



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

POSIBLES ALTERACIONES DEL ONCOGENE N-Ras EN TUMORES DE CEREBRO DE HUMANO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

ANA LORENA GUTIERREZ ESCOLANO

MEXICO, D.F.

1987

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

INDICE

	PAGINA
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	4
OBJETIVOS.....	34
MATERIAL Y METODOS.....	35
CRECIMIENTO DE LA CEPA.....	35
AISLAMIENTO DEL PLASMIDO.....	35
PURIFICACION DEL PLASMIDO.....	36
CARACTERIZACION DEL PLASMIDO...	37
MARCADO DEL PLASMIDO.....	41
CROMATOGRAFIA DEL PLASMIDO.....	42
HOMOGENIZACION DEL TEJIDO.....	44
ELECTROFORESIS DEL GEL DE AGAROSA.....	50
TRANSFERENCIA TIPO SOUTHERN....	50
PREHIBRIDACION E HIBRIDACION...	54
DISCUSION.....	78
CONCLUSIONES.....	82
BIBLIOGRAFIA.....	85

AGRADEZCO GRANDEMENTE EL APOYO QUE SIEMPRE HE RECIBIDO DE MI FAMILIA QUE ME HA AYUDADO A ALCANZAR DE MANERA MAS FACIL, AGRADABLE Y CON MUCHO AMOR TODO LO QUE HASTA AHORA HE LOGRADO.

GRACIAS POR DARME TANTO. CON TODO EL AMOR DEL MUNDO:

-A MIS PADRES TERESA Y ENRIQUE (DE QUIENES HE RECIBIDO SIEMPRE LO MEJOR).

-A MI TIO RAMON (GRACIAS POR ESTAR SIEMPRE PENDIENTE DE MI ESCUELA)

-A MIS HERMANAS FERNANDA Y ELENA (QUE ME HAN DADO SIEMPRE EL MEJOR EJEMPLO).

-A MIS CUÑADOS CARLOS Y GUSTAVO (A QUIENES QUIERO TANTO).

A MIS AMIGAS DEL ALMA, MIRIAM Y MARY TERE CON LAS QUE HE VIVIDO SITUACIONES IMBORRABLES, Y CON LAS QUE SIEMPRE PUDE CONTAR. GRACIAS POR TODOS LOS MOMENTOS QUE VIVIMOS (Y VIVIREMOS) JUNTAS Y POR NO DEJARME DERRUMBAR EN MOMENTOS DIFICILES. AMIGAS ASI SE QUIEREN PARA TODA LA VIDA.

GRACIAS TAMBIEN A SUS PADRES QUE NOS DIERON SIEMPRE TANTO APOYO.

A WILOX Y RENE CON UN CARINO MUY ESPECIAL POR SU AYUDA TAN GRANDE Y POR SUS CONSEJOS TAN ATINADOS. SIN USTEDES TODO ESTO HUBIERA SIDO MUY DIFICIL.

MUCHAS GRACIAS, AL DR. CARLOS FERNANDEZ TOMAS POR SU ENSEÑANZA QUE REAFIRMO MI INTERES POR LA GENETICA. GRACIAS TAMBIEN POR SU AYUDA ACADEMICA Y POR SU CALIDAD HUMANA.

AGRADECIMIENTOS.

- GRACIAS AL DR. PATRICIO GARIGLIO VIDAL .
- GRACIAS AL DR. HUGO FIGUEROA DEL INNN POR SU AYUDA Y COLABORACION EN ESTE TRABAJO.
- AGRADEZCO AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA POR EL APOYO ECONOMICO BRINDADO PARA LA REALIZACION DE ESTA TESIS.
- AL LAB. 23. EN ESPECIAL A JOSE TAPIA, FRANCISCO Y CARLOS FERNANDEZ.
- A MI LAB. 24. MARIO, SILVIA, ELIZABETH, EDGARD, PAULA, EFRAIN, MANUEL. GRACIAS EN ESPECIAL A CHELO, ULISES, LUZ MARIA, PEDRO, ROCIO Y EDITH POR SUS CONSEJOS Y ENSEÑANZAS. (Y POR ESOS RATOS TAN AGRADABLES QUE ME ANIMARON TANTO)
- NO HAY PALABRAS PARA AGRADECER TODO LO QUE HICIERON POR MI A MAURICIO, VENANCIO, WILOX Y RENE. MIL GRACIAS PORQUE CON USTEDES FUE SIEMPRE LO MEJOR.
- A SERGIO VACA PACHECO, BERTHA HASHIMOTO, ABEL FUENTES , RAMON MORENO Y DIEGO ARENAS, PROFESORES QUE ME ENSEÑARON ALGO MUY ESPECIAL DURANTE EL TRAYECTO DE MIS ESTUDIOS EN ESTA ESCUELA.
- GRACIAS ELENA GUTIERREZ ESCOLANO POR LA IMPRESION Y REALIZACION DE LA PARTE ARTISTICA DE ESTA TESIS, Y POR HABERLO HECHO CON TANTO CARIÑO.

- GRACIAS AL ING. JORGE MARTINEZ DE CASTRO POR LAS
FACILIDADES OTORGADAS PARA LA TRANSCRIPCION DE ESTA TESIS.

- GRACIAS A ROSSY PORQUE HIZO MAS AGRADABLES LOS TRAMITES DE
ESTE TRABAJO.

RESUMEN

Una de las enfermedades que han preocupado más a la humanidad en general, es sin duda, el cáncer, ya que ocupa uno de los primeros lugares como causa de mortalidad en el mundo entero (39b).

En el campo de investigación actual tanto clínicos como científicos se han inclinado más hacia ciertos temas como lo son los recientes estudios realizados sobre oncogenes y su papel en el desarrollo de tumores (2,38,44a,45,45a y 53).

Las primeras identificaciones de genes transformantes en tumores en humanos, que fueron hacia principios de 1982, (Der y col, Parada y col, Santos y col) fueron acompañadas con especulaciones revolucionarias para el entendimiento del cancer humano(38).

El rapido progreso tecnológico en la Biología Molecular y la fusión de las ideas y perspectivas en los campos de la virología y la química de la carcinogenesis ha hecho posible un analisis a nivel molecular del desarrollo de dichos tumores y el punto principal de esta fusión ha sido el descubrimiento de los oncogenes, homologos celulares de los genes virales responsables de las propiedades neoplasicas de las celulas transformadas por los retrovirus.(4).

Uno de los ultimos descubrimientos fue en el que se demostro que los proto-oncogenes pueden existir en formas mutadas o activadas en células no infectadas por los retrovirus, que han sido transformadas por quimicos, o aislados de tumores de humano (36a,44a y 45).

Algunas de estas revelaciones provienen de experimentos de transfección con células en cultivo y algunos otros trabajos se han realizado directamente al ADN de tumores.

En nuestro trabajo, se analizaron 28 tumores de cerebro de humano, de los cuales 8 fueron astrocitomas, 8 adenomas, 7 meningiomas, 2 meduloblastomas, 2 glioblastomas, 1 germinoma, 1 oligodendroglioma y un craneofaringioma, así como 8 muestras de tejido normal de cerebro de autopsias, donadas por el INNN de la SSA para el estudio de posibles alteraciones moleculares del proto-oncogene celular N-ras en este tipo de neoplasias.

