detener la reacción agregando EDTA a una concentración final de 2 mM.

c).- Agregar 4 µl de colorante para electroforesis (ver soluciones), y 2 µl de glicerol al 30 %.

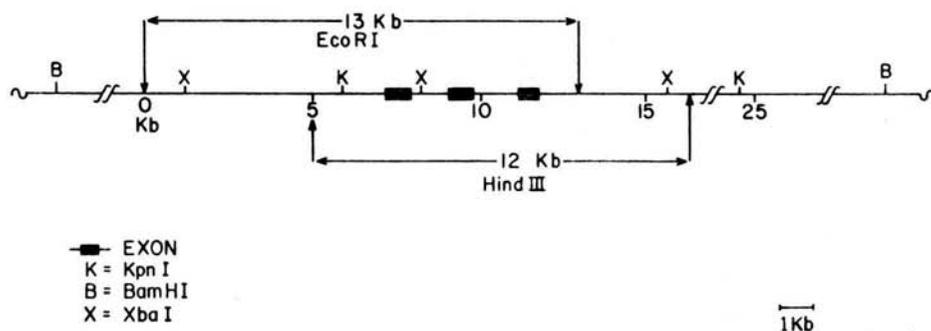
7).- ELECTROFORESIS DE DNA TUMORAL DIGERIDO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN (32).

Realizar la electroforesis en geles de agarosa horizontales de 19 X 13 cm.

a).- Preparar un gel de agarosa al 0.9 %, disolviendo la agarosa por ebullición en solución amortiguadora de corrida TPE(ver soluciones), incubar a 50°C.

b).- Preparar la cámara de electroforesis nivelándola perfectamente para que las muestras corran de manera recta. Colocar el peine con el número de carriles deseados.

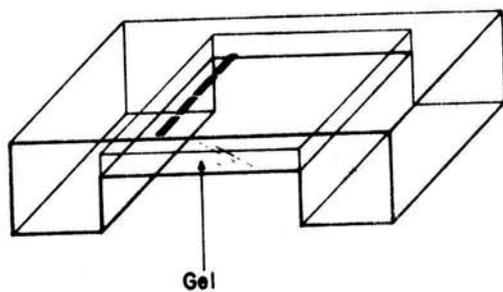
c).- Una vez que la temperatura de la agarosa es de 50°C agregar 18 µl (18 µg) de solución patrón de bromuro de etidio, y



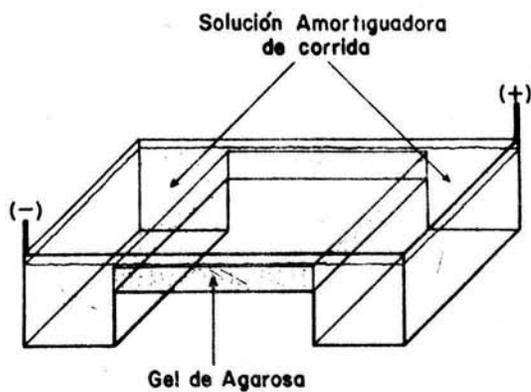
ESQUEMA 8. MAPA DE RESTRICCIÓN DEL ONCOGENE *c-myc*  
 HUMANO, SITIOS Eco RI E Hind III

mezclar. Vaciar la agarosa en la cámara y dejar gelificar.

- d).- Desprender con mucho cuidado el peine una vez gelificada la agarosa (esquema 9).
- e).- Llenar lentamente el depósito con solución amortiguadora TPE de tal manera que al finalizar, el nivel de la solución sobrepase la superficie del gel (esquema 10).
- f).- Conectar las terminales de una fuente de poder (voltaje constante), a los electrodos como se muestra en (esquema 10). Correr la electroforesis a 50 V. durante 16 horas, a temperatura ambiente.
- g).- Observar el gel en un trasiluminador de U.V.; concluido el tiempo de corrida, y tomar fotos con una cámara Polaroid MP-4, utilizando película tipo 57 ASA 3000; Polaroid.
- analizar el gel con la foto obtenida de la siguiente manera:
- i).- Graficar el corrimiento del marcador de peso molecular colocándolo en las abscisas los centímetros recorridos y en las ordenadas el logaritmo del peso molecular en pares de bases; ésto nos permite estimar el peso molecular de las bandas que se obtengan.
- 8).- TRANSFERENCIA TIPO SOUTHERN A FILTRO DE NITROCELULOSA DEL DNA TUMORAL (32)(47).
- La transferencia se lleva a cabo por el principio de capilaridad.
- a).- Al gel se le da un tratamiento con solución desnaturalizadora (ver soluciones), durante una hora con agitación lenta.
- b).- Lavar el gel varias veces con agua bidestilada y poner en solución neutralizadora (ver soluciones), durante una hora, con agitación lenta.



ESQUEMA 9.



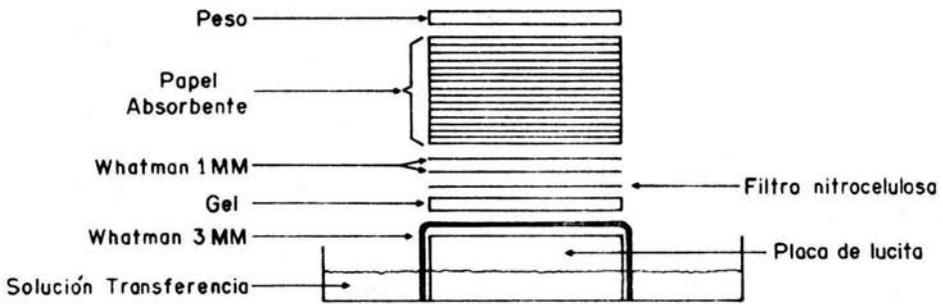
ESQUEMA 10.

CAMARA DE ELECTROFORESIS

- c).- Colocar solución amortiguadora SSC 10 X (ver soluciones), - poner una placa de modo de poder hacer un puente con papel - Whatman 3 MM, humedecido previamente con solución SSC 10 X. Voltear el gel de agarosa y colocarlo encima del papel - Whatman 3 MM. Eliminar todas las burbujas; cortar al gel su parte superior (arriba de los pozos), y una esquina de la - parte inferior del gel como referencia.
- Sumergir el filtro de nitrocelulosa por 2 minutos en una solución SSC 2 X.
- Colocar cuidadosamente el filtro sobre el gel, eliminar burbujas. Humedecer dos papeles Whatman 1 MM en solución SSC 2X y colocarlos sobre el filtro, eliminar burbujas.
- Colocar sobre el papel Whatman 1 MM de 7 a 8 centímetros de altura de toallas de papel absorbente. Colocar una placa sobre las toallas y sobre ésta un peso de aproximadamente 500 g - (esquema 11).
- El objetivo es 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 sean eluidos del gel y depositados en el filtro de nitrocelulosa.
- La transferencia se lleva a cabo de 18 a 20 horas. Después de este tiempo secar el papel horneando dos horas a 80°C al - vacío.

9).- MARCAJE DEL PLASMIDO HLM-Xba POR NICK TRASLATION PARA USARSE COMO SONDA RADIOACTIVA (41)(2).

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



ESQUEMA 11. TRANSFERENCIA DE DNA  
(TIPO SOUTHERN)

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 sustitución (Nick Translation) a lo largo del DNA. Reemplazando los nucleótidos preexistentes con nucleótidos altamente radioactivos, es posible preparar DNA marcado con  $^{32}\text{P}$  - con una alta actividad específica (32)(41).

a).- En un tubo Eppendorf siliconizado agregar en orden:

i)- Solución de DNA (1 ug) 5-10  $\mu\text{l}$  .

ii)- Solución dNTP (nucleótidos) 20  $\mu\text{l}$ , y agitar.

iii)- Solución (alfa- $^{32}\text{P}$ )dCTP, 25-50  $\mu\text{l}$ , y agitar.

iv)- Solución enzimática (DNasa I pancreática y DNA pol. I) 10  $\mu\text{l}$ , agitar suavemente.

v)- Llevar a un volumen final de 100  $\mu\text{l}$  con agua desionizada.

vi)- Incubar a  $15^{\circ}\text{C}$  durante 2.5 horas.

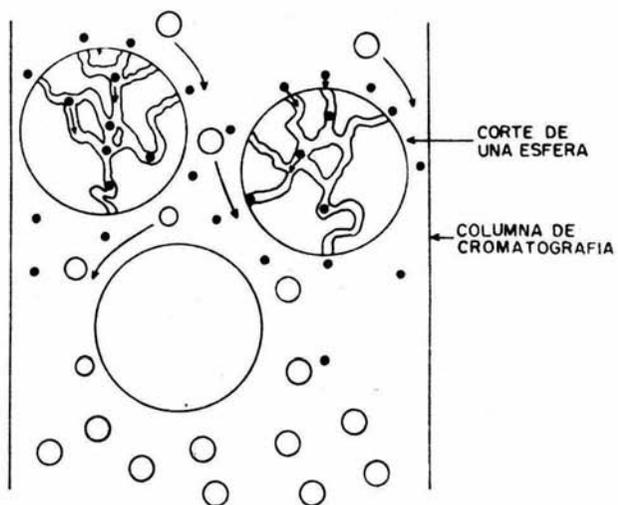
vii)- Detener la reacción agregando 200  $\mu\text{l}$  de EDTA 0.25 M.

b).- Hacer una filtración en gel (esquema 12), empleando una columna con Sephadex G-50, y una solución amortiguadora de columna (ver soluciones).

Al realizar la cromatografía se detectan dos zonas:

La primera que eluye, es el plásmido marcado y la segunda en eluir son nucleótidos no incorporados, se colectan muestras de 1 ml (10 gotas por minuto). Para determinar la actividad específica obtenida, tomar alícuotas de 1  $\mu\text{l}$  de cada muestra colectada y leer en un contador de líquido de centelleo.

Graficar número de muestras contra actividad específica, las muestras con los máximos valores de radioactividad del primer



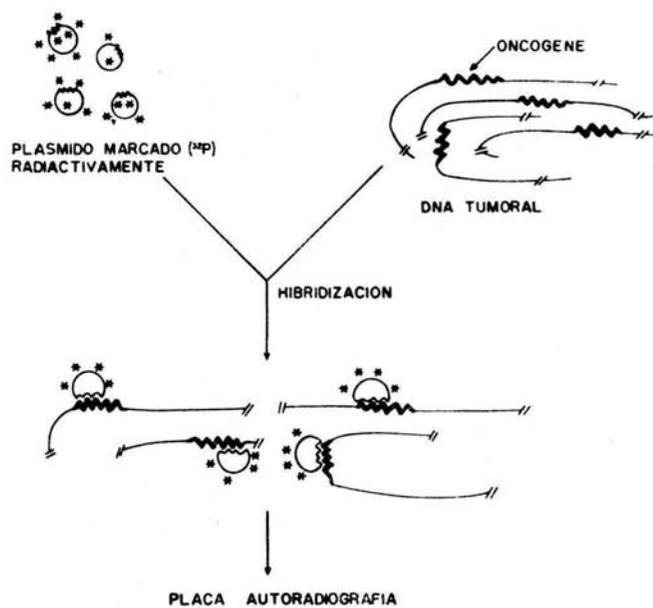
ESQUEMA 12. CROMATOGRAFIA EN GEL  
SEPHADEX G-50

pico se junten (pool). Esta mezcla será el material necesario para detectar genes específicos (sonda radioactiva).

