

36  
20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "CUAUTITLAN"

ESTUDIO DEL ONCOGEN C-MYC EN  
PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO  
SISTEMICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A:

VENANCIO RICARDO ORTEGA VELAZQUEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO DE MEX.

1987



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

## INDICE

Resumen .....	1
I. Introducción .....	2
I.1. Generalidades. Lupus Eritematoso Sistémico .....	2
I.2. Oncogenes .....	3
I.2.a. Mecanismo de activación de los oncogenes .....	9
I.3. Oncogenes y autoinmunidad .....	11
II. Objetivo .....	15
III. Materiales y Métodos .....	16
III.1. Pacientes .....	16
III.2. Extracción de linfocitos totales .....	16
III.3. Extracción del DNA de los linfocitos .....	16
III.4. Digestión del DNA de alto peso molecular humano con endonucleasas de restricción .....	17
III.5. Electroforesis de los fragmentos del DNA .....	18
III.6. Transferencia del DNA de geles de agarosa a filtro de nitrocelulosa por el método de Southern .....	18
III.7. Aislamiento y marcaje radioactivo de los plásmidos HLMXba y Ryc7.4 .....	20
III.8. Prehibridización e hibridización del filtro de nitrocelulosa .....	22
III.9. Lavado de los filtro de nitrocelulosa .....	23
III.10. Autorradiografía .....	23
IV. Resultados .....	24
IV.1. Amplificación del oncogen c-myc en las muestras de pacientes con LES .....	26

IV.2. Rearreglo del oncogen c-myc en las muestras de pacientes con LES .....	29
V. Discusión .....	36
VI. Conclusiones .....	41
VII. Bibliografía .....	42

## APENDICE

### Abreviaturas:

LES	Lupus Eritematoso Sistémico
DNA	Acido desoxirribonucléico
RNA	Acido ribonucléico
RNAm	Acido ribonucléico mensajero
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano-HCl
CsCl	Cloruro de Cesio
dATP	Desoxiadenosin trifosfato
dGTP	Desoxiguanidin trifosfato
dTTP	Desoxitimidin trifosfato
GTP	Guanidin trifosfato
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]dCTP	Desoxicitidin trifosfato radioactivo
Kpb	Kilo pares de bases (1000 pares)
ug	microgramos
pg	picogramos
ul	microlitros
mCi	mili Curie
cpm	cuentas emnidadas por minuto

## RESUMEN

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune, en la que el paciente produce una excesiva cantidad de autoanticuerpos que interaccionan con antígenos de sus propios tejidos. Entre los diversos autoanticuerpos que se han encontrado están los que reconocen los componentes nucleares como DNA, histonas, ribonucleoproteínas, antígenos nucleolares, RNAs pequeños, y componentes extraíbles de núcleo. Algunos oncogenes están íntimamente involucrados en los procesos autoinmunes; una expresión aumentada de *c-myc*, *c-myb* y *c-raf*, en paralelo con una disminución de *c-fos*, ha sido reportada en linfocitos T de ratones con procesos autoinmunes. La activación "in vitro" de células monocleares de pacientes con LES, mostró un incremento en el RNA de *c-myc*, comparado con los testigos normales. Tales resultados sugieren que la activación de los oncogenes es necesaria para el crecimiento y alteración celular en la autoinmunidad. En este trabajo se analizó el DNA de linfocitos de sangre periférica de pacientes con LES, se digirió con enzimas de restricción, se separó por electroforesis, y fue transferido a filtros de nitrocelulosa. Posteriormente se hibridizó a la secuencia del oncogen *c-myc* (primer exón) marcado radioactivamente con  $^{32}\text{P}$ . Encontramos alterado el oncogen *c-myc* (amplificado con o sin rearrreglo) en el 80% de las muestras analizadas, sugiriendo, que alteraciones moleculares del gen, pueden influir en la patogénesis de la enfermedad.

## I. INTRODUCCION

### I.1. Generalidades. Lupus Eritematoso Sistémico.

Los importantes adelantos en inmunología humoral y celular, biología molecular y genética han influido en el entendimiento de las enfermedades autoinmunes, en la cual el organismo reconoce a lo propio como extraño y forma autoanticuerpos contra numerosos componentes celulares.

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune prototipo, en la cual el paciente produce una excesiva cantidad de autoanticuerpos que interaccionan con antígenos de sus propios tejidos. Se trata desde luego, de una enfermedad diseminada, con la formación de complejos antígeno-anticuerpo y la activación del complemento, iniciando una serie de reacciones inflamatorias que no sólo afecta a la piel, sino también a las articulaciones (poliartritis), vasos sanguíneos (vasculitis), corazón (pleuritis), cerebro y especialmente a los riñones (glomerulonefritis) (1).

Entre los diversos autoanticuerpos que se han encontrado, los hay contra componentes nucleares como DNA, histonas, ribonucleoproteínas, antígenos nucleolares, RNAs pequeños y componentes de extractos nucleares solubles (2, 3).

En el LES se ha demostrado la hiperactividad de linfocitos B, que ha sido atribuida a defectos en la regulación del sistema inmune por número disminuido y/o inapropiada función de los

linfocitos T supresores, aunque otros hallazgos en contraste demuestran defectos en los linfocitos B o linfocitos T cooperadores, con actividad supresora de los linfocitos T normales (4-6).

Tres tipos de observaciones indican heterogeneidad en el LES:

- 1) Diferencias clínicas en el órgano involucrado, curso y respuesta a la terapia entre individuos con LES;
- 2) Diferencias individuales por considerar, la especificidad, la clase, avidez y cantidad de autoanticuerpos producidos;
- 3) Diferencias genéticas entre los grupos de pacientes con LES (7).

Estudios en animales de laboratorio apoyan la idea de que las enfermedades autoinmunitarias pueden ser la consecuencia de un amplio espectro de anormalidades genéticas e inmunológicas que difieren de un individuo a otro y que pueden presentarse al principio o al final en el transcurso de la vida, dependiendo de la presencia o la ausencia, respectivamente, de muchos factores acelerantes superpuestos exógenos (virus, bacterias, agentes químicos y cancerígenos) o endógenos (hormonas, genes anormales) (ver Figura 1).

## I.2. Oncogenes.

En años recientes, se ha puesto de manifiesto que para entender los procesos normales de la proliferación celular y la diferenciación podrían ser hallados en los genes, denominados oncogenes, los cuales han sido identificados como directos mediadores de la transformación celular (8, 9). Estos genes han

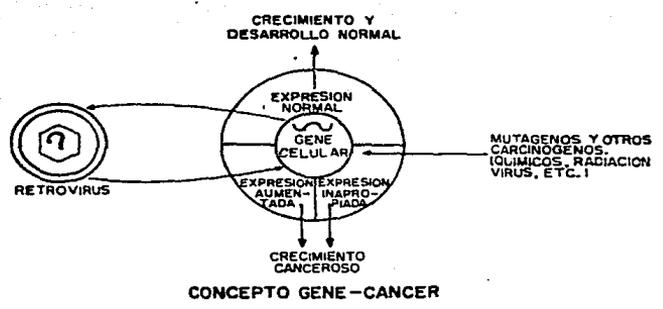


Figura 1. Concepto gene cáncer. (8).

sido identificados por su incorporacion en los retrovirus, los cuales, se vuelven fuertes agentes transformantes tanto "in vivo" como "in vitro." De esta manera, por vez primera se pudo identificar en el virus del sarcoma de Rous (VSR), el gen responsable de producir cáncer en el pollo, al cual se le llamó src, aludiendo sus orígenes (desde entonces, otros oncogenes se han venido designando con abreviaturas similares de tres letras) (9).

Un segundo grupo de oncogenes han sido identificados usando ensayos de transfección, en estudios de transformación viral; algunos de estos, están relacionados a conocidos oncogenes virales y otros están lejos de serlos (10).