Para ningún caso se detectó alguna alteración en el ADN de dicho proto-oncogene, detectable con la metodología utilizada por nosotros, que básicamente consistió en la extracción del ADN de las células tumorales y normales y su posterior análisis mediante enzimas de restricción e hibridación con la sonda específica para el N-ras, sin embargo, existe la posibilidad de una actividad conjunta con el proto-oncogene c-myc que se encontró alterado en 11 de los 18 tumores estudiados (ya que los otros 7 casos no fueron estudiados para dicho oncogene) y que se ha reportado en trabajos anteriores (4,32a,37a y 47) o bien, la existencia de una mutación puntual (muy común en esta familia de oncogenes) no detectada por la metodología mencionada anteriormente (41,44a,45,45a,45b y 53)

Se encontró también en 17 de los tumores analizados, una alteración en una banda de 6.7 Kb que se ha reportado como un

análogo al oncogene N-ras y que se cree corresponde al protooncogene K-ras (25a,42,52a,). (Trabajos posteriores con una sonda específica para este oncogene podran corroborar lo anterior).

INTRODUCCION

Una de las enfermedades que han preocupado más a la humanidad en general, es sin duda el cáncer, ya que ocupa uno de los primeros cinco lugares como causa de mortalidad en países desarrollados, y en países subdesarrollados este valor es mayor al 10 % (12). El cáncer ocurre principalmente en personas de edad productiva, que va desde los 30 hasta los 60 años. En México, la mortalidad por neoplasias ocupa el sexto lugar, siendo este de un 11% (28,35), donde el cáncer cervico-uterino ocupa el primer lugar con un 34 %, seguido por el carcinoma broncogeno y de pecho con un 11% (39a).

Los tumores intracraneales, ocupan un 2%, provocando en el 100% de los casos, la muerte del paciente (39b).

Dentro de los tumores intracraneales, los porcentajes encontrados mas comunmente se resumen en la siguiente tabla:

1.- GLIOMA	40%	2.-METASTASICOS	23%
a.-Glioblastoma	20%	3.-MENINGIOMA	17%
b.-Astrocitoma	10%	4.-ADENOMA DE	
c.-Ependioma	6%	PITUITARIA	5%
d.-Meduloblastoma	2%	5.-SCHWANOMA	5%
e.-Oligodendro-		6.-LINFOMA	3%
glioma	1%	7.-CONGENITOS	7%
f.-Papilloma	1%	(37)	

Hasta hoy no ha sido posible predecir si un individuo puede o no desarrollar el cáncer pero se han identificado ya una gran cantidad de causas que pueden provocarlo; estas

pueden deberse: 1) al medio ambiente, como lo son las sustancias químicas carcinogénicas, a radiaciones y virus (agentes responsables de algunos tipos de cáncer), (Tabla # 1) y 2) a características del individuo en sí, como la edad, sexo, costumbres sociales y heredabilidad (37).

Las células son el producto de expresión de sus genes, (y del medio ambiente), entonces cabe pensar si son estos mismos los que se expresan en células neoplásicas, a pesar de ser estos tan distintos.

Los recientes progresos en el conocimiento de la biología molecular de los virus tumorales de animales, así como las técnicas de ingeniería genética han conducido a la identificación de genes del cáncer en células de mamífero, llamados proto-oncogenes, cuyo funcionamiento inadecuado puede ser un factor responsable de la transformación neoplásica (5,19,29).

Este enfoque hacia los eventos genéticos se debe en gran parte a la creencia prevaleciente de que el cáncer tiene sus orígenes en mutaciones (13,14) y al haber identificado alteraciones en la estructura del ADN se habla de un origen molecular, sino común en todos los cánceres, por lo menos parecido. (19). Con el reciente descubrimiento de los oncogenes, se ha efectuado el avance más espectacular en relación al mecanismo molecular que provoca la transformación celular y dichos resultados explican e integran los que tanto para la investigación clínica como para la investigación molecular se han acumulado durante muchos años (22).

Con esto, podra haber mejores diagnosticos y sera posible eliminar en forma precoz, racional y definitiva, el cáncer humano (39b).

Se sabe que en las células de mamífero estan contenidos miles de genes, entre los que podemos incluir a la familia de los oncogenes, versiones alteradas de sus alelos de tipo silvestre, los proto-oncogenes, que codifican para la producción de proteínas que desempeñan funciones de gran importancia para las células (5,5a,29). Estos proto-oncogenes se encuentran altamente conservados en la naturaleza (8,45), por ejemplo, el gene src del virus de Sarcoma de Rous que se ha encontrado en la Drosophila, el Salmon, el Pollo y en el Humano, (5,29) y el oncogene ras que se encuentra presente tanto en la levadura como en el hombre (17,28). Esto sugiere que los proto-oncogenes realizan funciones cruciales en la célula. De acuerdo con esto se conoce que los proto-oncogenes estan comunmente expresados en todos los tejidos y desempeñan un papel importante en el crecimiento, embrionario (8). Otro ejemplo es el oncogene c-sis que codifica para el factor de crecimiento de plaquetas, y el oncogene c-erb-B para el receptor del factor de crecimiento (18).

Aunque las funciones bioquímicas de los proto-oncogenes no han sido discernidas en su totalidad, recientemente se ha empezado a entender como funcionan algunas de las proteínas codificadas por algunos de ellos; estos estudios sugieren que dichas proteínas desarrollan un numero limitado de funciones (18,50,45c); algunas de las proteínas conocidas son las

codificadas por los proto-oncogenes *yes*, *frg*, *abl*, *fbs*, *fes* y *ros* que desempeñan la función de tirosina-cinasas (28); otras como las ya mencionadas son factores de crecimiento (17,18), algunas otras como la proteína *ras* tiene función de actividad GTPasa (uniéndose a residuos de guanina) (24,45c), además de tener la función de autofosforilación(34). El producto de esta proteína se localiza en la cara interna de la membrana plasmática (34), hecho que nos hace pensar que tiene un papel en la transducción de señales del factor de crecimiento que actúan desde la superficie celular hacia el resto de la célula (34,50a). Otras proteínas, producto de otros proto-oncogenes actúan en el núcleo celular; y los proto-oncogenes de esta familia que se expresan de manera no regulada podrían alterar la transcripción de muchos genes, necesaria tanto para el crecimiento y la proliferación desregulada de las células cancerosas, como para que estas lleven a cabo el temible proceso de metástasis, es decir, la migración de células tumorales a diversos tejidos del enfermo. Esto podría explicar el elevado número de alteraciones que presentan las células tumorales; entre estos proto-oncogenes podemos citar a *myc*, *myb*, *fos*, *mil* y *ski*.

La transformación celular es un proceso que puede ser provocado como respuesta a uno o varios oncogenes, (15a,22,23,32a,33a,36), tal es el caso de *myc* y *ras* o del antígeno T del SV40 y *ras* que cooperan para transformar cultivos primarios de células. (22,23). También existen retrovirus con dos oncogenes en donde se establece una complementación (Figura 1B).