10).- HIBRIDACION (32).

Se explica gráficamente en esquema 15 .

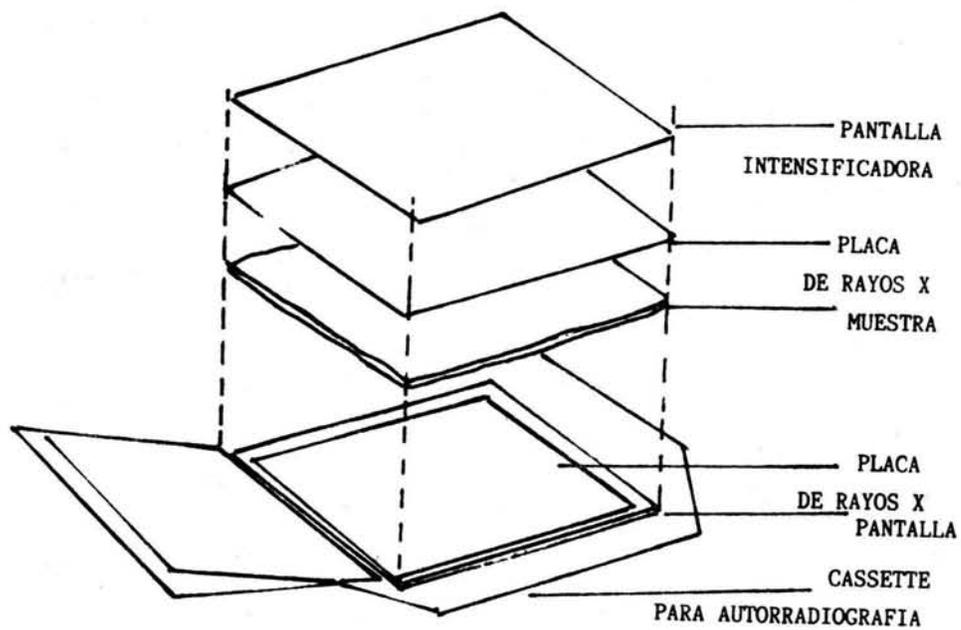
- a).- Una vez que se ha transferido el DNA al filtro de nitrocelulosa, sumergir el filtro en una solución SSC 6X por 5 minutos, inmediatamente colocar el papel humedecido en bolsas de plástico (bolsas Seal-N-save).
- b).- Agregar solución prehibridadora (ver soluciones), 0.2 ml por cada  $\text{cm}^2$  de papel, eliminar las burbujas presentes, sellar la bolsa a calor, e incubar por 20 horas a  $42^{\circ}\text{C}$  sumergida la bolsa en agua.
- c).- Abrir la bolsa por una esquina, después de incubar, eliminar toda la solución prehibridadora y agregar ahora la solución hibridadora (ver soluciones), 50  $\mu\text{l}$  por cada  $\text{cm}^2$  de papel, eliminar las burbujas presentes, sellar la bolsa a calor e incubar durante 16-20 horas (32) a  $42^{\circ}\text{C}$ , sumergida la bolsa en agua.
- d).- Después de la incubación, abrir la bolsa por una esquina y eliminar lo más posible de esta solución. Sacar con mucho cuidado el papel de la bolsa y seguir los siguientes lavados:
- Solución I (ver soluciones) por 5 minutos a temperatura ambiente.
  - Solución II (ver soluciones) por 15 minutos a temperatura ambiente.
  - Solución III (ver soluciones) por 2 horas y un cambio a 30 minutos a  $68^{\circ}\text{C}$ .
- c).- Al término de la incubación, sacar el filtro de la solución



ESQUEMA 13. HIBRIDACION

III y secarlo entre dos papeles Whatman 3 MM, a temperatura ambiente. Después, envolver el filtro con EGAPACK, y someterlo a autorradiografía (esquema 14), usar película KODAK (X-Omat-K) y cassette intensificador KODAK (X-Omatic), a  $-70^{\circ}\text{C}$ , el tiempo depende de la actividad específica usada (tabla III).

- 11).- MICROSCOPIA ELECTRONICA DE MACROMOLECULAS, TECNICA PARA EXTENDIDO DE ACIDOS NUCLEICOS (28).
  - a).- Preparar las rejillas cubriéndolas con parlodión.
  - b).- Preparar la hipofase y colocarla en un recipiente de teflón hasta el borde.
  - c).- Colocar un portaobjetos limpio en la hipofase que será la rampa.
  - d).- Agregar talco sobre la hipofase (opcional).
  - e).- Añadir entre 25 y 50  $\mu\text{l}$  de hiperfase a la rampa, alrededor de 5 a 8 ml antes de la superficie de la hipofase. Agregar constantemente y permitir que corra despacio sobre la superficie de la hipofase.
  - f).- Permitir que se extienda por unos 45-60 segundos.
  - g).- Coger la rejilla para presionar en un ángulo conveniente.
  - h).- Con mucho cuidado pero firmemente, tocar con la rejilla la superficie del extendido, más o menos al diámetro de una rejilla de la base del portaobjetos.
  - i).- Teñir la rejilla con acetato de uranilo  $10^{-5}\text{M}$  (10  $\mu\text{l}$  de acetato de uranilo  $10^{-2}\text{M}$  en 10 ml de etanol al 90 %) durante 20 segundos.
  - j).- Colocar la rejilla en isopentano durante 10 segundos y dejar secar a temperatura ambiente.



ESQUEMA 14. AUTORADIOGRAFIA

TABLA III.

CONDICIONES DE HIBRIDIZACION PARA  
 FILTROS (SOUTHERN) (32)

DNA EN FILTRO	ACTIVIDAD ESPECIFICA De Dna cpm/ug.	CANTIDAD	TIEMPO (horas)
Fragmentos de DNA clonados (100 ng/frag.)	$10^7$	$10^5$ - $10^6$ cpm (0.01-0.1 ug)	3-4
DNA total Eucariótico	$10^8$	$1-5 \times 10^7$ cpm (0.1-0.5 ug)	12-16

- k).- Sombrear con metal pesado Pt:Pd (30/20), sobre una platina -  
rotatoria (Jeol) a 60 rpm , usando un ángulo de sombreado -  
menor de  $10^{\circ}$  por 6 minutos.
- l).- Observar y fotografiar la rejilla usando un microscopio -  
electrónico Carl Zeiss MP4-54.

## RESULTADOS:

### I).- RESULTADOS DE EXPERIMENTOS PRELIMINARES:

- 1)- Crecimiento de la cepa K-12 de E. coli conteniendo el plásmido HLM-Xba, amplificación y aislamiento del plásmido.

El crecimiento de la cepa, fue positivo en medio Luria-ampicilina y negativo en medio con tetraciclina, es decir, la cepa es tetraciclina sensible, ampicilina resistente.

El crecimiento de la cepa se determinó por lecturas de  $A_{600\text{nm}}$  con dos variantes, con amplificación y sin amplificar (con cloranfenicol), observándose los siguientes resultados.

Sin amplificar a 2.5 horas se tiene  $A_{600}=0.4$  ( $32 \times 10^7$  cél/ml); después de 12 horas de crecimiento una  $A_{600}=0.9$  ( $72 \times 10^7$  cél/ml). Amplificado a 2.5 horas se tiene una  $A_{600}=0.4$  ( $32 \times 10^7$  cél/ml), (sin amplificar); después de 12 horas se observa una  $A_{600}=0.6$  ( $48 \times 10^7$  cél/ml). Como podemos observar, el cultivo amplificado presentó menor crecimiento, pero más adelante se observa que tiene mayor cantidad de plásmido.

- 2)- Purificación del DNA plasmídico (Gradiente isopícnico):

El patrón obtenido al realizar los gradientes de cloruro de cesio, fué como el que aparece en la literatura (32)(21).

Este resultado se presenta en la (figura 1).

La cantidad de DNA plasmídico obtenido a partir de los cultivos amplificados y no amplificados, así como sus lecturas de  $A_{260}$  y  $A_{280}$  nm se muestra en la (tabla IV).

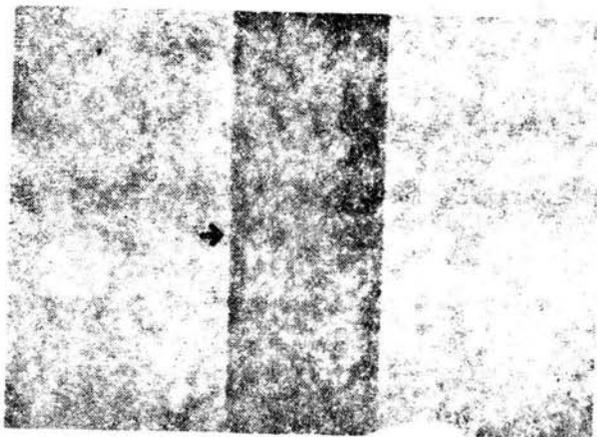
- 3)- Microscopía electrónica del plásmido HLM-Xba (Sonda):

La muestra del plásmido HLM-Xba, fue enviada a la Unidad de Microscopía electrónica en donde se desarrolló la técnica de microscopía electrónica de macromoléculas para visualizar el-

TABLA IV.  
 RENDIMIENTO DEL DNA PLASMIDICO EN DIFERENTES  
 CONDICIONES DE CULTIVO

TIPO DE CULTIVO	As <sub>260</sub>	As <sub>280</sub>	As <sub>260</sub> /As <sub>280</sub> <sup>+</sup>	CONCENTRACION
Amplificado	0.6	0.4	1.4	187ug/750ul
No Amplificado	0.12	0.1	1.2	75ug/750ul

<sup>+</sup>Esta relación da una estimación de la pureza del ácido nucleico.



FUGURA 1. PURIFICACION DEL PLASMIDO HLM-xba.

GRADIENTE ISOPICNICO DE CLORURO DE CESIO.

Se lleva a cabo en una solución saturada de  $\text{CsCl}_2$  usando como colorante bromuro de etidio, se centrifuga a 45,000 rpm. durante 16 horas.

plásmido; el resultado obtenido se muestra en la figura 2.

Al realizar la medición en la fotografía que corresponde al plásmido HLM-Xba con un curvímeter, dicho resultado corresponde efectivamente al plásmido en estudio (9.86 Kb).

El estudio se realizó con la ayuda del Biólogo Pedro Chávez O., que es el encargado de la unidad de microscopía electrónica del departamento de Genética y B. M.