El estudio genético de los ácidos nucleicos en células eucarióticas, por medio de técnicas de hibridación molecular, demostró que las secuencias de los oncogenes virales se encuentran en células normales no infectadas por virus, como parte integral del genoma celular. Su amplia distribución en la mayor parte de células estudiadas, obliga a pensar que estos genes, también conocidos como proto-oncogenes, son secuencias constantes, con una función precisa, altamente conservados a través de la evolución y se piensa que realizan funciones esenciales en el control del crecimiento y desarrollo en una célula normal; y que han sido capturados por el virus durante el ciclo infectivo (8).

Desde la identificación del gen src, alrededor de unos 30 proto-oncogenes celulares (c-onc) han sido identificados, se trata desde luego de genes activos que constantemente transcriben

información en forma de RNAm y codifican para la síntesis de proteínas. Dentro de las características bioquímicas de estas proteínas se incluyen proteín-quinasas; proteínas relacionadas a ciertos factores y receptores de crecimiento, por ejemplo c-sis es homólogo al factor de crecimiento derivado de las plaquetas (FCDP), erb-B al factor de crecimiento epidermal (FCE) y proteínas nucleares con afinidad a DNA, de funciones desconocidas (11). En base al análisis de las proteínas oncogénicas y la combinación de las secuencias nucleotídicas se pueden asociar por familias y grupos (ver Tabla 1).

Una de las propiedades distinguibles de los genes c-onc es que se encuentran como secuencias únicas, es decir, una o dos copias por genoma celular, así como los hallazgos en la información codificadora para la proteína, dividida en varios dominios separados, llamados exónes e interrumpida por regiones conocidas como intrones. Estas circunstancias son una evidencia más que soporta el origen celular de estos genes (9).

La localización de los genes en los cromosomas de las células somáticas, ha sido posible por medio de técnicas de hibridación "in situ", por lo que ha permitido la identificación directa de los proto-oncogenes en el cariotipo humano (ver Tabla 2). Esto permite una precisa evaluación del posible papel (o de su asociación) de cambios cromosomales en la activación de estos genes c-onc (12, 13).

Así, se puede dar una definición de oncogenes como un juego de genes normales involucrados en el proceso de desarrollo que, cuando son modificados y/o expresados inapropiadamente, causan

Tabla 1. Oncogenes: Relación, Origen y Producto (a).

Abreviatura	Origen	Producto	Función
<b>Familia src</b>			
1. Tirosin-cinasa			tirosin-cinasa
src	Virus Sarcoma Rous (pollo)	p60	"
abl	Virus leucemia Abelson (ratón)	p90-160*	"
fes	Virus sarcoma Felino (gato)	p95-115*	"
ros	Virus sarcoma UR2 (pollo)	p68*	"
2. Secuencia homologa a src			cinasa
mos	Virus sarcoma Moloney (ratón)	p37	"
raf	Virus sarcoma de raton 3611	p75 y p90*	"
mil	Virus NH2	p100*	"
<b>Familia ras</b>			
Ha-ras	Virus sarcoma Harvey (ratón)	p21	union-GTP
Ki-ras	Virus sarcoma Kirsten (ratón)	p21	"
N-ras	DNA humano	p21	"
<b>Familia myc</b>			
myc	Virus mielocitomatosis MC29 (pollo)	p110*	union-DNA
N-myc	DNA humano	p200*	"
<b>Familia sis</b>			
sis	Virus sarcoma mono (mono)	p28	similar-FCDP
	Virus sarcoma Parodi-Irgens (gato)	p76*	"
<b>Aislado sin relación</b>			
myb	Virus mielocitoblastosis aviar (pollo)	p45	union-DNA
	Virus E26 (pollo)	p135*	"
fos	Virus osteosarcoma FBJ	p55	"
erbA	Virus eritroblastosis (pollo)	p75*	"

\*: producto asociado con gag.

a: Gilden, R.V. (1984) Oncogenes. Gene Anal Techn 1:23-33.

Tabla 2. Localización cromosómica de genes virales transformantes a sus homologos celulares (\*).

Abreviatura	Especie origen	Virus	Cromosoma Humano
myb	pollo	AMV	6q22-24
mos	ratón	Mo-MSV	8q22
myc	pollo	MC29	8q24
fes	gato	ST-FeSV	15q25-26
sis	mono	SSV	22
src	pollo	RSV	20
abl	ratón	A-MuLV	9q34
fms	gato	SM-FeSV	5q34
Ha-ras-1	ratón	Ha-MSV	11p14.1, p15.1-15.5
Ha-ras-2	ratón	Ha-MSV	X
Ki-ras-1	ratón	Ki-MSV	6
Ki-ras-2	ratón	Ki-MSV	12p12.1 o q24.2
N-ras	hombre	ninguno	1p32.0
raf-1	ratón	3611-MSV	3p25
raf-2	ratón	3611-MSV	4
N-myc	hombre	ninguno	2
erbA	pollo	AEV	17p11-q21
erbB	pollo	AEV	7
skI	pollo	SK770	1q12
fos	ratón	FBJ-MSV	2
Blym-1	hombre	ninguno	1p32

\* Gilden, R.V. et al. (1984) Oncogenes. Gene Anal Techn 1:23-33..

inmortalización o transformación de una célula susceptible (14).

#### I.2.a. Mecanismo de activación de los oncogenes.

Se han descubierto varios mecanismos diferentes mediante los cuales un proto-oncogen puede ser activado hacia un oncogen, dentro de los principales mecanismos estan:

- i) Mutación puntual: Un pequeño segmento del gen es alterado por radiaciones o agentes químicos carcinogénicos. La proteína determinada por el oncogen mutado difiere ligeramente de la proteína normal, así por ejemplo tenemos que en la familia del oncogen ras han sido encontradas mutaciones, especialmente en los codones 12 y 61 (15, 16).
- ii) Amplificación génica: Este proceso ocurre por medio de la formación de una multitud de los llamados cromosomas dobles minutos (DM) (región del cromosoma que ha perdido un centrómero) y termina con la presencia de cromosomas con zonas homogéneamente teñidas (cromosomas HRS). En otras palabras, el oncogen, de alguna manera, es replicado en varias copias activas que estan presentes en la misma célula, y el gen puede ser sobreexpresado en un nivel inapropiado (ver Tabla 3) (17-21).
- iii) Inserción viral: En el caso de oncogenes asociados a retrovirus, el gen puede sufrir mutación o puede ser colocado bajo el control de los promotores transcripcionales potentes hallados en los LTR (Long Terminal Repeats), que incrementan su nivel de expresión. Los c-onc no necesitan ser enteramente

Tabla 3. Amplificación de oncogenes celulares (\*).

Oncogene	Tumor	grado de ampli- ficación
c-myc	Leucemia promielocítica línea celular HL-60 y tumor primario	20X
c-myc	Línea celular de carcinoma de colon, COLO320	40X
c-myc	Carcinoma de pulmón de células pequeñas, líneas celulares	5-30X a
c-myc	Linfoma bursal inducido	5-10X
N-myc	Neuroblastomas primarios (estados II y IV) y líneas celulares	5-1000X
N-myc	Línea celular de carcinoma de pulmón de células pequeñas	50X
c-abl	Línea celular de leucemia mieloide crónica	5-10X
c-myb	Línea celular de carcinoma de colon, COLO201/205	10X
c-myb	Leucemia mieloide aguda	5-10X
c-erbB	Línea celular de carcinoma epidermoide, A431	30X
c-Ki-ras2	Carcinomas primarios de pulmón, colon, vejiga y recto	4-20X
c-Ki-ras	Línea celular de carcinoma adrenocortical, Y1	30-60X b
N-ras	Línea de carcinoma mamario	5-10X

a: tumor encontrado en pollo; b: tumor encontrado en ratón. Los demás tumores son de humanos.

\* Varmus, H.E. (1984) The molecular genetics of cellular oncogenes. Ann. Rev. Genet. 18:553-612.

integrados, por ejemplo: porciones de los extremos 5' o 3' pueden ser suprimidos, los que al parecer no son esenciales para el proceso de transformación (14, 22-26).

iv) Activación por medio de translocaciones cromosomales: En el linfoma de Burkitt la translocación recíproca entre el cromosoma 8 y 14 sucede en la mayoría de los casos, translocando el locus del oncogen c-myc, localizado en el brazo largo del cromosoma 8 (banda q24) hacia la vecindad del locus de los genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas localizada en el cromosoma 14 (27). En otros casos de el linfoma de Burkitt, el oncogen c-myc es translocado hacia el loci de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas, que se encuentra en los cromosomas 2 y 22. Así el gen c-myc es colocado en una zona de las inmunoglobulinas extremadamente activa, resultando una transcripción activa de este gene y por ello la transformación neoplásica (28-30).