TABLA 1

AGENTES ETIOLOGICOS EN NEOPLASIAS HUMANAS

FACTOR CAUSANTE	NEOPLASMA	TIPO DE EXPOSICION
A.- AGENTES QUIMICOS		
1.- Aminas aromáticas	Vejiga	Respiratoria
2.- Benzol	Linfoma	Cutanea
	Leucemia	Cutanea
3.- Petroleo, aceites y parafinas	Piel	Cutanea
4.- Aceite isopropil	Seno, laringe, bronquios	Respiratorio
5.- Asbestos	Bronquios y	Respiración
	mesotelioma	
6.- Cromo	Bronquios	Respiración
7.- Arsénico	Piel, bronquios	Inhalación
	y vejiga.	
B.- AGENTES FISICOS		
1.- Radiaciones ionicas	Piel, tiroides, senos, sarcoma osteogénico, leucemia, bron-	
	quios.	
2.- Luz Ultravioleta	Piel	

C.- VIRUS

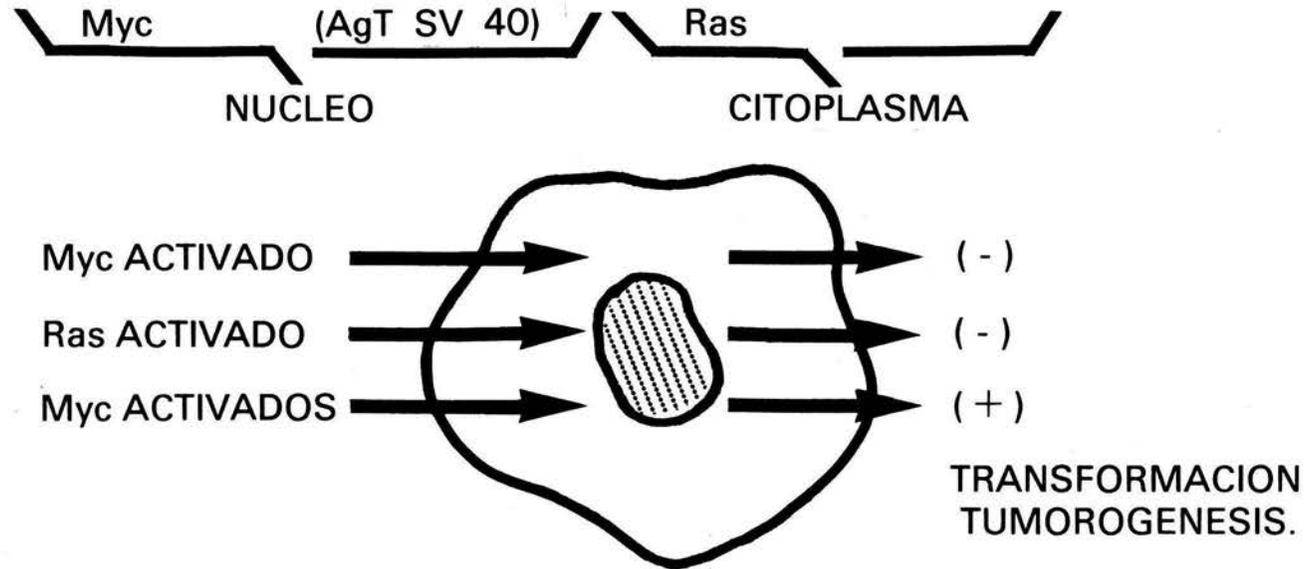
- | | |
|-------------------------|--|
| 1.- Adenovirus | Células "in vitro" |
| 2.- Wartvirus de humano | Papillomas |
| 3.- Epstein Barr | Linfoma de Burkitt
Cáncer nasofaríngeo |
| 4.- Herpes Simplex II | Cervico-uterino |
| 5.- Papilloma | Inmortalización celular
Transformación |
| 6.- Retroviruses | Sarcoma de Caposi(HTLV III).
Virus de sarcoma de Rous (Pollo)
Virus de sarcoma de Simio (Mono y gato)
Virus de sarcoma de Harvey (Rata y Raton).
Virus de Sarcoma de Kirsten (Rata)
Virus de mieloblastosis de aves (Pollo).
Virus de eritroblastosis (Pollo)
Virus de sarcoma de Rochester 2 (pollo)
Virus de leucosis humana I (linfocitos)
Virus de leucosis humana II (linfocitos)
(5,23,26,37,49,53). |

FIGURA 1

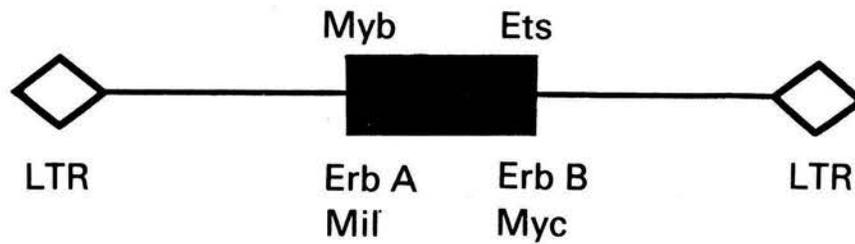
- A.- LA TRANSFORMACION DE UNA CELULA NORMAL EN CANCEROSA NO SOLO REQUIERE DE LA ACTIVIDAD DE UN ONCOGENE, SINO DE LA COLABORACION DE OTRO. TAL ES EL CASO DE LA COLABORACION ENTRE EL GENE *myc* Y EL GENE *ras*, O BIEN ENTRE EL ANTIGENO T DE SV40 Y EL GENE *ras*.
- B.- LA PRESENCIA DE DOS ONCOGENES EN UN RETROVIRUS PUEDE ESTABLECER UNA COMPLEMENTACION.

FIGURA 1

A.- TRANSFORMACION DE UNA CELULA NORMAL EN UNA CANCEROSA POR LA COLABORACION DE DOS ONCOGENES



B.- RETROVIRUS CON DOS ONCOGENES



Entre los oncogenes más estudiados actualmente, se encuentran el c-myc, que se ha visto alterado en diversos tipos de cánceres humanos y también tiene características interesantes en células normales, en las que se encuentra altamente conservado, tanto en ratas como en el hombre en el que se ha encontrado que miembros idénticos de esta familia activan tumores de tipo totalmente diferente, lo que se ha observado que ocurre también con los oncogenes virales v-K-ras y v-H-ras causantes de un espectro muy grande de neoplasias (27,44,51).

El análisis del desarrollo de tumores y su relación con los oncogenes ha sido ampliamente estudiado mediante la transfección del ADN de células normales y de tejido tumoral capaz de transformar los fibroblastos de ratón NIH-3T3. En la mayoría de los casos, el gene encontrado responsable de estas propiedades transformantes es un miembro de la familia ras. Mediante clonación molecular y secuenciación de los genes de la familia ras, se han identificado dos regiones de segmentos codificadores que pueden ser activados por diferentes mutaciones y generar alelos transformantes a partir de los proto-oncogenes (27). (Tabla # 2). En esta tabla pueden observarse algunos ejemplos de tipos celulares en donde se ha encontrado actividad transformante de ras y otros oncogenes.