#### 4)- Extracción de DNA tumoral:

Con respecto a esta parte se tuvo una alta eficiencia de extracción de DNA de tejido tumoral cervicouterino humano.

Se trataron 8 tumores (biopsias), obteniéndose en promedio una cantidad de 400 ug de DNA tumoral. Más adelante se dan las concentraciones obtenidas de DNA para cada caso.

#### 5)- Digestión de DNA tumoral:

Se realizaron varias pruebas para determinar la cantidad de unidades de enzima por ug de DNA tumoral y el tiempo de digestión de éstas, obteniéndose el siguiente resultado:

ENZIMA	UNIDADES POR ug DE DNA	TEMPERATURA	TIEMPO
<u>Eco RI</u>	5u/ug	37°C	12 horas
<u>Hind III</u>	4u/ug	30-37°C	16 horas

Una vez estandarizadas estas condiciones fueron utilizadas para los experimentos posteriores.

#### 6)- Transferencia (tipo Southern) a filtros de Nitrocelulosa del DNA tumoral:

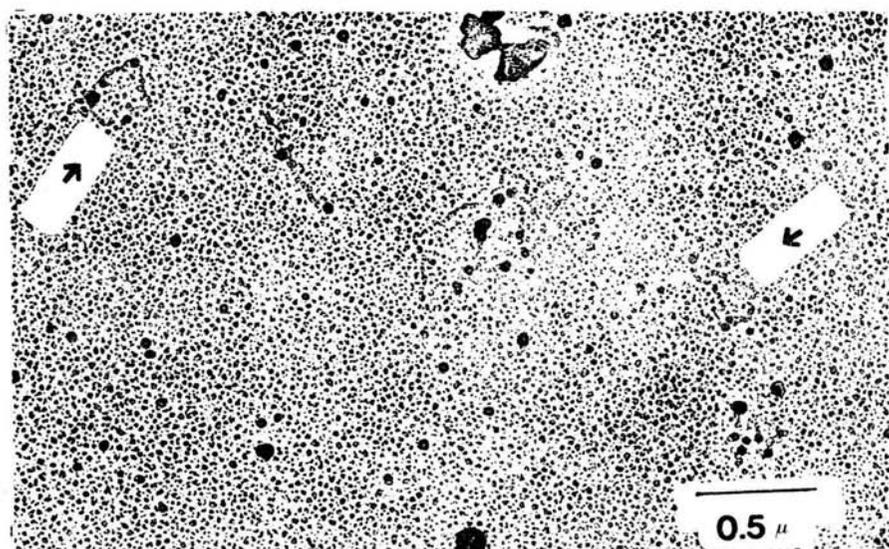


FIGURA 2. FOTOMICROGRAFIA DEL PLASMIDO HLM-Xba 9,500 AUMENTOS MICROSCOPIO ELECTRONICO ZEISS MP-54.

Se tiñe la rejilla con acetato de uranilo  $10^{-5}$ M., se sombrea con metal pesado Pt:Pd (8/20) y se observan diferentes campos al microscopio electrónico.

Al llevar a cabo la transferencia del DNA tumoral al filtro de nitrocelulosa se observó que usando solución SSC 10X como solución de transferencia, existe mayor transferencia del DNA tumoral (digerido con Eco RI e Hind III) al filtro de nitrocelulosa que cuando se usó solución SSC 6X.

La determinación de mayor o menor transferencia del DNA en relación a la concentración de SSC, se hizo con base en los resultados del gel ya transferido, al teñir el gel con bromuro de etidio (5 mg/ml) durante 15 minutos. Cuando se usó SSC 6X el gel presentó algo de fluorescencia un 20% de la que se observa antes de transferir, en tanto que cuando se usó SSC 10X no se observó fluorescencia.

Otro factor que contribuyó a una transferencia óptima fue el tiempo de transferencia el cual fue el óptimo a las 20 horas.

7)- Marcado del plásmido HLM-Xba. (Obtención de una sonda radiactiva):

Se realizó de acuerdo a la técnica descrita en métodos, y la radiactividad obtenida fue de hasta  $9 \times 10^8$  cpm por  $\mu\text{g}$  de DNA plasmídico, lo cual corresponde a una alta actividad ya que se reportan actividades específicas relativamente bajas como se muestra en la tabla V.

TABLA V.  
ACTIVIDAD ESPECIFICA

AUTOR	SONDA	ACT. ESPECIFICA	REFERENCIA
Stehelin D.	c-myc	$2-5 \times 10^8$	(48)
Thomas P.S.	DNA	$2-4 \times 10^8$	(52)

AUTOR	SONDA	ACT. ESPECIFICA	REFERENCIA
Lee, Wen-Hwa	N-myc	$2,5 \times 10^8$	(29)
Danuta K.	c-myc	$2 \times 10^8$	(8)
Hayday A.C.	c-myc	$1-2 \times 10^8$	(24)
Parra F.	c-myc	$9 \times 10^8$	-

Para separar el DNA plasmídico de los nucleótidos no incorporados, así como también comprobar que la radiactividad se encontraba en el plásmido se sometió a una separación en Sephadex G-50.

Después de realizar varios ensayos, se obtuvo un óptimo de incorporación como anteriormente se menciona, se incorporó el 80 % de marca radiactiva.

#### 8)- Hibridación:

Esta se realizó conforme a la técnica antes mencionada, los resultados que se muestran más adelante demuestran una alta eficiencia de hibridación de la sonda (HLM-Xba) con el oncogene c-myc del DNA tumoral.

Se realizaron estudios preliminares corriendo también al plásmido e hibridándolo contra él mismo, observándose un patrón de bandeo en la autorradiografía diferente a cuando se hibridó con DNA tumoral; de esto concluimos que lo que se detecta es el oncogene y que en caso de contaminación con plásmido en el gel se detecte fácilmente. Por esta razón en los resultados que se presentan más adelante no hay ningún control de hibridación, de plásmido contra plásmido.

II).- RESULTADOS (ALTERACION DEL ONCOGENE c-myc EN CANCER CERVICOUTERINO):

Respecto a estos resultados que son los más importantes de esta tesis se presentan: Tomando en cuenta las características - clínicas del donador y el procedimiento realizado para cada caso:

EXPERIMENTO I.

i)- Caso 1.

Tumor cervicouterino número (4):

Nombre: Rico Gerrero Consuelo.

Fecha: 25/II/85.

a)- Datos Clínicos:

Edad 46 años, Cáncer cervicouterino epidermoide estadio II B. Abundante tejido necrótico, inflamación aguda, foco microscópico de carcinoma epidermoide poco diferenciado, invasor. Metaplasia escamosa endocervical. Carcinoma con metastasis.

b)- Extracción de DNA:

Cantidad de tejido: 0.4g

Concentración de DNA: 140 ug/100 ul

Relación  $A_{260}/A_{280}$ : 1.8

c)- Restricción del DNA:

DNA usado: 10 ug

Enzima de restricción: Hind III

Unidades usadas: 4 u/ug

ii)- Caso 2.

Tumor cervicouterino número (5):

Nombre: Miranda Pelcastre Brígida.

Fecha: 7/II/85.

## e)- Datos Clínicos:

Edad 49 años, Cáncer cervicouterino adenoescamoso estadio IV. Sangrado transvaginal escaso, lesión exofítica 3-4 cm, carcinoma adenoescamoso invasor, carcinoma con metastasis.

## b)- Extracción de DNA:

Cantidad de tejido: 0.5 g

Concentración de DNA: 145.8 ug/400 ul.

Relación  $As_{260}/As_{280}$ : 1.7

## c)- Restricción del DNA:

DNA usado: 10 ug

Enzima de restricción: Hind III

Unidades usadas: 4 u/ug

## iii)- Caso 3.

Tumor cervicouterino número (34):

Nombre: Serrano Dominguez Elena.

Fecha: 1/II/85.

## a)- Datos Clínicos:

Edad 58 años, Cáncer cervicouterino epidermoide estadio IIIB. Carcinoma poco diferenciado de células grandes no queratinizante invasor, sale de pelvis.

## b)- Extracción de DNA:

Cantidad de tejido: 0.49 g

Concentración de DNA: 350 ug/250 ul

Relación  $As_{260}/As_{280}$ : 1.78

## c)- Restricción del DNA:

DNA usado: 10 ug

Enzima de restricción: Hind III

Unidades usadas: 4 u/ug

## iv)- Caso 4.

Tumor cervicouterino número (29):

Nombre: Arizmendi Ana Maria.

Fecha: 18/II/85.

## a)- Datos Clínicos:

Edad 49 años, Cáncer cervicouterino epidermoide estadio III B. De 6 años de evolución, lesión exofítica que ocupa todo el cérvix, invade tercio inferior de vagina y paramétrios fijos, sale el carcinoma de pelvis células grandes, invasor.

## b)- Extracción de DNA:

Cantidad de tejido: 0.49 g

Concentración de DNA: 420 ug/400 ul

Relación  $A_{260}/A_{280}$ : 1.7

## c)- Restricción del DNA:

DNA usado: 10 ug

Enzima de restricción: Hind III

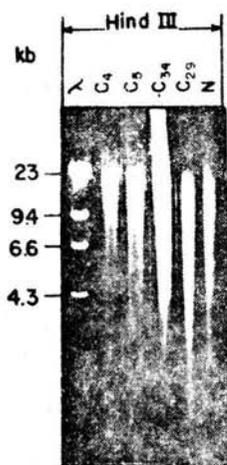
Unidades usadas: 4 u/ug

## v)- DNA control de tejido normal.

Una vez conocida la concentración de el DNA de las diferentes muestras se procedió a correr la electroforésis bajo las condiciones descritas en la metodología. Para determinar el peso molecular se utilizó el DNA del fago lambda tratado con Hind III el cual se corrió en el mismo gel paralelamente con las muestras de DNA tumoral figura 3.

Terminada la electroforésis el DNA se transfirió a filtro de nitrocelulosa siguiendo las condiciones descritas en material y metodos.

Una vez transferido el DNA a filtro de nitrocelulosa se hibridó



Electroforesis del DNA de los tumores cérvico-uterino (C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>34</sub>, C<sub>29</sub>), y tejido normal, digeridos con Hind III.

FIGURA 3.

La electroforesis se realiza en geles de agarosa - horizontales a una concentración de 0.9 % en solución amortiguadora TPE con 18 ug de bromuro de etidio, las muestras se corren a 50 V durante 16 horas a temperatura ambiente.

usando una actividad específica para este caso de  $2 \times 10^8$  cpm.

Una vez hibridado el DNA que se encuentra en el filtro con la sonda, se realizó la autorradiografía.