Actualmente se siguen descubriendo nuevos mecanismos de activación de estos oncogenes, entre otros podemos mencionar las deleciones, rearrreglos, y otros mecanismos genéticos.

### I.3. Oncogenes y autoinmunidad.

Es claro que los oncogenes están íntimamente involucrados en los procesos autoinmunes. Una expresión aumentada de los oncogenes c-myc, c-myb y c-raf en paralelo con una expresión disminuida de c-fos ha sido reportada en linfocitos T de ratones con procesos autoinmunes (31). Un estudio de la activación "in

"vitro" en células mononucleares de pacientes con LES, mostró un incremento en el RNA c-myc, comparado con los testigos normales, presumiblemente como un reflejo de la incrementada activación inmune celular manifestada "in vivo" (32). Estos cambios fueron similares a aquellos vistos en linfocitos B normales activados con lipopolisacáridos (33), anticuerpos anti-IgM (34) y factores de crecimiento de linfocitos B (35, 36). Tales resultados sugieren que la activación de los oncogenes es necesaria para el crecimiento y alteración celular en la autoinmunidad y pueden ser la llave en la expansión incontrolada de ciertas células inmunes y elementos de tejido conectivo.

El proto-oncogen c-myc es el homólogo celular del oncogen viral myc (v-myc) llevado por el virus de la mielocitomatosis aviar (MC29), el cual consiste de tres exones y dos intrones (ver Figura 2), los últimos dos exones codifican para una proteína de 439 aminoácidos con alta afinidad de unirse al DNA (aunque su función precisa se desconoce todavía). Entre las alteraciones más frecuentes que sufre el gen c-myc están: amplificación en el DNA (18, 19), translocaciones y rearrreglos genéticos (27-30) y la adquisición de regiones promotoras retrovirales (LTR) en la vecindad del gen c-myc (26).

Como se observó en la Figura 2, el locus normal del gen c-myc genera un fragmento de 13 Kpb cuando es digerido con la enzima de restricción EcoRI y un fragmento de 12 Kpb con la enzima HindIII. Además de pueden observar otros sitios de restricción.

Las sondas (plásmidos marcados radioactivamente) utilizadas en este estudio (HLMXba y pRyc. 7.4) son capaces de detectar ambos

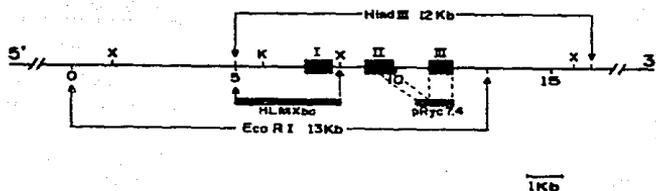


Figura 2. Locus Normal del proto-oncogen c-myc. El proto-oncogen consiste de tres exones (representados por los rectángulos sombreados) y dos intrones. Al digerirlo con la enzima EcoRI produce un fragmento -- constante de 13 Kpb y 12 Kpb con la enzima HindIII. Los rectángulos negros representan las sondas utilizadas para detectar ambos fragmentos, las cuales están clonadas en pBR322.

X: Xba I

K: Kpn I

fragmentos de 13 y 12 Kpb (con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII, respectivamente) por medio de hibridación en el DNA, así es, que esperamos encontrar estos fragmentos en tejidos normales y que cualquier banda diferente a estas, en los pacientes, indicará alteración del oncogen. Así, podremos tratar de dar una posible explicación de que ciertos genes alterados (en este caso el proto-oncogen c-myc) promueven un estado anormal en LES.

## II. OBJETIVO.

Debido a que el oncogen c-myc es uno de los oncogenes más alterados en los procesos cancerosos, y en últimos reportes se ha visto también implicados en las enfermedades autoinmunes. Por tal motivo, y utilizando técnicas modernas de Ingeniería genética e hibridización molecular, pretendemos el siguiente objetivo:

- Determinar las posibles alteraciones moleculares del oncogen c-myc en el DNA de linfocitos de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES).

### III. MATERIALES Y METODOS

#### III.1. Pacientes.

Se analizaron veinticinco pacientes con Lupus Eritematoso Sistemico (LES) y diez personas sanas como testigos. Se obtuvo por punción 20 ml de sangre periférica heparinizada para la extracción de linfocitos totales; además de 10 ml de sangre completa para realizar determinaciones de Complemento (C3, C4, CH50), Inmunoglobulinas (IgG, IgM, IgA), anticuerpos extraíbles de núcleo (ENA), anticuerpos antinucleares (ANA) y anticuerpos anti-DNA. (Estas determinaciones fueron realizadas por químicos del laboratorio de Reumatología del Centro Médico "La Raza").

#### III.2. Extracción de linfocitos totales.

La sangre heparinizada se diluyó volumen a volumen con PBS 10mM Fosfatos, 150mM NaCl) pH 7.4, y los linfocitos fueron obtenidos por medio de un gradiente de densidad ( $d = 1.07$ ) con Ficoll-Hypaque (37). Una vez que se centrifugó el gradiente, durante 30 minutos a 1500 rpm, se colectaron de la interfase formada los linfocitos y se lavaron con PBS pH 7.4 tres veces.

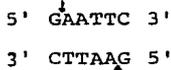
#### III.3. Extracción del DNA de linfocitos (38).

El paquete celular de linfocitos se resuspendió en la solución de Lisis que contiene 20mM Tris-HCl, pH 7.5; 300mM Acetato de Sodio y 1mM EDTA; la hidrólisis de proteínas se

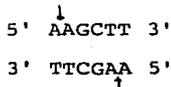
realizó mediante la adición de Proteínasa K (Bethesda Research Laboratories) a una concentración de 200 ug/ml y SDS al 0.2%, la cual se incubó a 37°C durante 6 horas. Se eliminaron las proteínas por medio de dos extracciones con fenol saturado con regulador TE (10mM Tris-HCl, pH 8.0; 1mM EDTA); dos extracciones con fenol-cloroformo (1:1) y por último una extracción con cloroformo-alcóhol isoamílico (24:1). Los ácidos nucleicos fueron precipitados con dos volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C). El RNA se hidrolizó con 100 mg/ml de RNasa A pancreática (Sigma Chemical Co.) a 37°C durante 1 hora y se repitieron las extracciones antes mencionadas. El DNA fue disuelto en regulador TE y se determinó su concentración en un espectrofotometro (Beckman DU-7) a una longitud de onda de 260/280 nm.

#### III.4. Digestión del DNA de alto peso molecular humano con endonucleasas de restricción (38).

Se emplearon 40 unidades de las enzimas EcoRI (aislada de E.coli RY13) que reconoce la secuencia de corte:



e HindIII (aislada de Haemophilus influenzae RD) que reconoce la secuencia de corte:



en la digestión de 10 ug de DNA, de cada muestra analizada, en condiciones estandares recomendadas por el proveedor (Amersham), esta digestión se incubó a 37°C durante 16-18 horas.

### III.5. Electroforesis de los fragmentos de DNA (38).

Los fragmentos producidos en la digestión con las enzimas, fueron separados por medio de electroforesis en gel horizontal de agarosa (medio Tipo II, Sigma Chemical Co.) al 0.9% (conteniendo bromuro de etidio al 0.5 ug/ml) a 50 volts durante 16 horas, en regulador TPE (80mM Tris-fosfatos, pH 7.6; 8mM EDTA). Además fue incluido como marcador de peso molecular, en cada gel, el DNA del fago Lambda digerido con HindIII (0.57 ug/carril, Bethesda Research Laboratories) de fragmentos conocidos de 23, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0 y 0.75 Kpb. Posterior a la electroforesis se observó el gel en un transiluminador de luz U.V. y se fotografio con película Polaroid tipo 55, para asegurar que cantidades iguales de DNA fueron puestas en cada carril (ver Figura 3).