TABLA 2

ONCOGENES CANDIDATOS DETECTADOS COMO GENES
TRANSFORMANTES EN LAS CELULAS NIH-3T3.

GENES	EJEMPLOS DE TIPOS CELULARES EN SE ENCUEN- TRA ACTIVIDAD TRANSFORMANTE
C-H-ras 1	<p>Carcinoma de vejiga en línea celular humana. Tumores de tracto urinario (Humano) Carcinoma de pulmón (Humano) Línea celular de melanoma (Humano). MC,BP,DEN y MNNG (Línea celular primaria de puerco). DMBA y MNU (carcinóma mamario inducido, de rata). Células tumorales mieloides (Rata) DMBA/TPA. Papillomas de piel inducidos benignos y malignos.(Ratón). Carcinosarcoma mamario (Humano).</p>
C-K-ras 2	<p>Carcinomas de pulmón y líneas celulares (Humano). Carcinomas de colon y líneas celulares (Humano). Línea celular de carcinoma pancreático (Humano). Carcinoma de vejiga de célula Gall (Humano).</p>

Línea celular de rhabdomiosarcoma (Humano)
Carcinoma primario de ovario (Humano).
Línea de LLA (Humano).
Timoma inducido con radiaciones gamma (Ratón)
Fibrosarcoma BP inducido (Ratón).
Línea celular de neuroblastoma (Humano).
Línea celular de leucemia (Células T, Humano)

N-ras

Línea celular de neuroblastoma (Humano)
Línea de linfoma de Burkitt (Humano)
Líneas celulares de fibrosarcomas y
rhabdomiosarcomas (Humano)
Línea de células T de leucemia
Línea de teratocarcinoma (Humano, pasaje
tardío)
Línea de carcinoma de pulmón
Leucemia mieloblastica aguda y crónica
(Humano).
Línea celular de carcinoma de pulmón (Ratón)
Timoma inducido en ratones.

C-mos

Líneas celulares de plasmocitoma (Ratón)

Blym

Linfomas basales inducidos por ALV (Pollos)
Línea celular de linfoma de Burkitt (Humano)

Tlym

Líneas celulares de células T intermediarias
(Humano)
Linfomas inducidos por MLV (Ratón).

Algunos de los mecanismos conocidos mediante los cuales un proto-oncogene puede transformarse en oncogene y, por lo tanto, provocar la aparición de tumores tanto en condiciones naturales como en experimentales puede ser causado por agentes químicos, oncogenes retrovirales y muchos mas que, generalmente, son activados de manera idéntica a como lo son los relacionados con carcinogenesis retroviral.

Dentro de estos mecanismos de activación de los oncogenes se encuentran:

1.- Activación de los oncogenes por actividad retroviral.

La integración de los virus en el genoma celular puede provocar:

1) la transformación maligna de las células debido a que el oncogene queda bajo la acción de promotores virales (51,52). Así, el organismo tiene una sobre expresión de proteína, y ésta, de ser un componente necesario normalmente, provoca la transformación. (Teoria cuantitativa) (Figura # 2).

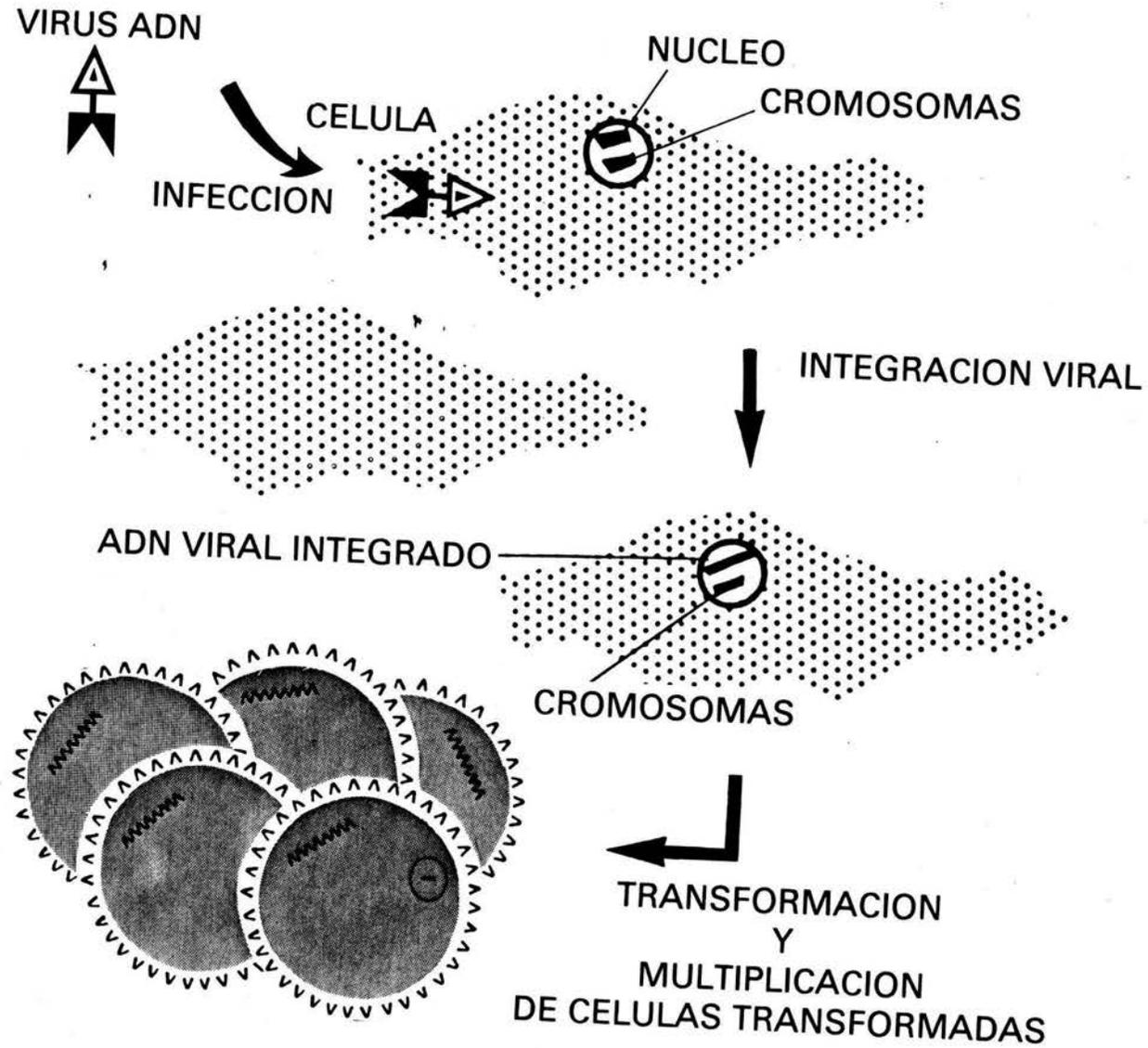
Y, 2) una segunda forma de alteración provocada por retrovirus, es aquella en la que la proteína viral es producida, y si ésta difiere del producto normal, puede provocar una transformación celular ya que es una proteína inapropiada para la célula. (Teoria cualitativa) (5,47,49).