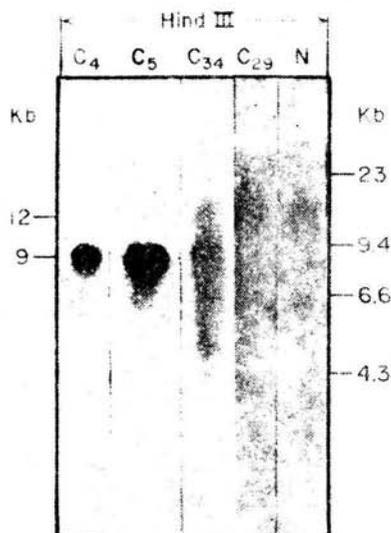
En la figura 4, se presentan los resultados obtenidos en la autorradiografía. Se pueden observar las bandas que corresponden al sitio del DNA tumoral en el que la sonda hibridó.

En algunos casos, como el C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>34</sub> y C<sub>29</sub> se observa una banda más intensa, lo cual nos indica una amplificación del oncogene, pero también se observa un desplazamiento de las bandas a (9 Kb), en caso de C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> y C<sub>34</sub> con respecto a la banda de (12 Kb), que en el caso de C<sub>29</sub> se mantuvo, lo que quiere decir que éste solo está amplificado y que en los otros casos están tanto amplificados como rearrreglados.

Para corroborar ésto y determinar el grado de amplificación - se corrió un Scan (barrido), a la autorradiografía a una OD<sub>560</sub> en un espectrofotómetro Beckman DU-7, observándose lo que se muestra en la figura 5. Por este método y calculando el área bajo la curva, se determinó el grado de amplificación, el cual se muestra en la tabla VI.

TABLA VI

TUMOR CERVICOUTERINO	AMPLIFICACION	DATOS CUANTITATIVOS
C <sub>4</sub>	4X	26.67
C <sub>5</sub>	7X	46.70
C <sub>34</sub>	2X	13.40
C <sub>29</sub>	3X	20.15



Autorradiografía del DNA digerido con Hind III, de los tumores cervico-uterino (C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>34</sub> y C<sub>29</sub>) y tejido normal.

FIGURA 4.

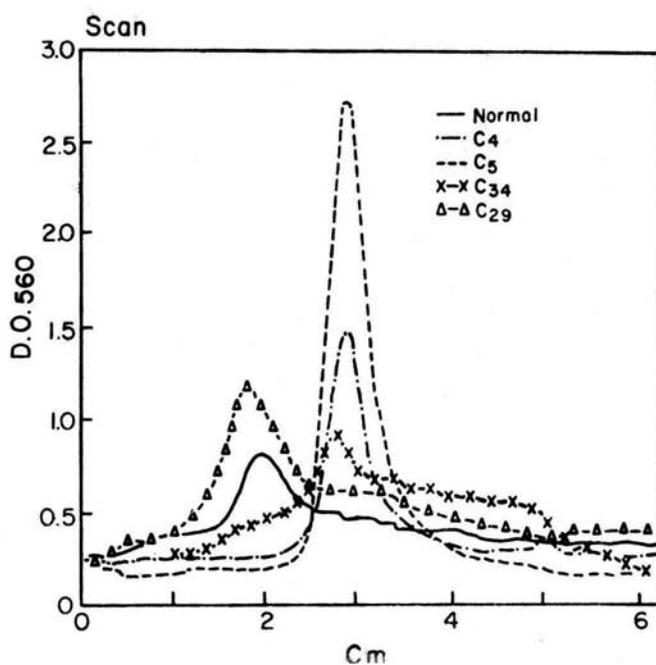


FIGURA 5.

A la autorradiografía se le somete a una densitometría en un espectrofotómetro, leyendo a 560 nm con fuente de luz visible a 10 lecturas por mm.

## EXPERIMENTO II.

## i)- Caso 5.

Tumor cervicouterino número (9):

Nombre: López Padilla Juana.

Fecha: 13/II/85.

## a)- Datos Clínicos:

Edad 62 años, Cáncer cervicouterino epidermoide estadio - III B. Carcinoma invasor moderadamente diferenciado queratinizante de células grandes, sale el carcinoma de pelvis.

## b)- Extracción de DNA:

Cantidad de tejido: 0.5 g

Concentración de DNA: 320 ug/200 ul

Relación  $As_{260}/As_{280}$ : 1.7

## c)- Restricción del DNA:

DNA usado: 10 ug

Enzimas de restricción: Eco RI, Hind III

Unidades usadas: 5 u/ug y 4 u/ug respectivamente.

## ii)- Caso 6.

Tumor cervicouterino número (46):

Nombre: Argullo Gonzales Cleotilde.

Fecha: 14/II/85.

## a)- Datos Clínicos:

Edad 55 años, Cáncer cervicouterino adenoescamoso estadio II A. Carcinoma poco diferenciado queratinizante de células grandes.

## b)- Extracción de DNA:

Cantidad de tejido: 0.19 g

Concentración de DNA: 350 ug/250 ul

Relación  $As_{260}/As_{280}$ : 1.8

## c)- Restricción del DNA:

DNA usado: 10 ug

Enzimas de restricción: Eco RI, Hind III

Unidades usadas: 5 u/ug y 4 u/ug respectivamente.

iii)- DNA control de tejido normal.

Una vez conocida la concentración de el DNA de las diferentes muestras se corrió la electroforésis bajo las condiciones descritas en metodos. Para determinar el peso molecular se utilizó el DNA del fago lambda tratado con Hind III el cual se corrió en el mismo gel (figura 6).

Terminada la electroforésis el DNA se transfirió al filtro de nitrocelulosa siguiendo las condiciones descritas en metodología.

Una vez transferido el DNA a filtro de nitrocelulosa se hibridó usando una actividad específica para este caso de  $2.62 \times 10^8$  cpm.

Una vez hibridado el DNA que se encuentra en el filtro con la sonda se realizó la autorradiografía.

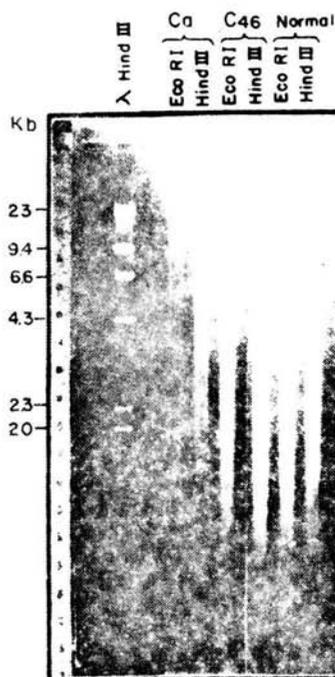
En la figura 7, se presentan los resultados obtenidos en la autorradiografía.

Se puede observar las bandas que corresponden al sitio del DNA tumoral en el que la sonda hibridó.

Tanto para el caso C<sub>9</sub> como para el C<sub>46</sub> se observan las bandas esperadas de 13 Kb para Eco RI y de 12 Kb para Hind III, lo cual nos indica que no hay rearrreglo del oncogene, pero se observan amplificados respecto al normal.

Para corroborar esto y determinar el grado de amplificación, se corrió un Scan (barrido), a la autorradiografía a una OD<sub>560</sub> en un espectrofotómetro Beckman DU-7.

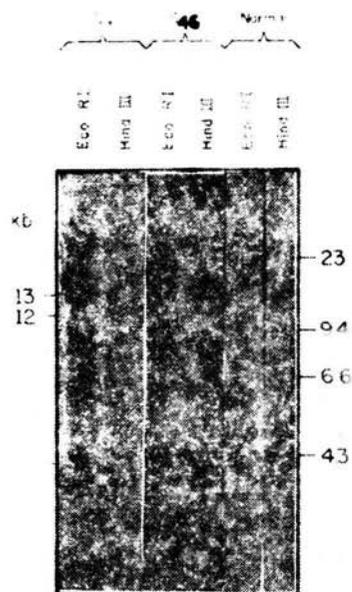
A continuación se muestran los Scan comparativos para el fragmento de 13 Kb, Eco RI (figura 8), y el fragmento de 12 Kb



Electroforesis del DNA de los tumores cervico uterino  
C<sub>9</sub> C<sub>46</sub> y tejido normal digeridos con Eco RI y Hind III

FIGURA 6.

La electroforesis se realiza en geles de agarosa - horizontales a una concentración de 0.9 % en solución amortiguadora TPE con 18 ug de bromuro de etidio, las muestras se corren a 50 V durante 16 horas a temperatura ambiente.



Autorradiografía del DNA digerido con enzimas de restricción (Eco RI e Hind III), de los tumores cérvico-uterino (C<sub>2</sub> y C<sub>3,4</sub>), y tejido normal.

FUGURA 7.

Figura III (figura 9).

Por este método y calculando el área bajo la curva para cada caso, se determinó el grado de amplificación, el cual se muestra en la tabla VII.

TABLA VII.

TUMOR CERVICOUTERINO	AMPLIFICACION	DATOS CUANTITATIVOS
C <sub>9</sub>	2X	10.30
C <sub>46</sub>	4X	22.6

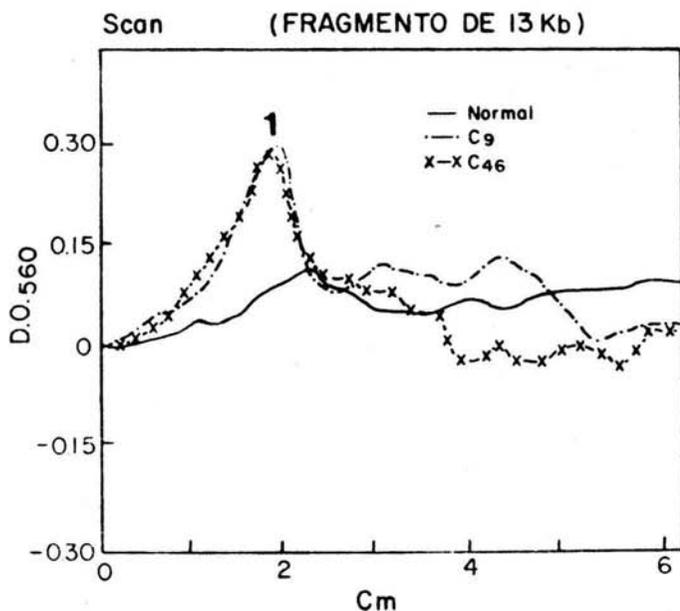


FIGURA 8.

1.- Pico que detecta a la banda de 13 Kb en la autorradiografía, comparación de c-myc entre los tumores C<sub>9</sub> y C<sub>46</sub>.