### III.6. Transferencia del DNA de geles de agarosa a filtros de nitrocelulosa por el método de Southern (39).

El gel se colocó en una solución de 1.5M NaCl; 0.5M NaOH, para la desnaturalización del DNA, durante una hora a temperatura ambiente y con agitación; posteriormente el gel se colocó en una solución neutralizadora (1M Tris-HCl, pH 8.0;

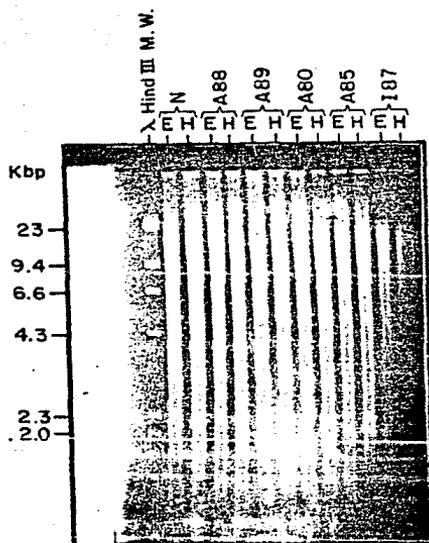


Figura 3. Tinción con bromuro de etidio del DNA digerido con enzimas de restricción Eco RI (E) e HindIII (H) y separado por electroforesis en geles de agarosa.

1.5M NaCl) durante una hora a temperatura ambiente en agitación constante. Para la transferencia, el gel se colocó en posición invertida sobre papel Wathman 3MM previamente equilibrado con solución de citrato salina 10X (SSC 20X: 0.3M citrato de sodio; 3M NaCl); y sobre el gel un filtro de nitrocelulosa (Bio-Rad) equilibrado en solución SSC 2X, y dos hojas de papel Wathman 1MM; 5 cm de papel absorbente y un peso de 0.5 Kg se colocó encima (ver Figura 4). Así, de esta manera el DNA es transferido (durante 24 horas) por capilaridad del gel al filtro de nitrocelulosa. Se removió el filtro y secó a temperatura ambiente entre dos hojas de papel Wathman 3MM. Posterior a esto se horneó el filtro durante dos horas a 80°C al vacío.

### III.7. Aislamiento y marcaje radioactivo de los plásmidos HLMxba y Ryc 7.4.

El plásmido HLMxba contiene el fragmento de 3.5 Kpb HindIII-XbaI del oncogen c-myc que abarca parte de secuencia altamente conservada del extremo 5' y el primer exón, clonado en pBR322 (donado por el Dr. D. Sthehelin del Instituto Pasteur, Francia). El plásmido Ryc 7.4 es un cDNA del oncogen c-myc que abarca 60% del segundo exón y todo el tercer exón clonado en pBR322 (donado por el Dr. C.M. Croce del Instituto Wistar, USA) (ver Fig 2). Los plásmidos fueron aislados por medio de un gradiente isopícnico de CsCl, según la metodología empleada en el laboratorio (40). Los plásmidos se marcaron radioactivamente

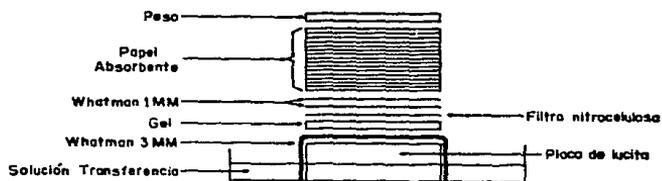


Fig. 4 Transferencia de DNA  
(Tipo Southern)

El DNA se transfiere por capilaridad hacia el filtro de nitrocelulosa, y en éste se realiza la hibridación.

por medio de la técnica de Nick-Translation (41) de la siguiente manera:

- a) 1-2 ug de DNA plasmídico.
- b) 20 ul sol. 1 nucleotídica (100 uM dATP, 100 uM dGTP, y 100 uM dTTP).
- c) 25 ul de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (10mCi/ml, 6000Ci/mmol).
- d) 10 ul de sol. 2 enzimática (5 U DNA polimerasa I y 100 pg DNasa I) se incubó a 15°C durante 3 horas.

Los nucleótidos no incorporados fueron separados por medio de cromatografía en Sephadex G-50 (Pharmacia, Fine Chemical) equilibrada con TE pH 8.0 y 0.1% SDS; se colectaron fracciones de 1 ml y la radioactividad emitida de una alícuota de 1 ul en solución de centelleo: 0.5% PPO (2,5 difeniloxazol), 0.03% POPOP (p-bis 2-(5-feniloxazolil)-benceno), disuelto en tolueno, fue determinada en un contador de líquido de centelleo (Tri-Carb 4000 series Minaxi-beta). La actividad específica fue de  $2-4 \times 10^8$  cpm/ug.

### III.8. Prehibridización e hibridización del filtro de nitrocelulosa.

El filtro se remojó en solución 6X durante 3 minutos y se colocó en una bolsa de plástico que contenía 50 ml de: 50% (v/v) de Formamida (Bethesda Research Laboratories), SSPE 5X (20X: 3.6M NaCl; 200mM Fosfato disódico; 20mM EDTA, pH 8.0), 0.1% SDS, solución Denhardt's 5X (50X: 1% Ficoll 400; 1% Polivinilpirrolidona; 1% Albúmina sérica bovina) y 100 ug de

DNA de esperma de salmón desnaturalizado por calor; esto se incubó a 42°C durante 18 horas, para su hibridización.

Para la hibridización se adicionó 5-10 x10<sup>7</sup>cpm del plásmido marcado (desnaturalizado por calor), 12 ml de la solución antes mencionada y 400 ul de EDTA 0.5M. Se incubó a 42°C durante 24 horas.

### III.9 Lavado de los filtros de nitrocelulosa.

Se retiró el filtro de la solución hibridadora y fue lavado en una solución de SSC 2X a 50°C durante 10 minutos dos veces. Posteriormente se lavó con una solución de 0.1X SSC y 0.1% SDS a 50°C durante 30 minutos dos veces también. El filtro se secó a temperatura ambiente.

### III.10. Autorradiografía.

Se colocó el filtro en cassetes con pantallas intensificadoras y películas para Rayos X (Kodak X-Omat-K). Los cassetes fueron guardados a -70°C durante 3-5 días y posteriormente se revelaron y analizaron los resultados obtenidos.

#### IV. RESULTADOS

Los pacientes fueron debidamente evaluados clínicamente para el diagnóstico de LES en base a los criterios de la Asociación Norteamericana de Reumatología (ARA, 42).

El LES activo puede presentarse como una enfermedad sistémica rápida y progresiva con fiebre, manifestaciones cutáneas, efusiones sinoviales, poliartritis, enfermedad del sistema nervioso central, niveles elevados de anticuerpos contra DNA, ANA positivos, disminución de complemento y elevación de los niveles de inmunoglobulinas; o puede seguir un curso inaparente (LES inactivo) por remisiones y exacerbaciones espontáneas con síntomas clínicos solamente de malestar, mialgias y artralgias.

Así fueron analizados 25 pacientes con LES, 6 pacientes inactivos y 19 activos; los datos clínicos y de laboratorio fueron proporcionados por el laboratorio de reumatología y médicos del Hospital de Especialidades del Centro Médico "La Raza", IMSS, además, diez muestras de personas normales fueron incluidos como testigos.