Ambos casos se encuentran apoyados experimentalmente; en

FIGURA 2

CUANDO UN VIRUS ACTUA COMO VIRUS CARCINOGENO COMIENZA POR PENETRAR EN LA CELULA, DESPUES AL NUCLEO, EN DONDE INTEGRA SU MATERIAL GENETICO. EL ADN VIRICO, CONTIENE LA INFORMACION NECESARIA TANTO PARA SU INTEGRACION COMO PARA LA INICIACION EN CASCADA DE LOS ACONTECIMIENTOS GENETICOS Y BIOQUIMICOS QUE CONDUCEN A LA TRANSFORMACION.

FIGURA 2
TRANSFORMACION CELULAR PROVOCADA POR UN VIRUS CARCINOGENO



el caso del gene c-ras, si por integración retroviral, la secuencia del promotor retroviral fuerte (LTR) se une al oncogene celular, su producto causa la transformación en células NIH-3T3 (53) y su efecto es la activación en el gene blanco, en este caso, el gene ras.

2.- Activación por amplificación

La activación de los oncogenes es tan poco conocida como lo que se sabe a cerca de las amplificaciones de otros genes celulares, pero se han descrito algunos casos de oncogenes amplificados ya que es un proceso común en las células tumorales. El ejemplo mas común es la amplificación del oncogene c-myc en muchos tumores humanos (15). Otro oncogene que se ha encontrado en este tipo de alteración es el proto-oncogene c-K-ras, que en la línea celular de colon COLO se ha encontrado amplificado 50 veces (Tabla # 3), y en la línea celular de cáncer de pecho MCF-7, la amplificación del oncogene N-ras es de 20 veces.(10).

En estos casos, el aumento en la concentración celular del ARNm, no se debe a una alta transcripción del gene, sino a que aumenta el número de genes que pueden ser transcritos en cierto tejido. El resultado final es un aumento en la cantidad tanto del ARN como de la proteína oncogénica.

En la mayoría de los oncogenes amplificados se asume que sea un evento somático, ya que la amplificación aparece en el tejido alterado y no en el análisis del tejido normal del mismo paciente.(40).

TABLA # 3

AMPLIFICACION DE ONCOGENES CELULARES EN CELULAS TUMORALES

TUMOR	ONCOGENE	AMPLIFICACION	EXPRESION
HL-60 (AMPL)	c-myc	20 X	Si
COLO 320 (Carcinoma)	c-myc	50 X	Si
COLO 201/205 (Carcinoma de colon)	c-K-ras	50 X	Si
MCF-7 (Cáncer de pecho)	N-ras	20 X	Si
K-562 (CML) (Neuroblastoma)	N-myc	5 a 200 X	Si
KT-883 (Carci- noma epidermoi- de de pulmón)	c-K-ras	10 a 20 X	Si

(10b, 41, 42)

3.- Activación por Translocaciones Cromosomales.

Estudios hechos sobre el linfoma de Burkitt (causado por el virus Epstein Barr) en el humano, y en plasmocitomas de ratón, revelaron que dichos danos se caracterizan por translocaciones cromosomales específicas. En el humano, existe la translocación específica entre los cromosomas 8 y 14 (o mas raramente entre el 2 y el 22) mientras que para el ratón esta translocación es entre los cromosomas 12 y el 15 (o más raramente con el 6). El cromosoma 8 en el humano y el 15 en el ratón poseen al oncogene c-myc y los 2, 14 y 22 en el hombre, y 6 y 12 en el ratón contienen los genes de inmunoglobulinas (1,21). Se ha postulado que el oncogene c-myc se transloca en una zona de expresión activada de inmunoglobulinas, dando como resultado una transcripción activa de este gene, y la transformación neoplasica. Han sido reportadas hasta la fecha algunas otras translocaciones específicas de regiones de cromosomas en las células de tumores específicos. Esto ha sido observado en los oncogenes c-abl, c-fes c-myc y c-ras.(33).

Aparentemente la activación de los oncogenes debe de ser de gran significancia durante la formación del tumor, especialmente en los casos de predisposición hereditaria y en el caso de inducción de tumores por agentes causantes de reorganizaciones cromosómicas (como el grupo de los herpes virus y la radiación).

4.- Activación por mutaciones puntuales.

En algunos casos los proto-oncogenes sufren mutaciones puntuales posiblemente a causa de algún carcinógeno; en estos casos, la cantidad de proteína es normal, pero con algún aminoácido diferente, por ejemplo, la sustitución de un simple nucleótido y, por lo tanto, el cambio consecuente en el aminoácido de la proteína P 21 (de 21 Kd de peso molecular y 189 aminoácidos), en los miembros de la familia ras, es una de las alteraciones genéticas mejor conocidas, explicadas por la activación transformante del ADN de células tumorales. Esto ha sido posible comprobarlo mediante el uso de recombinantes "in vitro" del gene ras silvestre y mutado, que validan el significado de las mutaciones identificadas. Se ha mencionado en los estudios de varios laboratorios que las mutaciones puntuales en la familia ras se presentan frecuentemente en el codón 12 y 61, (10b,30a,36b,44 y 45) en los tres tipos de genes ras, y con ellas, han adquirido propiedades malignas. (Tabla # 4).