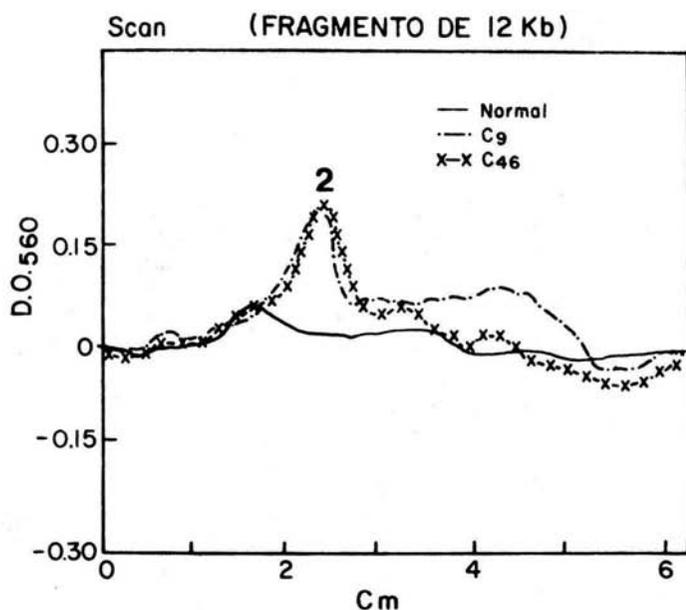


FIGURA 9.

2.- Pico que detecta a la banda de 12 Kb en la autorradiografía, comparación de c-myc entre los tumores C<sub>9</sub> y C<sub>46</sub>.

## EXPERIMENTO III

## i)- Caso 7.

Tumor cervicouterino número (37):

Nombre: Solis Díaz Isabel.

Fecha: 1/II/85

## a)- Datos Clínicos:

Edad 71 años, Cáncer cervicouterino epidermoide estadio - III B. Lesión exofítica necrótica, carcinoma moderadamente diferenciado invasor de células grandes, carcinoma metastático.

## b)- Extracción de DNA:

Cantidad de tejido: 0.37 g.

Concentración de DNA: 350  $\mu\text{g}/250 \mu\text{l}$

Relación  $A_{260}/A_{280}$ : 1.75

## c)- Restricción del DNA:

DNA usado: 10  $\mu\text{g}$

Enzimas de restricción: Eco RI, Hind III

Unidades usadas: 5 u / $\mu\text{g}$  y 4 u/ $\mu\text{g}$  respectivamente.

## ii)- Caso 8.

Tumor cervicouterino número (35):

Nombre: Maldonado Rico María.

Fecha: 29/I/85

## a)- Datos Clínicos:

Edad 38 años, Cáncer cervicouterino epidermoide estadio - II B. Carcinoma invasor, de células grandes no queratinizantes medianamente diferenciado. En una segunda biopsia: carcinoma adenoescamoso inmaduro invasor, abarca todo el cervix con predominio en labio inferior.

## b)- Extracción de DNA:

Cantidad de tejido: 0.52 g

Concentración de DNA: 105.6  $\mu\text{g}/100 \text{ ul}$

Relación  $\text{As}_{260}/\text{As}_{280}$ : 1.79

c)- Restricción del DNA:

DNA usado: 10  $\mu\text{g}$

Enzimas de restricción Eco RI, Hind III

Unidades usadas: 5 u/ $\mu\text{g}$  y 4 u/ $\mu\text{g}$  respectivamente.

iii)- DNA control, tejido normal.

Una vez conocida la concentración del DNA de las diferentes muestras, se corrió la electroforesis bajo las condiciones descritas en la metodología. Para determinar el peso molecular se utilizó el DNA del fago lambda tratado con Hind III, el cual se corrió en el mismo gel (figura 10).

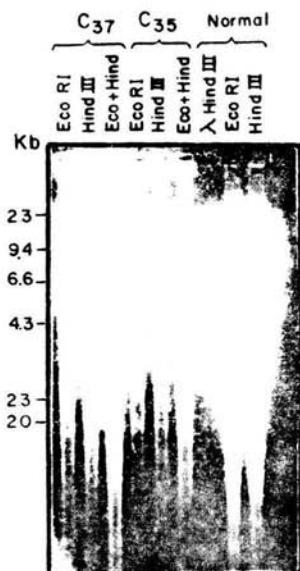
Una vez terminada la electroforesis, el gel se prepara para la transferencia del DNA al filtro de nitrocelulosa siguiendo las condiciones descritas en la metodología.

Después de la transferencia se procedió a la hibridación usando una actividad específica para éste caso de  $3 \times 10^7$  cpm.

Una vez hibridado el DNA que se encuentra en el filtro de nitrocelulosa se realizó la autorradiografía siguiendo la técnica descrita en metodología.

En la figura 11, se presentan los resultados obtenidos de la autorradiografía. Se puede observar las bandas que corresponden al sitio del DNA tumoral en el que la sonda hibridó.

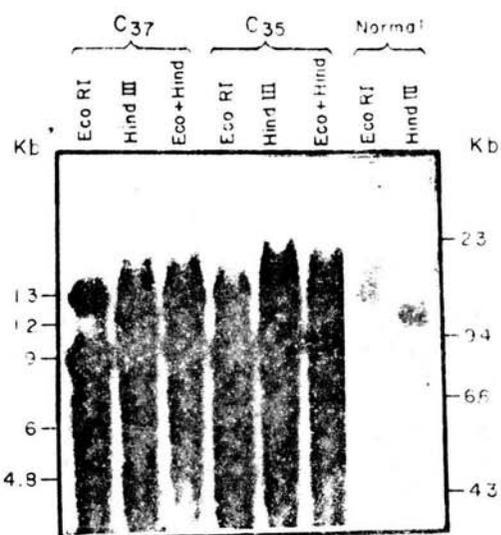
Se puede observar que se experimento en particular un número de bandas mayor que para los experimentos anteriores y no así para el tejido normal el cual presenta el patrón de bandeado esperado 13 Kb para Eco RI y 12 Kb para Hind III.



Electroforesis del DNA de los tumores cervico uterino  
C<sub>37</sub>,C<sub>35</sub> y tejido normal digeridos con Eco RI y Hind III

FIGURA 10.

La electroforesis se realiza en geles de agarosa horizontales a una concentración de 0.9 % en solución amortiguadora TPE con 18 ug de bromuro de etidio, las muestras se corren a 50 V durante 16 horas a temperatura ambiente.



Autorradiografía del DNA digerido con enzimas de restricción Eco RI e Hind III de los tumores cervico uterino C<sub>37</sub>, C<sub>35</sub> y tejido normal

FIGURA 11.

Realizando un análisis a primera vista se observó lo siguiente:

- a).- Para el caso cuando se digirió el DNA tumoral con la enzima Eco RI: Se observa la banda de 13 Kb esperada más el rearrreglo a 9 Kb.
- b).- Para el caso cuando se digiere el DNA tumoral con Hind III se observa, la presencia de la banda esperada de 12 Kb y aparte una banda de 9.4 Kb, muy parecida a la encontrada en experimentos anteriores.
- c).- Para el caso cuando se digiere el DNA tumoral con dos enzimas Eco RI e Hind III a la vez, se observa la presencia también de dos bandas en vez de una, la primer banda corresponde a - 13 Kb como en el corte con Eco RI sola, y también el fragmento de 9.4 Kb como en el caso del corte con Hind III sola.
- d).- Algo importante en este caso, que se debe hacer notar es la - presencia de dos bandas que aparecen constantes independientemente del tratamiento de la muestra, las bandas de 6 y 4.8 - Kb.
- e).- Por último, se hace notar que el patrón de bandeo es igual - para los tumores analizados C<sub>37</sub> y C<sub>35</sub>, y algo también importante es el patrón de comparación con el DNA normal en el cual se observa que aunque se corrió bajo las mismas condiciones que las otras muestras no presenta más que una banda, la esperada 13 Kb para Eco RI y 12 Kb para Hind III.

Para corroborar esto y determinar el grado de amplificación del oncogene se corrió un Scan (barrido), a la autorradiografía leyendo cada carril a una OD<sub>560</sub> en un espectrofotómetro Beckman

DU-7.

En la figura 12 se observa el Scan correspondiente al fragmento de 13 Kb, corte con Eco RI. En éste se observan cuatro picos, correspondientes a las cuatro bandas observadas en la autorradiografía, el primer pico para  $C_{37}$  y  $C_{35}$  corresponden al pico esperado en 13 Kb, luego el pico más alto correspondiente al fragmento de 9 Kb y por último dos pequeños picos correspondientes a las bandas de 6 y 4.8 Kb. Junto con esta figura 12 se muestra una tabla con el grado de amplificación de cada pico.

En la figura 13, se observa el Scan correspondiente al fragmento de 12 Kb, corte con Hind III. A éste, al igual que el anterior se observan picos correspondientes a las cuatro bandas. Observándose que el primer pico corresponde al fragmento esperado de 12 Kb para los dos casos  $C_{37}$  y  $C_{35}$ .

Se observa, al igual que en el caso anterior, que el segundo pico es el más alto y corresponde a la banda de 9.4 Kb, y los picos de los fragmentos de 6 y 4.8 Kb, junto con la figura 13 se muestra una tabla con el grado de amplificación de cada pico.

En la figura 14, se observa el Scan correspondiente al fragmento producido por la digestión con Eco RI e Hind III a la vez ( se esperaba un fragmento de 7 Kb). En éste caso como en todos los de éste experimento se observan cuatro picos, los cuales corresponden a las bandas de 13, 9.4, 6 y 4.8 Kb. Observándose al igual que en los casos anteriores que se repite en el mismo orden el tamaño del pico. Junto con la figura 14 se muestra una tabla con el grado de amplificación de cada pico.

Después de terminado este análisis se compararon los resultados de los diferentes casos y se presentan en la tabla VIII.

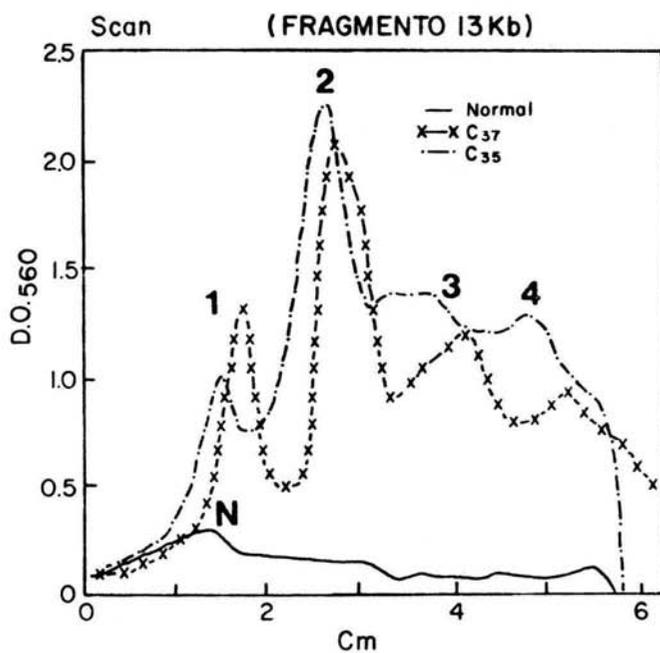


FIGURA 12.