En todas los testigos fue posible detectar por el método de Southern el proto-oncogen c-myc, encontrándose las bandas de 13 Kpb con la digestión de la enzima EcoRI y 12 Kpb con la digestión de la enzima HindIII (ver Figura 5), y además se incluyó la línea celular HL-60, como control positivo, en la cual se ha reportado un grado de amplificación de 20 veces del oncogen c-myc (19). Estos resultados concuerdan con los reportes

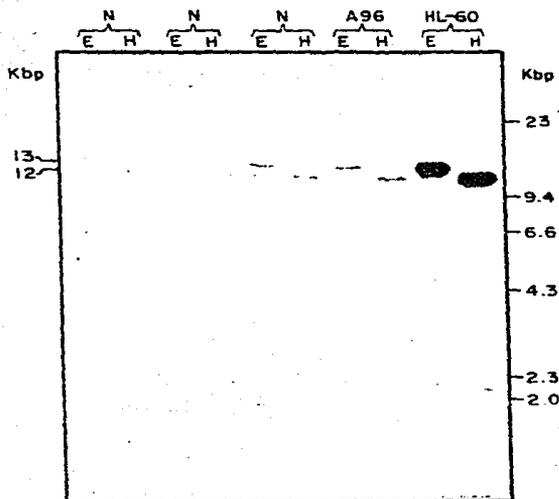


Figura 5. Hibridación de la sonda HLMXba a secuencias normales del proto-oncogen c-myc en linfocitos normales (N) y en un paciente con LES activo (A). Además se incluye como control positivo la línea celular HL-60 de Leucemia Promielocítica que muestra amplificación. El DNA fue digerido con enzimas de restricción Eco R1 (E) y con Hind III (H).

hallados en tejidos normales (fibroblastos y leucocitos) y nos sirvieron de referencia para estimar las alteraciones que sufre este gen en los pacientes con LES.

Dentro de las muestras de los 25 pacientes con LES, solamente cinco mostraron tener el gen c-myc en forma aparentemente normal, aunque no se descarta la posibilidad de que otros oncogenes como c-raf, c-mos, c-myb, pudieran estar alterados en estos pacientes, como se ha reportado previamente (32).

Por lo tanto los otros 20 pacientes con LES presentaron alteraciones del oncogen c-myc (amplificación y/o rearreglo).

Las alteraciones mas comunes que sufre el oncogen c-myc son: i) amplificación génica (17-19), ii) inserción viral (26) y iii) translocaciones cromosómicas y rearreglos genéticos (27-29). Esta última es muy frecuente en el linfoma de Burkitt, enfermedad degenerativa de los linfocitos B, con la sobreproducción de inmunoglobulinas (27). En este punto, habría una pequeña analogía con el LES, ya que como se mencionó anteriormente (ver introducción) existe una excesiva producción de autoanticuerpos, por lo que tomaremos de ejemplo, para tratar de explicar las alteraciones encontradas en el LES (principalmente cuando encontramos rearreglo o bandas adicionales a las normales).

#### IV.1. Amplificación del oncogen c-myc en las muestras de pacientes con LES.

De las muestras analizadas, 7 muestras después del corte con enzimas de restricción y analizadas con el plásmido marcado

que contiene un fragmento de 3.5 Kpb HindIII-XbaI del primer exón del oncogen c-myc, mostraron un grado de amplificación mayor al del control (pacientes activos 68, 95, 69, 74, 75, 79 e inactivo 70; Figura 6), que fue estimada por medio del analisis densitométrico de las autorradiografías en un espectrofotómetro Beckman DU-7 (calculando el área bajo la curva de cada muestra amplificada con respecto al area del control normal). De esta manera encontramos un grado de amplificación de 3 a 20 veces, tanto en pacientes activos como en los inactivos.

En un solo caso (paciente A68, Figura 6) el grado de amplificación fue de 20 veces, y por solo presentarse en un solo caso, no podemos generalizar que un grado elevado de amplificación sea comun en el LES. Es importante notar, que también en un solo caso de Leucemia Promielocítica, existe el mismo grado de amplificación, y la línea celular derivada de ella (línea HL-60) presenta la amplificación (19).

Las demás muestras de pacientes que presentaron amplificación fue en menor grado, de 3 a 7 veces (ver Tabla 4A).

Así comprobamos, que en el LES, el oncogen c-myc está amplificado en un 28% (en este estudio), y al presentarse tanto en pacientes activos como en los inactivos, no podemos establecer una posible correlacion clínica en cuanto al grado de amplificación.

En estudios del oncogen c-myc, en la línea celular HL-60, en donde se encuentra amplificado, se ha visto que existe una mayor expresión, y por lo tanto un mayor nivel de RNAm de c-myc

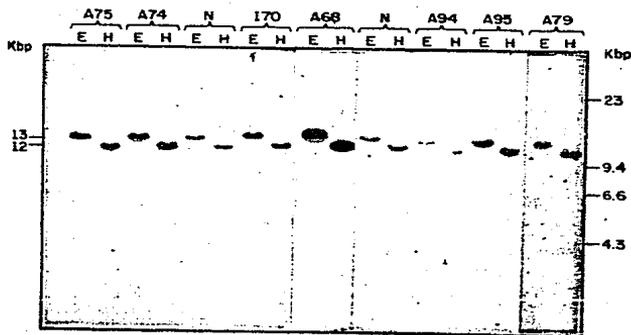


Figura 6. Amplificación del oncogen c-myc en muestras de DNA de pacientes con LES. El DNA se digirió con Eco RI (E) y con HindIII (H) y se analizó por el método de Southern. LES activo (A) e inactivo (I) muestran un grado moderado de amplificación con respecto a los linfocitos normales (N). Solo el paciente A68 tiene un mayor grado de amplificación; además se incluye un paciente con el gen normal (A94).

(lo cual es atribuible al grado de amplificación). Además, en trabajos recientes se ha observado que en pacientes con LES, existe una mayor expresión de c-myc, la cual es mayor en pacientes activos que en pacientes inactivos (43). Esto pudiera deberse a una amplificación del oncogen c-myc (como lo muestran los resultados obtenidos) o por una activación "in vivo" en los linfocitos.

En un principio, se aisló el RNA de los linfocitos de pacientes con LES, y se hibridó a la sonda radioactiva HLMXba, y se pudo comprobar efectivamente que había niveles mayores de RNA de c-myc en pacientes activos (dato no mostrado). Debido a la extrema inestabilidad y vida media muy corta, de aproximadamente 15 minutos del RNAm de c-myc (44) se dejó de hibridar el RNA.

#### IV.2. Rearreglo del oncogen c-myc en las muestras de pacientes con LES.

Como se mencionó anteriormente, una de las alteraciones que sufre el oncogen c-myc es el de ser rearrreglado y translocado, especialmente en el linfoma de Burkitt y en algunas líneas celulares de Leucemia (45).

En la enfermedad de LES, al ser detectado el oncogen c-myc se observan fragmentos de diferente tamaño al gen normal de 13 Kpb y 12 Kpb con las enzimas EcoRI y HindIII respectivamente. Los fragmentos así detectados, se dice que han sido rearrreglados (45).

En la mayoría de las muestras de DNA de pacientes con LES (13 en total) fue detectado el gen c-myc y secuencias de éste,

en fragmentos de diferente tamaño, los cuales fueron de 5.3, 4.3, 3.5 y 2.8 Kpb.

En un grupo de 6 pacientes (A82, A86, A92, A93, I83, I84) con un rearrreglo del oncogen c-myc, las bandas detectadas fueron de 5.3 y 4.3 con las enzimas EcoRI y HindIII, respectivamente, (Figura 7); y otros 6 pacientes (A90, A89, A88, A80, A85, I87) mostraron las mismas bandas de 5.3, 4.3 Kpb y otras adicionales de 3.5 y 2.8 Kpb con las mismas enzimas, mencionadas anteriormente (Figura 8). En un solo caso (paciente A71, dato no mostrado) las bandas rearrregladas fueron de 3.5 y 2.8 Kpb (ver Tabla 4).

Es importante notar que también fue posible detectar el "alelo" normal (esto es, los fragmentos de 13 y 12 Kpb).

En un análisis similar utilizando una sonda diferente, que contiene los exones 2 y 3 (plasmido pRyc 7.4) se observaron los mismos fragmentos rearrreglados que se obtienen con la sonda del primer exon (Figura 9).

Al estar la mayoría de las muestras de pacientes con LES rearrregladas, lo que respresenta un 52% de este tipo de alteración, nos indica de alguna manera que estos rearrreglos genéticos del oncogen c-myc es el evento mas importante que sucede en el LES.