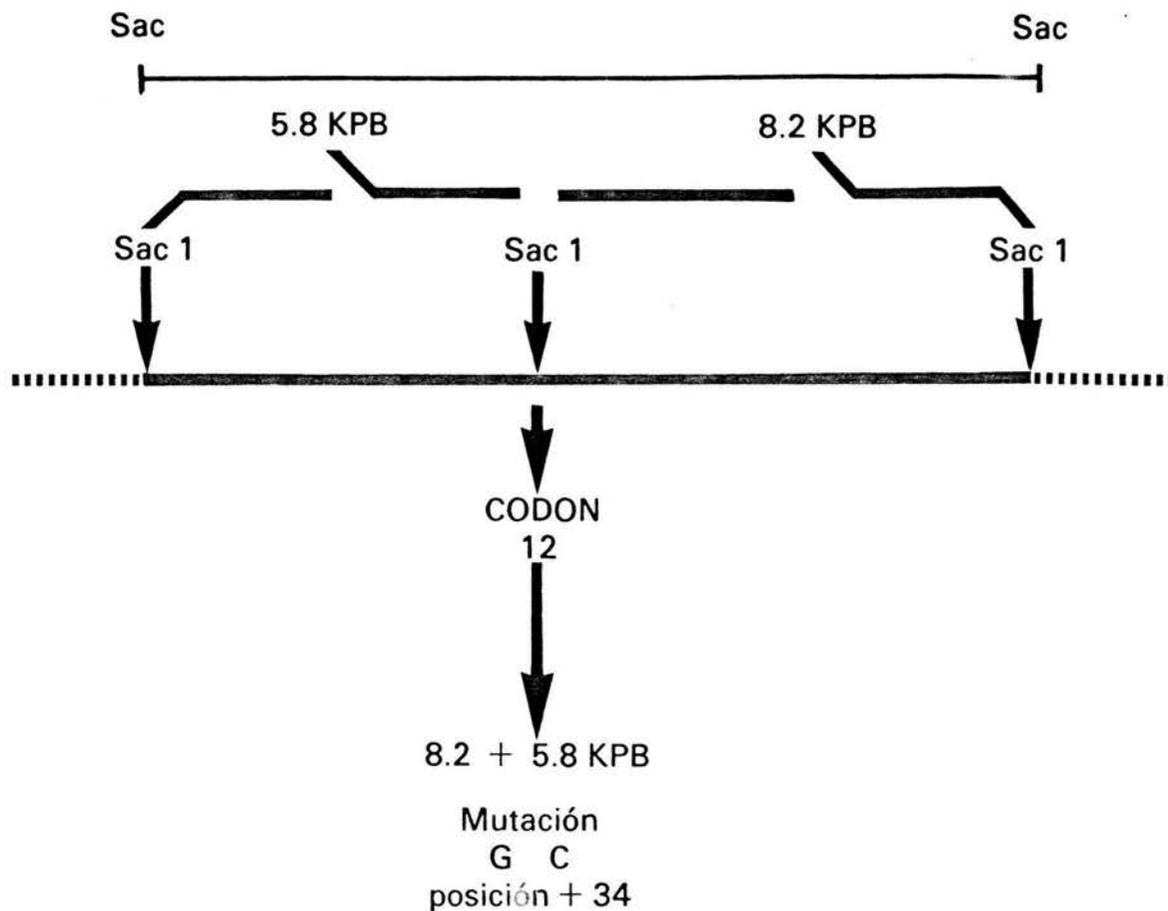
Este tipo de mutación ha sido observada también en el codón 13 del gene N-ras (8) y en los tres genes en los codones 58,59,62 y 63 (10b,30a,36a,42,44 y 45). Las mutaciones puntuales en el codón 12 del K-ras alteran las secuencias reconocidas por la enzima de restricción Sac I, provocando un polimorfismo enzimático y con el alterando la actividad del gene. (Figura # 3).

FIGURA 3

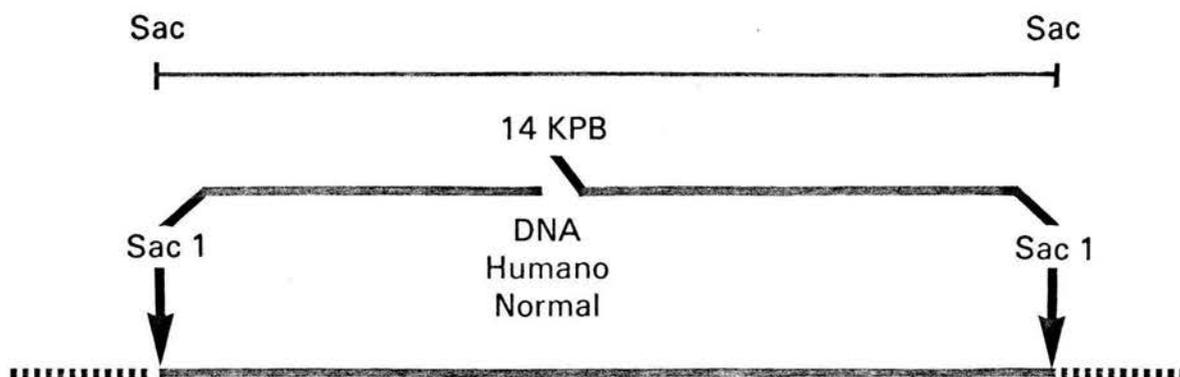
EN EL GENE K-ras NORMAL, EXISTE UN PATRON DE RESTRICCIÓN PARA LA ENZIMA SAC I; AL EXISTIR UNA MUTACION PUNTUAL, ESTE PATRON CAMBIA PROVOCANDO UN POLIMORFISMO ENZIMATICO, ALTERANDO LA ACTIVIDAD DEL GENE.

FIGURA 3
POLIMORFISMO SAC 1 EN EL GENE HUMANO K-ras

(A)



(B)



Estudios "in vitro" han revelado que las mutaciones en la familia ras, ocurren en un número restringido de sitios, incluyendo los codones ya mencionados. Tres de ellos coinciden, precisamente, con las mutaciones encontradas en tumores espontáneos y en los oncogenes ras virales. (Tabla # 4).

Por ejemplo, el cambio encontrado en la posición 59 de alanina a treonina es interesante pues es una de las tres diferencias que existen en las secuencias de aminoácidos entre el c-H-ras y el v-H-ras, implicando que el oncogene ha adquirido dos alteraciones independientes suficientes para inducir una transformación celular. La sustitución, puede ser por transición o por transversión, provocando la actividad del proto-oncogene ras en tumores espontáneos de humano(3); esto está de acuerdo con la noción de que los mutágenos del medio ambiente actúan como carcinógenos. Por ejemplo la exposición a nitrosometilurea o dimetilbenzotraceno (DMBA), produce la inducción de tumores en forma altamente reproducible debido a la activación del H-ras, y el análisis de todas las lesiones demuestra que siempre es debido a una transición G-A en el codón 12 (3).

Los trabajos realizados hasta la fecha y su caracterización molecular han demostrado que los oncogenes ras han adquirido sus propiedades malignas a causa de una sola mutación puntual que afecta a algunos de los aminoácidos de la proteína P 21.

Todos los progresos recientes en el conocimiento de la Biología Molecular de los virus tumorales en animales, así como las técnicas de la Ingeniería Genética, han conducido a la identificación de los genes del cáncer, en células de mamífero (oncogenes), cuyo funcionamiento inducido podría ser un factor responsable de la transformación de una célula normal a una célula cancerosa (5,29). (Tabla # 2).

La alta frecuencia de las formas activadas de los genes en tumores humanos o animales de origen clonal, junto con la asociación entre la exposición a carcinógenos y a la generación de mutaciones puntuales en el ADN, han propiciado especulaciones a cerca de que todos estos genes de la familia ras se involucran íntimamente con el desarrollo de tumores humanos, y esta familia de oncogenes se ha encontrado ser la causante, de las propiedades transformantes del ADN de los tumores en diferentes líneas celulares. (Tabla # 4).