PICOS	C <sub>35</sub>		PICOS	C <sub>37</sub>	
	AMPLIFICACION	D.C.		AMPLIFICACION	D.C.
1	4X	17.76	1	5X	16.06
2	6X	23.02	2	7X	24.24
3	3X	11.07	3	3X	10.02
4	2.5X	10.0	4	2X	6.64

D.C.: Datos Cuantitativos.

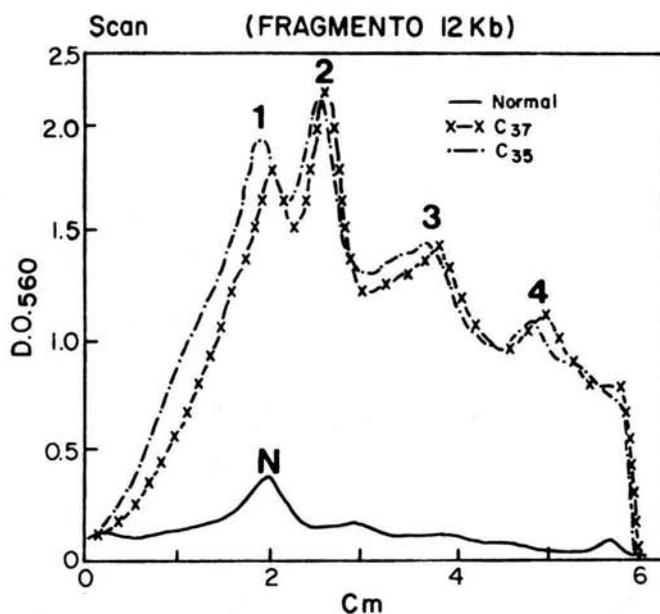


FIGURA 13.

PICO	C <sub>35</sub>		PICO	C <sub>37</sub>	
	AMPLIFICACION	D.C.		AMPLIFICACION	D.C.
1	4X	12.61	1	4X	20.24
2	5X	15.82	2	5X	26.01
3	3X	9.51	3	3X	15.21
4	2X	6.40	4	2X	10.12

D.C. : Datos Cuantitativos.

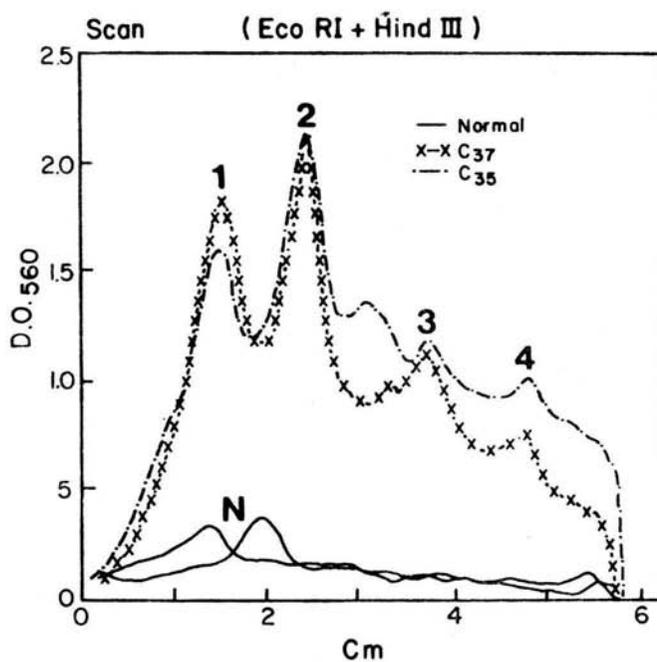


FIGURA 14.

PICO	C <sub>35</sub>		PICO	C <sub>37</sub>	
	AMPLIFICACION	D.C.		AMPLIFICACION	D.C.
1	3X	10.56	1	4X	23.10
2	4X	13.08	2	4X	22.04
3	3X	9.81	3	3X	16.53
4	2X	7.04	4	2X	11.02

D.C. : Datos Cuantitativos.

TABLA VIII

TUMOR	ESTADIO	TIPO HISTOLOGICO	EDAD	AMPLIFICACION	REARREGLO
C 4	II B	EPIDERMIOIDE	46	4 X	+
C 5	IV	ADENOESCAMOSO	49	7 X	+
C 9	IIIB	EPIDERMIOIDE	62	2 X	-
C 29	IIIB	EPIDERMIOIDE	49	3 X	-
C 34	IIIB	EPIDERMIOIDE	58	2 X	+
C 35	II A	ADENOESCAMOSO	55	10 X	+
C 37	IIIB	EPIDERMIOIDE	71	12 X	+
C 46	II A	ADENOESCAMOSO	55	4 X	-

## DISCUSION:

Respecto a los resultados anteriores, se analizaron por cada experimento observándose lo siguiente:

Para extracción y purificación de plásmido se obtuvieron las concentraciones aún más altas que las reportadas en la bibliografía (21); respecto a la purificación, el plásmido HLM-Xba se obtuvo puro.

Respecto a la microscopía electrónica fue una herramienta para corroborar junto con el trabajo de caracterización por enzimas de restricción realizado por el Q.B.P. Rodolfo Ocadiz D., que se contaba con la sonda adecuada para éstos experimentos; - esto se demostró midiendo en la microfotografía con un curvómetro y luego verificando el tamaño, el cual correspondió perfectamente.

Como un trabajo complementario para este estudio y muy especialmente como base para estudios posteriores de este oncogene, se reporta la secuencia del fragmento utilizado como sonda y se pone a la disposición de los interesados programas de computadora para conocer más a fondo las características moleculares de este fragmento del oncogene c-myc.

Respecto al marcaje de la sonda radioactiva (HLM-Xba-<sup>32</sup>P) - que se llevó a cabo por la técnica de rompimiento y sustitución (Nick-Translation), se obtuvo una incorporación de marca radioactiva mucho muy alta, 80 %, en comparación a lo reportado en la literatura que es de un 37 % (41). Esta alta eficiencia fue muy útil - dado, que con pocos marcajes de la sonda, se llevaron a cabo varios experimentos importantes, y dada la alta actividad, se redujo el tiempo de exposición de las autorradiografías.

El aspecto de el marcaje y una buena hibridación junto con -

adecuados lavados para eliminar exeso de sonda fueron determinantes para la obtención de buenos resultados.

Lo que respecta a los resultados del estudio en DNA tumoral, se analizan por experimento realizado conciderando cada caso.

Para el experimento (I) observamos: Un rearrreglo acompañado de amplificación para los tumores C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> y C<sub>34</sub>, la amplificación fué de 4, 7 y 2 veces más que el normal respectivamente, acompañándose para los tres casos de un rearrreglo de un fragmento de 12 Kb (fragmento esperado) a un fragmento de 9 Kb. Para éstos casos la alteración del oncogene c-myc se llevó a cabo en los dos alelos del mismo modo , ésto se explica por el hecho que aparece - una sola banda la cual indica que en los dos alelos el oncogene c-myc se cortó igual por la enzima. Ahora el rearrreglo puede ser debido a dos posibles causas:

- a).- Aparición de un polimorfismo a enzimas de restricción generado por mutación puntual, el cual hace que se pierdan y se generen nuevos sitios de restricción, de tal manera que la longitud del oncogene se modifique de 12 a solo 9 Kb.
- b).- La otra causa probable es la translocación de los dos alelos de éste oncogene de un cromosoma a otro, con lo que adquiriría otros sitios de restricción del lugar al que se traslocó y perdería los sitios originales que quedarían en la parte que no se translocó.

Para comprobar cualquiera de éstas dos hipotesis es necesario realizar hibridación in-situ para determinar la posición cromosómica del oncogene reportada (35), si la posición es la misma 8(q24) se pensaría en un polimorfismo a enzimas de restricción, pero si la posición fuera otra, por ejemplo en el cromosoma 14 en la posición

de los genes para las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas - 62b (36), se trataría de una translocación 8:14 del oncogene y la variación del tamaño se debería a que tomaría el sitio de restricción de su nueva localización.

Respecto al tumor C<sub>29</sub> éste no se encuentra rearrreglado, da el fragmento esperado de 12 Kb, pero se encuentra amplificado 3 veces respecto al normal.

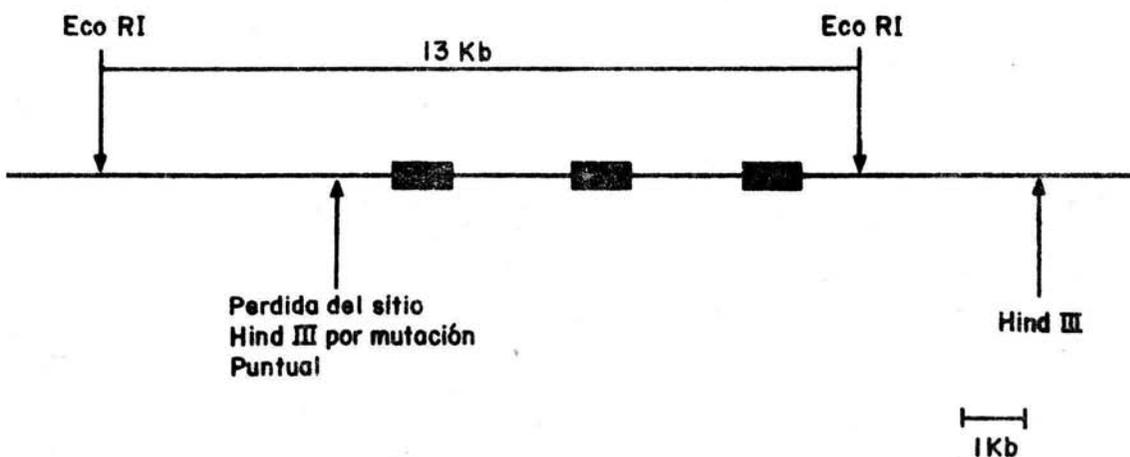
Para el experimento (II) observamos lo siguiente: Para los dos tumores C<sub>9</sub> y C<sub>46</sub> únicamente amplificación de 2 a 4 veces más que el normal respectivamente. No aparece ningún rearrreglo dado que se obtienen las bandas esperadas de 13 Kb para Eco RI y 12 Kb para Hind III, esto quiere decir que no hay ni polimorfismo a enzimas de restricción ni traslocación del oncogene sino sólo amplificación.

Para el experimento (III) que es el más interesante por los resultados obtenidos, observamos lo siguiente: En éste caso fueron dos tumores el C<sub>37</sub> y C<sub>35</sub> en los que se observó un patrón muy semejante entre ellos, algo que los diferencia de los otros resultados es que ninguno de los dos alelos es igual y que presentan la más alta amplificación de 10 y 12 veces más que el normal respectivamente.

Estos tumores fueron digeridos por separado con Eco RI, Hind III y Eco RI+Hind III; para los dos casos cuando se cortó con Eco RI se encontró lo siguiente: un fragmento de 13 Kb (fragmento esperado), y un fragmento de 9 Kb, esto se explica considerando que uno de los alelos estaba normal y amplificado, y el otro se encontraba fuertemente amplificado (más que el primer alelo) y rearrreglado - (polimorfismo a enzimas de restricción o translocación).