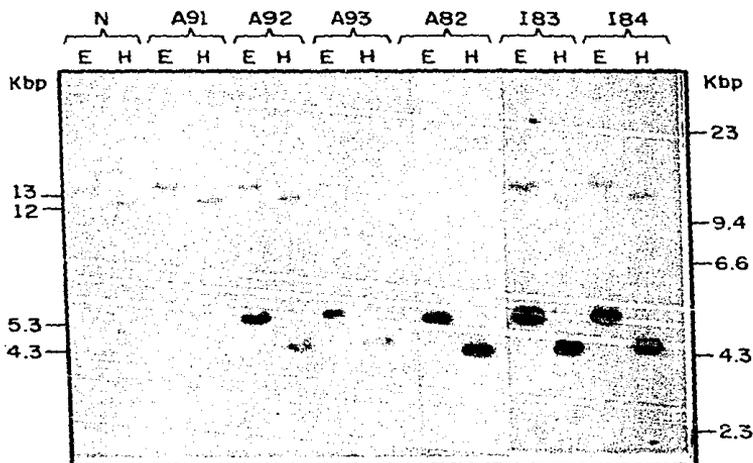


Figura 7. Fragmento rearrreglado de c-myc en LES. Muestras de DNA de pacientes con LES activo (A) e Inactivo (I) y linfocitos normales (N) fueron digeridos con --EcoRI (E) e HindIII (H), hibridizados con la sonda --HLMXba. Se detectaron en las muestras bandas amplificadas de 5.3 y 4.3 Kbp. La sonda detecta además la línea germinal. El paciente A91 también con el gen normal es incluido.

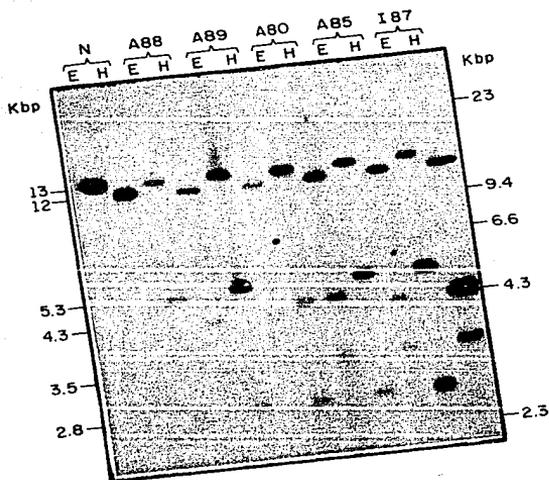


Figura 8. Dos fragmentos c-myc rearrregados en el LES. El DNA fue procesado como se indica en Materiales y Métodos. Se observa el alelo normal de 13 y 12 Kpb (digerido con EcoRI e HindIII, respectivamente) y otras bandas re-arregladas de 5.3, 2.8 Kpb con EcoRI y de 4.3 y 3.5 Kpb con HindIII.  
 A: LES activo; I: LES inactivo; N: Linfocitos normales; E: EcoRI; H: HindIII.

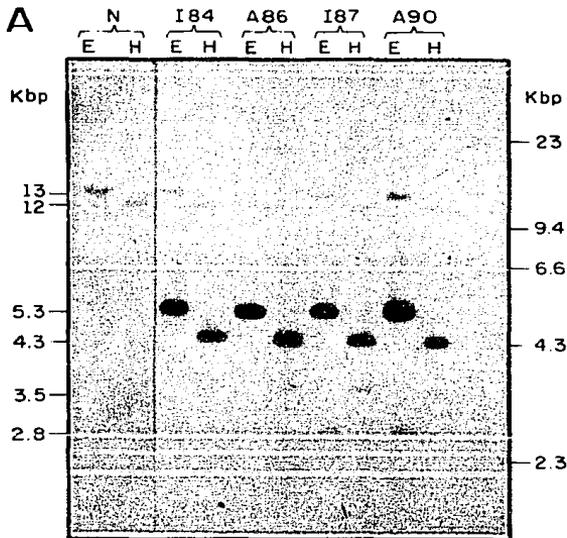


Figura 9. Rearreglos similares del oncogen c-myc detectados con sondas diferentes. Muestras de --DNA fueron digeridos con EcoR1 (E) o HindIII (H) de pacientes con LES activo (A), inactivo (I) Y Linfocitos normales (N). Panel A: Hibridación con la sonda conteniendo el primer exón (HLMXba) que detecta diferente grado de rearrreglos. Panel B: Rehibridación del mismo filtro de nitrocelulosa utilizando la sonda que contiene el 2° y 3° exon (pRyc 7.4), en las cuales se observan los mismos rearrreglos.



TABLA 4. A) Amplificación de c-myc en pacientes con LES.

Paciente No.	Grado de actividad	Grado de amplificación
68	A, Renal	20 X
95	A, Renal	6 X
69	A, Trombocitopenia	5 X
74	A, Mucocutáneo	4 X
79	A, Renal	4 X
75	A, Renal	3 X
70	Inactivo	3 X

B) Rearreglo y amplificación de c-myc en pacientes con LES.

Paciente No.	Grado de Actividad	Fragmento rearreglado	
		EcoRI 5.3	HindIII 4.3 Kpb
82	A, Mucocutáneo	10 X	10 X
86	A, Mucocutáneo	12 X	12 X
92	A, Renal	9 X	3 X
93	A, Renal	7 X	2 X
83	Inactivo	13 X	13 X
84	Inactivo	12 X	12 X

C) Rearreglo de dos fragmentos con amplificación de c-myc en pacientes con LES.

Paciente No.	Grado de Actividad	Fragmentos rearreglados			
		EcoRI 5.3 2.8		HindIII 4.3 3.5 Kpb	
90	A, Mucocutáneo y Vasculitis	14X	1X	7X	1X
89	A, Mucocutáneo	12X	1X	2X	1X
88	A, Vasculitis	2X	1X	2X	1X
80	A, Vasculitis y Ulceras orales	*	2X	9X*	2X
85	A, Mucocutáneo	11X	1X	9X	1X
87	Inactivo	12X	1X	9X	1X

A: Paciente activo; \*: Mismo fragmento con la enzima EcoRI. Paciente A71 presentó un rearreglo de c-myc de 2.8 y 3.5 Kpb para EcoRI y HindIII, respectivamente, el cual no es mostrado en las figuras. El paciente A69 tampoco es mostrado en las figuras.

## V. DISCUSION

En las enfermedades autoinmunes mas extensamente estudiadas, como es el Lupus Eritematoso Sistémico (LES), ha sido demostrado que la hiperactividad de los linfocitos B y defectos de linfocitos T juegan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad (43). Subpoblaciones de linfocitos T han sido estudiadas. La función supresora está disminuida en pacientes con LES, sin embargo, la función cooperadora no ha sido adecuadamente estudiada en las enfermedades del tejido conectivo, reflejandose como resultado de la activación de linfocitos B, y particularmente cuando éstas células se vuelven hiperactivas a través de una excesiva estimulación o por medio de la desrregulación inmune(7). En suma, un aumento de la producción del factor de crecimiento para células B (BCGF) ha sido determinado en sangre periférica de pacientes con LES activo, pero no en pacientes en remision. Así, el aumento de BCGF puede ser un factor determinante en la inducción de autoanticuerpos cuando el LES se vuelve activo (52).

Muchos de los trabajos actuales en oncología molecular han mostrado que el desarrollo de una célula neoplásica a partir de un progenitor normal, es consecuencia de cambios (probablemente multiples) restringidos en algunos miembros de genes celulares. Tales cambios podrían ser epigenéticos, por la creencia prevalente de que el cáncer tiene su origen en mutaciones, y el poder identificar alteraciones en el DNA han enfocado la atención primariamente sobre los eventos genéticos. Los genes

mutantes son conocidos como oncogenes, y corresponden a un amplio tipo de alelos que son llamados proto-oncogenes (u oncogenes celulares normales).