TABLA # 4

CAMBIOS DE UN SOLO NUCLEOTIDO EN GENES TRANSFORMANTES HUMANOS
DE LA FAMILIA DE GENES RAS

GENE	LINEA CELULAR TUMORIGENICA	POSICION DEL CO- DON ALTERADO	CAMBIO NUCLEO- TIDO.	CAMBIO A.A.
H-ras	EJ/T24/J82 (Carcinoma de vejiga).	12	G-T	Gli-Val

H-ras	Esponaneo	12	G-A	Gli-Asp
H-ras	HS 242 (Carcinoma de pulmón).	61	A-T	Glu-Leu
K-ras	Calu 1 (Carcinoma de pulmón).	12	G-T	Gli-Cis
K-ras	SW 480 (Carcinoma de colon).	12	G-T	Gli-Val
N-ras	SK-N-SH (Neuroblastoma)	61	C-A	Glu-Lis
N-ras	Células de LMA	13		Gli-Val Gli-Asp

(4, 10b, 24, 35a, 41, 42, 47)

Los oncogenes mas comunes pertenecen a esta familia ras, (Figura # 4), en donde el primero de sus miembros en ser identificado fue el homólogo del oncogene viral de Sarcoma de Harvey, llamado c-H-ras. De estos existen:

1.- El c-H-ras 1 que es un gene activo localizado en el brazo corto del cromosoma 11 (33), en donde estan los genes que codifican para el D-LDH y el gene del factor de crecimiento parecido a la insulina (6). El gene H-ras 1 se encuentra formado por 4 exones y 3 intrones y mide aproximadamente 4.5 Kpb (24,38), su estructura exónica comprende 567 pb con capacidad para codificar una proteína de 189 aminoácidos con un peso molecular de 21 Kd. (Proteína P 21). Comparado con el gene v-H-ras, presenta una homología del 88% en su secuencia genética y solamente difieren en 3 aminoácidos en el codón 12, 59 y 122.

2.- El c-H-ras 2, que se considera un pseudogene, debido a que es un gene inactivo ya que no codifica para ninguna proteína conocida, se encuentra en el cromosoma X, que presenta muy raras translocaciones o interacciones con otros cromosomas; y por el hecho de encontrarse en este cromosoma, se ha conservado en los ordenes de mamíferos. Su secuencia, corresponde a los exones del gene c-H-ras 1 pero no así a la de sus intrones. No tiene secuencias que señalen el inicio de la transcripción, ni sitios de cap del ARN. Su genoma presenta tres codones de terminación de la traducción por lo que no puede codificar ni aun insertandole promotores o amplificadores (10b,36a).

FIGURA 4

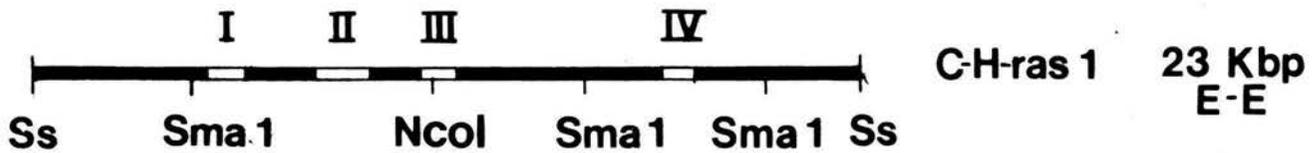
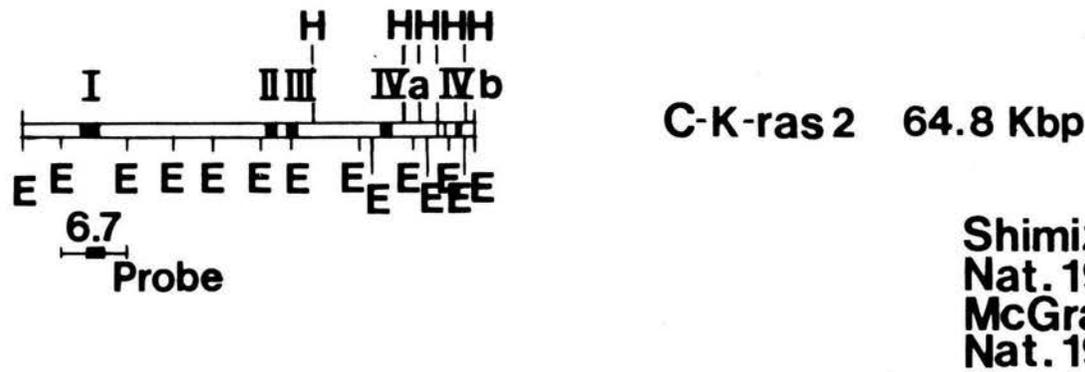
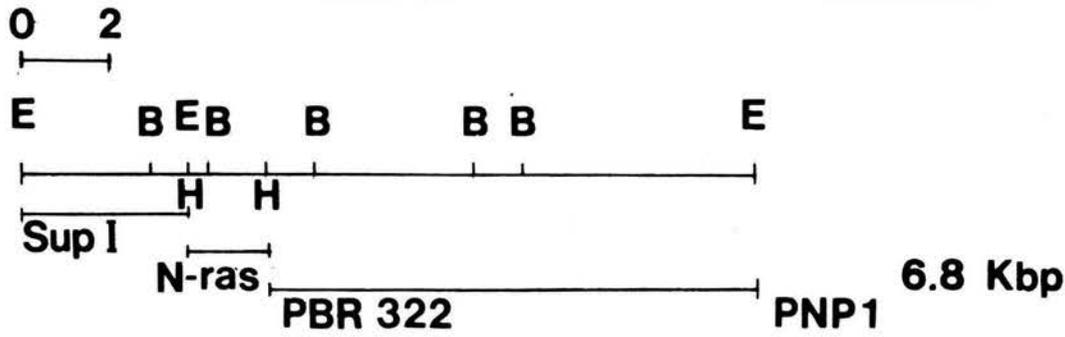
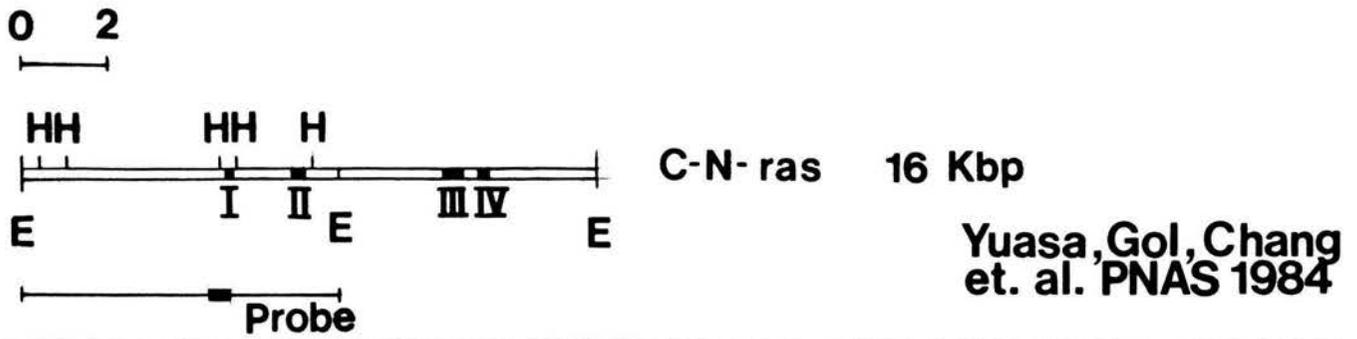
MAPA DE RESTRICCIÓN DE LOS ONCOGENES DE LA FAMILIA RAS (N-ras, K-ras Y H-ras) EN EL HUMANO, Y MAPA DE RESTRICCIÓN DEL PLASMIDO p NP 1 UTILIZADO COMO SONDA. EL FRAGMENTO UTILIZADO PARA LA DETECCIÓN DEL GENE N-ras SE INDICA CON UNA BARRA GRUESA (PROBE) ASÍ COMO TAMBIÉN PARA LA ZONA DE HOMOLOGÍA DEL GENE K-ras.