Para el corte con Hind III, en los dos casos se encuentra - igual un fragmento de 12 Kb (fragmento esperado) y un fragmento de 9.4 Kb, ésto se explica al igual que en el caso anterior que cada banda corresponde a un alelo, uno se encuentra en el sitio esperado pero amplificado y el otro alelo rearrreglado y fuertemente - amplificado.

Para el corte con Eco RI + Hind III se esperaba un fragmento de 7 Kb, y se encuentran para un alelo un fragmento de 13 Kb, ésto se puede explicar considerando la pérdida de el sitio Hin III - (pérdida por mutación puntual) en el extremo 5' del oncogene, lo que nos generaría un fragmento de 13 Kb detectable por la sonda, y otro de 3.16 Kb que no sería detectado por la sonda, como se muestra en el siguiente esquema.



Para el otro alelo que da un fragmento de 9.4 Kb se explica como un rearrreglo el cual podía ser un polimorfismo a enzimas de restricción o una translocación.

Algo importante son dos bandas que aparecen en todos los casos menos en el normal, éstas bandas corresponden a 6 y 4.8 Kb las -

cuales son reportadas por Dalla Favera y colaboradores como pseudogenes (9)(10). Un pseudogene es definido como genes no funcionales pero con cierta homología con protooncogenes, son considerados como residuos evolutivos (30).

En resumen se encontraron alteraciones en las que los dos alelos tenían el mismo comportamiento y en otros que cada alelo se encontraba alterado de diferente modo, otro punto importante es que sólo en dos casos se encuentran pseudogenes lo mismo reporta (9)(10).

Como resumen general de todo el trabajo tenemos que de 8 tumores cervicouterinos estudiados en el 100 % se encontró alterado el oncogene c-myc, es decir se encontraron todos los tumores amplificados, de éstos, cinco estaban amplificados y rearrreglados, y tres solamente amplificados; ésta cifra de alteración es importante dado que para c-myc se reporta un porcentaje de alteración de este oncogene relativamente bajo para otros tipos de carcinomas: Carcinoma epitelial (11 %), Sarcomas (22 %), linfomas (19 %) de un 100 % de muestras estudiadas (56).

Cabe mencionar que el cáncer cervicouterino es poco estudiado a éste nivel, y exepcto por estudios recientes realizados en E. U., en la Ciudad de Los Angeles en donde el cáncer cervicouterino comienza a ser un problema (39).

Por último se observó que no hubo correlación entre el grado de amplificación con el estadio y tipo histológico, es probable que si exista ésta correlación pero la muestra fue demasiado pequeña, no representativa, la justificación es la de trabajar con muestras de pacientes vivos lo que restringía el muestreo.

**CONCLUSIONES:**

- A).- El oncogene c-myc humano si está implicado en carcinoma cervicouterino.
- B).- Se pudo detectar y determinar un patrón anormal, observándose amplificaciones y rearrreglos del oncogene c-myc en diferentes casos clínicos de carcinoma cervicouterino independientemente del grado de desarrollo y tipo histológico.
- C).- El 100 % de los tumores analizados se encontró alterado el oncogene c-myc.
- D).- Este trabajo es el primer reporte en el campo de la oncología molecular en México.

## ANEXOS:

## a).- Análisis de Computadora:

Un trabajo adicional que se realizó en el laboratorio fue el de tener nuestro archivo de información con la secuencia nucleotídica del fragmento que contiene el primer exón del oncogene c-myc (18), el cual corresponde a 3510 pares de bases, y es la parte más importante de nuestra sonda.

Esta secuencia se considera en esta tesis, ya que en primer lugar es la secuencia que es reconocida en el DNA tumoral total y en segundo lugar por ser una base teórica para estudios posteriores como son mutagénesis dirigida, análisis de secuencias específicas en el oncogene, etc.

A continuación se tiene la secuencia del fragmento de 3510 pares de bases (primer exón), que se utiliza como sonda para detectar alteraciones en el oncogene c-myc en diferentes tumores humanos.

## ANNEX

85

ONCOGENE HUMAN C-MYC (Pribluda exon 3510 pb).

10	20	30	40	50	60	70
AGCTTGTTCG	GCCGTTTAG	GGTTTGTTCG	AATTTTTTTT	TGGICTATGT	ACTTGTGAAT	TATTCACGT
80	90	100	110	120	130	140
TTGCCATTAC	CGGTTCTCCA	TAGGGTGATG	TTCATTAGCA	GTGGTGATAG	GTTAATTTTC	ACCATCTCT
150	160	170	180	190	200	210
ATGCGGTTGA	ATAGTCACCT	CTGAACCACT	TTTTCTCTCA	GTAACCTCTC	TTTCTTCGGA	CTTCTCTGAG
220	230	240	250	260	270	280
CCAACCTGAA	AGAATAACAA	GGAGGTGGCT	GGAAACTTGT	TTAAGGAGC	CGCTCTTCC	TGCTCCCTG
290	300	310	320	330	340	350
GAAACCTTGC	ACCTCGGACG	CTCCTGCTCC	TGCCCCCACC	TGACCCCCGC	CCTCGTTGAC	ATCCAGCGCC
360	370	380	390	400	410	420
GATGATCTCT	GCTGCCAGTA	GAGGGCACAC	TTACTTTACT	TTCGCAAACC	TGAACGGGGG	TGCTGCCGAG
430	440	450	460	470	480	490
AGAGGGGGCG	GAGGGAAAGA	CGCTTTCAG	CAAAATCCAG	CATAGCGATT	GCTTGTCTCC	CGGTTTGGG
500	510	520	530	540	550	560
GCAAAGGCCT	GGAGGCAGGA	GTAATTTGCA	ATCCTTAAAG	CTGAATTGTG	CAGTGCATCG	GATTTGBAAG
570	580	590	600	610	620	630
CTACTATATT	CACTTAACAC	TTGACCGCTG	AGCTGCAAAC	TCAACGGGTA	ATAACCCATC	TTGAAACGCG
640	650	660	670	680	690	700
TACATGCTAT	ACACACACCC	CTTTCCCCCG	AATTGTTTTT	TCTTTTGGAG	GTGGTGGAGG	GAGAGAAAAG

710 720 730 740 750 760 770  
TTTACTTAAA ATGGLTTTGG GAGAGGAACT AAGGATGAGA AGAATGTTT TTTTCTTCA TGGCGTAAA

780 790 800 810 820 830 840  
TARDACAAAT TAAAAATCC CGAGGGAAAT TACATTATAT ATTAATATA GATCAITTCA GGGAGGAAAC

850 860 870 880 890 900 910  
AAATCATGTG TGGGGCTGSC CAACTAGCTG AGTCGAAGCG TAAATAAAAT GTGAATACAC GTTTGCGGGT

920 930 940 950 960 970 980  
TACATACAGT GCACCTTCAC TAGTATTCAG AAAAAATTGT GATCAGTGA ACTAGGAAT TAATGCTCG

990 1000 1010 1020 1030 1040 1050  
AGGGCAGCCA AATTTTAATT AGCTCAAGAC TCCCCCCCC CCCCCAAAAG AGGCACGGAG GAAAGCTCC

1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120  
TCTCCTCTT TTTGATCAGA ATCGATGCAT TTTTGTGCA TGACCGCATT TCCAATAATA AAAGGGGAA

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190  
GAGGACCTGG AAAGGAATTA AACGTCCGGT TTGTCCGGGG AGGAAAGAGT TAACGTTTT TTTCAAGG

1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260  
GTCTCTGCTG ACTCCCCCG CTCGGTCCAC AAGCTCTCCA CTTGCCCTT TTAGGAGTCC CGGTCCGGG

1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330  
GTTCCGGTAC CCCCTGCCCC TCCCATATTC TCCCGTCTAG CACCTTTGAT TTCTCCCAA CCCGGCAGCC

1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400  
CGAGACTGTT GCAAACCGGC GCCACAGGGC GCAAAGGGGA TTTGTCTCTT CTGAAACCTG GCTGAGAAAT

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470  
TGGGAACTCC GTGTGGGAGG CGTGGGGGTG GGACGGTGGG GTACAGACTG GCAGAGAGCA GGCACCTCC

1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540

1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610  
CTCTCCCGCT AGCCGAGCTC TGGAACAGGC AGACACACCT CAGGGCTTAA CAGACGCTTC CCGCACGCA

1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610  
CCCCACGGAA GCCTGAGCAG GCGGGGCAGG AGGGGCGGTA TCTGCTGCTT TGGCAGCAAA TTGGGGGACT

1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680  
CAGTCTGGGT GGAAGGTATC CAATCCAGAT AGCTGTGCAT ACATAATGCA TAATACATGA CTCCCCCAAA

1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750  
CAATGCAAT GGGAGTTTAT TCATAACGCG CTCTCCAAGT ATACGTGGCA ATGCBTTGCT GGGTATTTTT

1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820  
AATCATTGTA GGCATCGTTT TCCTCCTTAT GCCTCTATCA TTCTCCCTTA TCTACACTAA CATCCCAACC

1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890  
TCTGAACGCG CGCCCATTA TACCCTTCTT TCCTCCACTC TCCCTGGGAC TCTTGTCAA ABCGCGGCC

1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960  
TTTCCCAAGC CTTAGCGAAG CGCCCTGCAG CCTGATACGC GCCTGGCGTG GCGGTGGGCG CGCAGTGCCT

1970 1980 1990 2000 2010 2020 2030  
TCTCTGTGT GAGGGCAGCT GTTCCGCCTG CGATGATTTA TACTCACAGG ACAAGGATGC GGTTTGTCAA

2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100  
ACAGTACTGC TACGGAGGAG CAGCAGAGAA AAGGAGAGGG TTTGAGAGGG AGCAAAAGAA AATGGTATGG

2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170  
GCGGTAAGTT AATTCATGCG GCTCTCTTAC TCTGTTTACA TCCTAGAGCT AGAGTGCTCG GCTGCCCGGG

2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240  
TGAGTCTCT CCCCACCTTC CCCACCCTCC CCACCCTCCC CATAAGCGCC CCTCCCGGGT TCCCAAAGCA