Así, los proto-oncogenes pueden ser activados por cambios cualitativos (por ejemplo, mutación) y/o cambios cuantitativos (por ejemplo, amplificación génica, rearrreglos o por la activación de señales regulatorias transcripcionales) como resultado de un número de factores externos (8). Con un entendimiento adicional de la estructura y función de estos genes, en ambos procesos normales y anormales, se espera tener una clara idea en la biología básica del cáncer humano.

Una expresión aumentada de proto-oncogenes en linfocitos de sangre periférica de pacientes con LES y otras enfermedades autoinmunes ha sido reportada recientemente (32, 41). Ambos linfocitos B y T de pacientes con LES tienen una expresión aumentada de RNA significativamente de c-raf, c-myb y c-myc (41). Similares incrementos de transcripción de c-myc también ha sido reportada en células linfoides de uno de los modelos murinos de LES (31). Sin embargo, ninguna evidencia de amplificación o rearrreglo del gen c-myc fue obtenida en estos experimentos. En suma, no han sido descritos rearrreglos en la autoinmunidad, sugiriendo que la activación de oncogenes puede ocurrir a través de distintas formas que operan en neoplasias (32). No obstante, la asociación entre enfermedades autoinmunes y desordenes linfoproliferativos han sido reconocidos en humanos (44) y en animales (45). Incluso se piensa que muchos factores pueden contribuir para una incidencia mayor en la autoinmunidad,

por ejemplo, vigilancia inmune no apropiada o tratamiento con drogas inmunosupresoras, alteraciones de proto-oncogenes, tales como c-myc, seguido de su activación, puede ser un importante paso en el proceso inicial, en alguno de estos pacientes.

En este trabajo se muestran (por hibridación en condiciones de alta astringencia) resultados que sugieren fuertemente que en linfocitos de ambos pacientes activos e inactivos con LES, el gen c-myc está alterado (amplificado con o sin rearrreglo) en el 80% de las muestras de DNA analizadas.

Se cree que el gen c-myc es aparentemente modulado desde su RNAm correspondiente (44, 48) y proteína (49) teniendo una vida media corta in vivo. Así, una disminución en la concentración del RNAm c-myc podría ser asociado con una rápida pérdida de la proteína c-myc disponible. La sobreproducción de RNAm c-myc puede resultar claramente de la amplificación génica (17, 50), esta ruta es, sin embargo, el único mecanismo poco probable por el que el exon I de c-myc juegue un papel de control transcripcional y en la degradación del RNA. Por ello, rearrreglos del gen c-myc podrían también permitir niveles elevados de los transcritos. En células normales y en el LES es quizás necesario proveer de un estímulo para inducir la expresión de RNAm c-myc después de la proliferación y división celular, sin embargo, en una subpoblación diferente de pacientes con LES, la acumulación de RNAm c-myc (y subsecuentemente de la proteína c-myc) en linfocitos podrían obedecer a los mecanismos de alteración mencionados anteriormente. Alteraciones más extensivas del proto-oncogen

c-myc (o la intervención de un segundo oncogen) podría estimular a las células sanguíneas para el continuo proceso anormal.

El mecanismo involucrado en la translocación cromosómica de c-myc es todavía desconocida y parece estar asociada por una serie de factores, incluyendo localización geográfica. Por ejemplo, el linfoma de Burkitt endémico (tipo Africano) es caracterizado por la completa asociación (en 96% de los casos) con el virus Epstein-Barr. El linfoma de Burkitt esporádico (tipo Americano) es caracterizado por una menor incidencia, una distribución mundial y asociado ocasionalmente con EBV. Ha sido reportado recientemente que la ruptura cromosómica y alteraciones estructurales del locus c-myc difieren de las formas endémica y esporádica (51). En el linfoma endémico el punto de ruptura está localizado afuera del locus c-myc, contrariamente, en la forma esporádica, la translocación cromosómica rompe al gen dentro de la región 5' que incluye el primer intrón, el primer exón y secuencias adyacentes 5' (51). Así, estas observaciones son sugerentes que diferencias geográficas pueden modificar el patrón de alteraciones del oncogen c-myc. Además en el linfoma esporádico, es caracterizado también por una significativa secreción de IgM, en donde la lesión molecular de c-myc correlaciona con la capacidad de secretar esta inmunoglobulina. Probablemente un fenómeno similar ocurra en nuestra población de pacientes con LES, en el cual el proto-oncogen está alterado.

La presencia de alteraciones del proto-oncogen c-myc detectados en pacientes con LES abren un nuevo campo de investigación molecular en la autoinmunidad humana.

## VI. CONCLUSIONES

El oncogen c-myc está alterado en el 80% de las muestras de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico, analizadas con la sonda HLMXba marcada radioactivamente con  $^{32}\text{P}$ , que contiene la secuencia del primer exón.

Encontramos amplificación del oncogen c-myc en 7 muestras y rearreglado en 13 muestras de pacientes con LES, tanto en activos como inactivos, por lo que no es posible establecer relación clínica alguna.

En todas las muestras de testigos fue posible detectar el gen c-myc normal (como proto-oncogen), lo que nos indica que las alteraciones detectadas del proto-oncogen c-myc en el LES, está implicado en la patogénesis de la enfermedad.

## VII. BIBLIOGRAFIA

- 1) Koffler, D. (1980) Systemic Lupus Erythematosus. *Scient. Ameri.* 243:40-51.
- 2) Takeuchi, T. (1985) Spontaneous Production of Antibodies to Deoxyribonucleic acids in patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Clin. Immunol. Immunopa.* 35:47-56.
- 3) Otsuka, T., Okamura, S., Niho, Y., Kusaba, T. (1985) B cell activity and regulatory T cell function in Systemic Lupus Erythematosus by human B cell colony formation. *J. Rheum.* 12:508-513.
- 4) Mach, P.S., Kharouby, M., Lutcher, F., Oliver, J.L., Bazely, N., Dougados, M., Inseem, B.A. (1984) The invitro production of antinuclear antibodies by human peripheral blood mononuclear cells. Demonstration of T cell requeriment and soluble inducing factor(s) for anti-nuclear antibodies triggerinh in patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 54: 535-540.
- 5) Yano, K., Morimasa, K., Asano, T., Shinohara, Y., Ota, Z. (1985) Characterization of the spontaneous DNA-synthesizing and/or IgG-Secreting cell in peripheral blood from patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Clin. Immunol. Immunopa.* 35:57-66.
- 6) Hirose, T., Hara, M., Kitani, A., Hirose, W., Norioka, K., Kawagoe, M., Nakamura, H. (1985) Abnormal production of and response to B-cell growth factor and B-cell

- differentiation factor in patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Scand. J. Immunol.* 21:141-150.
- 7) Smolen, J.S., Morimoto, C.H., Steinberg, A., Wolf, A., Scholssmat, T., Steinberg, R., Penner, E. (1985) Systemic Lupus Erythematosus: delineation of subpopulations by clinical, serological and T cell subset analysis. *Ameri. J. Med. Scie.* 289:139-147.
  - 8) Bishop, J.M. (1983) Cellular oncogenes and retroviruses. *Annu. Rev. Biochem.* 52:301-354.
  - 9) Bishop, J.M. (1982) Oncogenes. *Scient. Ameri.* 246:80-92.
  - 10) Weinberg, R.A. (1983) A molecular basis of cancer. *Scient. Ameri.* 249:102-116.
  - 11) Hunter, T. (1984) The proteins of oncogenes. *Scient. Ameri.* 251:60-69.
  - 12) Janet, D.R. (1983) Human oncogenes locations and chromosome aberrations. *Nature* 301:290-291.
  - 13) Neel, B.G. (1982) Two human c-onc genes are located on the long arm of chromosome 8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:7842-
  - 14) Gilden, R.V., Rice, N., McAllister, R. (1984) Oncogenes. *Gene. Anal. Techn.* 1:23-33.
  - 15) Tabin, C.J., Bradley, S.M., Bargmam, C.I., Weinberg, R.A Papageorge, A.G. (1982) Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 300:143-149.
  - 16) Yuasa, Y., Srivastava, S.K., Dunn, C.Y., RHIM, J.S.,