2250 2260 2270 2280 2290 2300 2310

GAGGGCGTGG GGGAGAGGAA GAGAGATGCT CTCTCGCTAA TCTCGGCGCA CCGGTCCTTT ATAATTCGGG

2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380

GGTCTGGACC GCTGAGGACC CCCGAGCTGT GCTGCTCGCG GCGGCCACCG CCGGGCCCCG GCCGTCCCTG

2390 2400 2410 2420 2430 2440 2450

GCTCCCTCC TCGTCCGAGA AGGGCAGGCG TTCTCAGAGG CTGGCCGGGA AAAAGAACCG AGCGAGGGA

2460 2470 2480 2490 2500 2510 2520

CGCGCTGAGT ATAAAAGCCG GTTTTCGGGG CTTTATCTAA CTCGCTGTAG TAATTCACGC GAGAGGCAGA

2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590

GCGAGCGAGC GGGCGGCCCG CTAGGGTGGG ABAGCCGGCC GAGCAGAGCT GCGCTCGGGG CGTCTCGG

2600 2610 2620 2630 2640 2650 2660

AGGGAGATCC GAGCGAATA GGGGGCTTCG CCTCTGGCCC AGCCCTCCCG CTGATCCCGC AGCCAGCGCT

2670 2680 2690 2700 2710 2720 2730

CCGCAACCCCT TGCCGCATCC ACBAACTTT GCCCATAGCA GCGGGCGGGC ACTTTCGACT GGAACCTACA

2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800

ACACCCGAGC AAGGACCGGA CTCTCCCGAC GCGGGGAGGC TATTCTGCCD ATTTGGGGAC ACTTCGCCCG

2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870

CGCTGCCAGG ACCCGCTTCT CTGAAAGGCT CTCCTTGCAg CTGCTTAGAC GCTGGATTTT TTTCCGGTAG

2880 2890 2900 2910 2920 2930 2940

TGBAAAACCA GGTAAACACC GAAGTCCACT TGCCTTTTAA TTTATTTTTT TATCACTTAA ATGCTGAGAT

2950 2960 2970 2980 2990 3000 3010

GAGTCGAATG CCTAAATAGG GTGTCTTTTC TCCCATTCCT GCGCTATTGA CACTTTTCTC AGAGTAGTTA

3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080

TGGTAAGTGG GGC TGGGCTG GGGGTATATC CAGGACTGGG TGGGGTGGG GTGACTGTTC GAGATGGGAG

3090 3100 3110 3120 3130 3140 3150

AGGAGGAGGC AGAGGGA AAA CGGGATGGT TTTTAAAGACT ACCCTTTGGA GATTTCTGCC TTATGAATAT

3160 3170 3180 3190 3200 3210 3220

ATTCACGGTG ACTCCCGGCC GGTCCGACAT TCCTGCTTTA TTGTGTTAAT TGCTCTCTGG GTTTTGGGGG

3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290

GCTGGGGGTT GCTTTGCGGT GGGCAGAAAB CCCCTTGCAT CCTGAGCTCC TTGGAGTAGG GACCGCATAT

3300 3310 3320 3330 3340 3350 3360

CGCCTGTGTG AGCCAGATCG CTCGCGAGCC GCTGACTTGT CCCCCTCTCC GGGAGGGCAT TTAAATTTG

3370 3380 3390 3400 3410 3420 3430

GCTCACCGCA TTTCTBACAG CCGBAGACGG ACACTGCGGC GCGTCCCGCC CGCCTGTCCC CGCGGGCATT

3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500

CCACCCCGCC CTGATCCTTT TAAGAAGTTG GCATTTGGCT TTTTAAAAG CAATAATACA ATTTAAAACC

3510

TGGGTCTCTA

## BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Alitalo, K.(1983):Homogeneous staining chromosomal regions contain amplified copies of abundantly expressed cellular oncogene (c-myc) in malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1707
- 2.- Amersham International.(1980):Labelli of DNA with  $^{32}\text{P}$  by Nick Traslation. Technical Bulletin, 80/3.
- 3.- Benitez, Bibriesca L.(1984):Oncogenes. Rev. Med. IASS (Méx), 22:53.
- 4.- Besmer, P.,Murphy J.,E.(1986):A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit whit - protein kinase gene family. Nature, 302:6061:415.
- 5.- Bolivar, F.,Rodriguez, R.C.(1977):Construction and characterization of new cloning vehicles. Gene 2:95.
- 6.- Brodeur,G.(1984):Amplification of N-myc in untreatet human - neuroblastomas correlates whit advanced disease stage. Science 224:1121.
- 7.- Clifford, J.T.(1982):Mechanism of activation of a human oncogene. Nature 300:143.
- 8.- Danuta, K.(1984):Amplification of the c-myc oncogene in one of five human breast carcinoma cell lines. Cancer Research 44:438.
- 9.- Dalla Favera,R.,Wong Stall,F.(1982):Oncogene amplification in promyelocytic leukaemia cell line HL-60 and primary leukaemic cells of the same patient. Nature 299:61.
- 10.- Dalla Favera,R.(1982):Cloning and characterization of different human sequence relatet to the onc gene (v-myc) of avian - myelocytomatosis virus (MC29). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6497.

- 11.- David, J.L.(1984): Highly sensitive and rapid gene mapping using miniaturized blot hybridization: Application to pre-natal diagnosis. *Gene (ELSEVIER)*, 28:153.
- 12.- De la Loza, S.(1976): Avances en los niveles de salud en México, en 1974. *Sal. Pub. Méx.* 18:5.
- 13.- De la Loza, S.(1976): El problema del cáncer en México. *Sal. Pub. Méx.* 18:2.
- 14.- Diaz, P.R.(1974): Consideraciones acerca del problema del - cáncer en México. *Memorias de las jornadas medicas del - Centro Médico Privado "Hospital Frances" México.*
- 15.- Dulbecco, R.(1982): La naturaleza del cáncer. *Mundo Científico* 3:22:168.
- 16.- Fernandez, R.M.(1983): Cuales son realmente las principales causas de defunción en México?. *Sal. Pub. Méx.* 25:3:50.
- 17.- Gariglio, V.P.(1985): Comunicación Personal.
- 18.- Gazin, C.(1984): Nucleotide sequence of the human c-myc locus: Provocative open reading frame withing the first exon. *The EMBO Journal* 3:2:383.
- 19.- Gilman, A.G.(1984): G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell* 36:577.
- 20.- Goodtellow, P.(1983): Human gene mapping rolls along. *Nature* 306:223.
- 21.- Griffith, O.M.(1980): Density gradient separations in vertical tube, fixed angle and Swinging bucket rotors: A comparative study. Palo Alto, California, Beckman Instruments, Inc. Spico Division.
- 22.- Harris, L.J.(1982): DNA sequence associated with chromosome translocations in mouse plasmacytomas. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA 29:6622.

- 23.- Harper, M.E.(1983):Chromosomal sublocation of human c-myb and c-fes cellular oncogenes. Nature 304:109.
- 24.- Hayday, A.C.(1984):Activation of a translocated human c-myc gene by an enhancer in the immunoglobulin heavy-chain locus. Nature 307:334.
- 25.- Hunter, T.(1984):Oncogenes and Protooncogenes: How do they differ?. J.N.C.L. 73:4:773.
- 26.- Janet, D.R.(1983):Human oncogene location and chromosome - aberrations. Nature 301:27:290.
- 27.- Jhanwar, S.C.(1983):Localization of c-ras oncogene family on human germ line chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60:4794.
- 28.- Kleinschmidt, A.K.(1968):Monolayer techniques in electro microscopy of nucleic acid molecules. Methods in Enzimology 1<sup>a</sup>. Ed. 12:361, Academic Press New York.
- 29.- Lee, Wen-Hwa.(1984):Expression and amplification of the N-myc gene in primary retinoblastoma. Nature 309:458.
- 30.- Lewin, B.(1983):Genes. John Wiley & Sons Inc.,New York, USA p. 350.
- 31.- Little, C.D.(1983):Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. Nature 306:194.
- 32.- Maniatis, T.(1982):Molecular cloning a laboratory manual. (Cold Spring Harbor Laboratory, New York).
- 33.- Marion M.N.(1985):L-myc, a new-related gene amplified and - expressed in human small cell lung cancer. Nature 318:69.
- 34.- Marx, J.L.(1984):What do oncogenes do?. Science 223:673.
- 35.- Neel, B.G.(1983):Two human c-onc genes are located on the -

- long arm of chromosome 8. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:7842.
- 36.- Neuberger S.W.(1983):Reciprocal chromosome translocation between c-myc and immunoglobulin  $\gamma$  2b genes. Nature 305:240.
- 37.- Newmark, P.(1983):Transcription of c-myc. Nature 301:462.
- 38.- Olper, P.(1979):Principales neoplasias malignas en el Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional, IMSS, Patología. 17:109.
- 39.- Peters, R.K.(1986):Increased frequency of adenocarcinoma of the uterine cervix in young women in Los Angeles contry. J.N.C.I. 76:3:423.
- 40.- Raymond, V.(1984):Oncogenes. Oncos, Program Resource, Inc. NCL-Frederick Cancer Research. 1:1.
- 41.- Rigby, P.J.(1979):Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activiti in vitro by Nick Traslation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol. 113:237.
- 42.- Rodriguez, J.(1983):Carcinoma cervicouterino en el Noreste de México. Aspectos Clínicos. Rev. Méd. IMSS (Méx). 21:183.
- 43.- Sakaguetal, A.Y.(1983):A sequence homologous to Rous sarcoma virus v-src is on human chromosome 20. In. Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol. 29:279.
- 44.- Salmon, D.J.(1984):Expression of cellular oncogenes in human malignancies. Science 224:256
- 45.- Schwab, M., Varmus, H.B.(1984):Chromosomal localization in - normal human cells and neuroblastomas of a gene related to - c-myc. Nature 308:288.
- 46.- Schwab, M., Alitalo, K.(1983):Amplified DNA with limited - homology to the myc cellular oncogene. Nature 305:245.
- 47.- Southern, E.M.(1975):Detection of specific sequences among

- DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503.
- 48.- Stehelin, D.(1984):Spatial and temporal pattern of cellular myc oncogene expression in developing human placenta: Implications for embryonic cell proliferation. *Cell.* 38:585.
- 49.- Steven, R.T.(1985):Isolation and chromosomal localization of the human *fgr* protooncogene, a distinct member of the tyrosine kinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6595.
- 50.- Swan, D.C.(1982):Chromosomal mapping of the simian sarcoma - virus onc gene analogous in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:4691.
- 51.- Taya, Y.(1984):A novel combination of K-ras and c-myc amplification accompanied by point mutational activation of K-ras in a human lung cancer. *The EMBO Journal* 3:12:2943.
- 52.- Thomas, P.S.(1980):Hibridization of denatures RNA and small DNA fragments transfered to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:9:5201.
- 53.- Varmus, H.E.(1984):The molecular genetics of cellular oncogenes. *Ann. Rev. Gene.* 12:553.
- 54.- Varmus, H.E., Schwab, M.(1984):Chromosome localization in - normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc. *Nature* 308:288:91.
- 55.- Willecke, K.(1984):Human oncogenes. *Hum. Genet.* 66:132.
- 56.- Yokota J., Yasuko T.(1986):Alterations of myc, myb and ras<sup>Ha</sup> proto-oncogenes in cancers are frequent and show clinical - correlation. *Science* 231:261.
- 57.- Zalce, H.(1975):Los programas de detección del cáncer cervicouterino y mamario en los estados de la frontera norte de México *Sal. Púb. Méx.* 6:803.