- Reddy, E.P., Aaronson, S.A. (1983) Acquisition of transforming properties by alternative point mutation within c-bas/has human neoplasia. *Nature* 303:775-779.
- 17) Alitalo, K., Schwab, M., Lin, C.C., Varmus, H.E., Bishop, J.M. (1983) Homogeneously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed oncogene (c-myc) in malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:1707-1711.
- 18) Collins, S.J., Groundine, M. (1982) Amplification of endogenous myc-related DNA sequences in a human Myeloid leukaemia cell line. *Nature*. 298:679-681.
- 19) Dalla-Favera, R.C., Wong-Staal, F., Gallo, R.C. (1982) Onc gene amplification in promyelocytic leukaemia cell line HL-60 and primary leukaemic cells of the same patient. *Nature*. 299:61-63.
- 20) Kohl, N.E., Kanda, N., Schreck, R.R., Burns, G., Latt, S.A. (1984) Transposition and amplification of oncogene related sequences in human neuroblastomas. *Cell* 35:359-367.
- 21) Schwab, M., Alitalo, K., Klempnauer, K.H., Varmus, H.E., Bishop, J.M. (1983) Amplified DNA with limited homology to the myc cellular oncogene. *Nature*. 305: 245-248.
- 22) Cuyppers, H.T., Selten, G., Quint, W., Zijlstra, M., Maandag, E.R. (1984) Murine leukemia virus-induced T-cell lymphomagenesis: Integration of proviruses in a

distinct chromosomal region. Cell. 37:141-150.

- 23) Fung, Y.K.T., Lewis, W.G., Kung, H.J., Crittenden, L.B. (1983) Activation of the cellular oncogene c-erbB by LTR insertion: Molecular basis for induction of erythroblastosis by avian leukosis virus. Cell 33:357-368.
- 24) Hayward, W.S., Neel, B.G., Astrin, S.M. (1981). Activation of a cellular oncogene by promoter insertion in ALV-induces lymphoid leukosis. Nature. 209:475-479.
- 25) Neel, B.G, Hayward, W.S., Robinson, H.L., Fang, J., Astrin, S.M. (1981) Avian leukosis virus-induced tumors have common proviral integration sites and synthesize discrete new RNAs. Oncogenesis by promoter insertion. Cell. 23:323-334.
- 26) Payne, G.S., Bishop, J.M., Varmus, H.E. (1982) Multiple arrangements of viral DNA and an activated host oncogene (c-myc) in bursa lymphomas. Nature. 295:209-217.
- 27) Croce, C.M., Klein, G. (1985) Chromosome translocations and human cancer. Scient. Ameri. 252:44-50.
- 28) Dalla-Favera, R., Bregni, M., Erikson, J., Ratterson, D, Gallo, R.C., Croce, C.M. (1982) Human c-myc oncogene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt Lymphoma cells. Proc. Natl. Acad Sci. USA. 79:7824-7827.
- 29) Dalla-Favera, R., Martinotti, S., Gallo, R.C., Erikson, J., Croce, C.M. (1983) Translocation and rearrangents of the c-myc oncogene locus in human undifferentiated

B-cell Lymphomas. Science 219:963-967.

- 30) Lenior. G.M., Preud'homme, J.L., Bernheim, A., Berger, R (1982) Correlation between immunoglobulin lighth chain expression and variant translocation in Burkitt lymphoma Nature 298:474-476.
- 31) Mounts, J.D., Steinberg, A., Kilman, D.M., Smith, H.H. (1984) Autoimmunity and increased c-myb transcription. Science. 226:1087-1089.
- 32) Williams. R.C., Wilmer, M.D., Husby, G. (1986) Oncogenes viruses or Rheumogenes" (Ed.) The Americam Journal of Medicine. 80:1011-1016.
- 33) Kelly, K., Cochran, B.H., Stiles, C.D. (1983) Cell-Specific regulation of the c-myc gene by lymphocytes mitogens and Platelet-Derived Growth Factor. Cell. 35: 603-610.
- 34) Suzuki, H., Nakanishi, K., Steinberg, A., Green, I. (1986) Induction of c-myc expression in the early in the course of the B-cell activation: Studies in normal human and patients with Systemic Lupus Frythematosus. Inc. Archs. Allergy appl. Immun. 79:380-387.
- 35) Reed, J.C., Nowell , P.C., Hoover, R.G. (1985) Regulation of c-myc mRNA levels in normal human lymphocytes by modulators of the cell proliferation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4221-4224.
- 36) Smeland, E., Gadal, T., Round, E., Beiske, K., Funderud, S., Clark, E.A., Pfeifer-Ohlsson, S., Ohlsson, R. (1985) The specific induction of myc protooncogene expression

in normal human B-cell is not a sufficient event for acquisition of competence to proliferate. Proc. Natl. Acad Sci. USA. 82:6255-6259.

- 37) Böyum, A. (1968) Separation of lymphocytes from blood and bone marrow. Scand. J. Clin. Lab. Inves. 21 suppl. 97:72-93.
- 38) Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, M. (1982) J Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor.
- 39) Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by lectrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503-517.
- 40) Ocadiz, R. (1986) Caracterizacion de un plásmido el cual contiene un fragmento del oncogen c-myc humano. Tesis Profesional. ENCB-IPN.
- 41) Rigby, P.J. (1977) Labeling deoxirribunucleic acid to high specific activity in vitro by Nick-Translation with DNA polimerase I. J. Mol. Biol. 113:237-251.
- 42) Tan, E.M., Cohen, A.S., Fries, J., Masi, A.T., McShase, D.J., Rothfield, N.F., Schaller, J., Talal, N., Winchester, R. (1982) Criteria for the classification of Systemic Lupus Erythematosus (ARA Abstracts) Arthritis Rheum. 25:1271-1277.
- 43) Boumpas, D.T., Tsokos, G.C., Mann, L.D., Eleftheriades, E.G., Harris, C.C., Mark, G.E. (1986) Increased proto-oncogene expression in peripheral blood Lymphocytes from patients with Systemic Lupus Erythematosus and other autoimmune diseases. Aarthritis Rheum. 29:755-760.
- 44) Dani, C.H., Mechli, N., Piechaczyk, M., Lebleu, B., Jeanteur, P.H., Blanchard, J.M. (1985) Increased rate of degradation of

- c-myc mRNA in interferon-treated Daudi cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4896-4899.
- 45) Saglio, G., Bervely, S.E., Guerrasio, A., Giubellino, M.C., Serra, A., Lusso, P., Cambria, R.G., Mazza, U., Malavasi, F., Pegoraro, L. Fao, R. (1986) 3' c-myc rearrangement in Human Leukemic T-cell line. Cancer Research 46:1413-1417.
- 46) Green, J.A., Dawson, A.A., Waljer, W. (1978) Systemic Lupus Erythematosus and Lymphoma. Lancet 2:753-755.
- 47) Mellors, R.C. (1966) Autoimmune disease in NZB/BL mice: autoimmunity and malignant Lymphoma. Blood 27:435-448.
- 48) Rabbitts, P.H., Forster, A., Stinson, M.A., Rabbitts, T.H. (1985) Truncation of exon 1 from c-myc gene results in prolonged c-myc mRNA stability. EMBO J. 4:3727-3733.
- 49) Hann, S.R., Abrams, H.D., Rohrschneider, L.R., Eisenman, R. N. (1983) Proteins encode by v-myc and c-myc oncogenes: Identification and localization in acute leukemia virus transformants and Bursal Lymphoma cell line. Cell 34:789-796.
- 50) Little, C.D., Nau, M.M., Carney, D.N., Gazdar, A.F., Minna, J.D. (1983) Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. Nature 306:194-196.
- 51) Pelicci, P., Knoweles, D.M., Magrath, I., Dalla-Favera, R. (1986) Chromosomal breakpoints and structural alterations of c-myc locus differ in endemic and sporadic forms of Burkitt Lymphoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:2984-2988.
- 52) Martinez-Cordero, E., Alcocer-Varela, J., Alarcon, D. (1986) Stimulating and differentiation factor for human B lymphocytes in systemic lupus erythematosus. Clin. exp. Immunol. 65:598-604.