LAS BARRAS OSCURAS DENTRO DE LOS GENES CORRESPONDEN A LOS EXONES DE CADA GENE .

LAS LINEAS PERPENDICULARES INDICAN LOS SITIOS DE RESTRICCIÓN DE DIFERENTES ENZIMAS.

E	ECO	R1
H	HIND	III
B	BGL	1

FIGURA 4



Fasano, et. al. J. Mol.
Appl. genet. 1983

La función de la proteína codificada por el c-H-ras 1 tanto normal como alterada no es aun conocida.

El segundo miembro de la familia ras es el c-K-ras, homólogo del gene v-K-ras del virus de Sarcoma Murino de Kirsten. El c-K-ras 2 se encuentra en el cromosoma 12 (6) en donde se han encontrado trisomias en las leucemias linfociticas crónicas (36). Su homólogo celular, el c-K-ras 1 es considerado un pseudogene porque es inactivo; este se encuentra localizado en el cromosoma 6 al igual que el gene myb y el complejo de histocompatibilidad HLA. Este complejo y el c-H-ras 2 se encuentran involucrados en algunos casos de leucemias y otras neoplasias. En este cromosoma suele haber integración del retrovirus endogeno de mandril.(36).

Este virus se encuentra mas frecuentemente activado en tumores de humano.

Entre el 10 y 20 % de los ADNs de tumores del humano de diversas neoplasias contienen a este gene c-K-ras 2, que transforma las células en ensayos de transfección. La proteina codificada para la acción de este gene es también de 21 Kd y su actividad transformante se debe a al mutación estructural de esta proteína puesto que en condiciones normales, no es transformante, lo mismo que la proteína 21 del c-H-ras 1. Dichas mutaciones no se observan en el ADN de los tejidos normales de individuos con carcinomas que presentan el c-K-ras 2 activado, sugiriendo que dicha mutación es un evento somático (26).

El tercer miembro de la familia ras localizado en el

cromosoma 1 es el llamado N-ras, que no presenta contraparte viral conocida (16). En este cromosoma se han visto deleciones, regiones de tinción homogénea y dobles minutas (aberraciones cromosómicas comunes de células transformadas) principalmente en neuroblastoma. Este gene fue aislado y caracterizado por primera vez en una línea celular de neuroblastoma de humano, SK-N-SH (42) y se ha encontrado también en líneas celulares tumorales de leucemias y sarcomas. (Tabla 6) (9).

Este gene se ha encontrado alterado mas frecuentemente en los codones 12 y 61, así como también en el codón 13 (Tabla # 2). También se ha visto amplificado 20 veces en la línea celular de cáncer de mama MCF-7, pero esta alteración es poco frecuente en este oncogene. El N-ras presenta cuatro exones y codifica para la producción de una proteína de 21 Kd de peso molecular de 189 aminoácidos. y sus sitios de unión entre los exones correspondientes exactamente a los de los oncogenes c-K-ras y c-H-ras.

Un análisis del genoma del gene N-ras normal ha puesto de manifiesto que su estructura y secuencia es muy parecida a la de los oncogenes normales c-K-ras y c-H-ras humanos. Los tres comparten secuencias de homología y divergencia nucleotídica dentro de las regiones codificadoras tienen estructuras intron-exon comunes que indican que evolucionaron a partir de algun gene ancestral común. (45).

La comparación entre las secuencias de aminoácidos del N-ras con el c-H-ras y el c-K-ras nos muestra que existe una

homología conservada entre las posiciones 1-120 y 129-166 de los aminoácidos , con un máximo de 12 diferencias entre cualquiera de los tres genes. Estas zonas de mayor homología se encuentran en los exones 1 y 2 (9). Existen también otras dos zonas de divergencia, en los exones 3 (aminoácidos 121-128) y es en el cuarto exón en donde se presenta la zona de mayor divergencia entre los tres genes, denominada región variable. Esta región variable puede formar un sitio de combinación fisiológica importante entre los productos de estos genes, para interactuar con diferentes constituyentes, sean celulares o extracelulares (49).

Para el estudio a nivel molecular y genético de estos oncogenes, se utilizan metodos de la ingenieria genética, lo que nos permite aislar genes específicos, obtener combinaciones genéticas, analizar y correlacionar la estructura y función de genes específicos y producir en grandes cantidades, productos genéticos.

Una de las herramientas mas utilizadas para la resolución de alguno de los puntos anteriores son los plásmidos, ó elementos genéticos extracromosomales, que se encuentran asociados a funciones como la transferencia del factor sexual, resistencia a drogas, y la capacidad de degradar compuestos, como los insecticidas entre otros.

Dentro de las bacterias, los plásmidos se encuentran como moléculas de ADN de doble cadena circular superenrollada que tiene la capacidad de autorreplicación. Estos elementos genéticos se encuentran en un número determinado

de copias y en algunos casos estas pueden aumentarse, después de la administración de inhibidores como el cloranfenicol y la tetraciclina, que bloquean la replicación del ADN cromosomal pero no la del plásmido (fenomeno conocido como amplificación).

El uso de los plásmidos para el estudio de los oncogenes, es una técnica relativamente nueva; el oncogene se obtiene a partir del ADN cromosomal y se separa mediante enzimas de restricción y electroforesis del resto del ADN. Estos genes son clonados mediante el uso de técnicas de ingeniería genética, en los plásmidos, y mas tarde se introducen en las bacterias para su replicación, y posterior utilización en experimentos de hibridización con ADN tumoral, a fin de determinar las alteraciones en el ADN del oncogene.

Para poder llevar a cabo estas determinaciones, es necesario tener la seguridad de estar manejando el plasmido deseado, para lo cual es necesario caracterizarlo con la ayuda de técnicas tales como la utilización de enzimas de restricción, así como también mediante el estudio de su patrón electroforético de los fragmentos en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

OBJETIVOS

El presente trabajo corresponde al proyecto de investigación del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, a cargo del Dr. Patricio Gariglio Vidal, que tiene como objetivos:

1.- El aislamiento, caracterización y purificación del plásmido p-NP1 que contiene un fragmento del oncogene N-ras.

2.- La determinación de las posibles alteraciones del oncogene N-ras en tumores de cerebro de humano

La importancia de realizar estos estudios es debida a que la neoplasia intracraneal es generalmente en el 100% de los casos mortal, debido a su agresividad y localización.

MATERIALES Y METODOS

1.- Crecimiento de la cepa E. coli y amplificación del Plásmido P-NP1.

Se inoculó una azada de la Bacteria en 100 ml de medio Luria con ampicilina a una concentración de 50 µg/ml.

Se incubó a 37° C en agitación constante (200 rpm) durante toda la noche (de 12 a 16 hrs).

Se inocularon los 100 ml del cultivo anterior, en un matrás conteniendo un litro de medio de cultivo Luria, con ampicilina. Se incubó a 37°C, en agitación constante durante 2.5 hrs.

Se agregó cloranfenicol a una concentración final de 170 µg/ml, Se incubó toda la noche a 37°C, con agitación constante (de 12 a 16 horas sin exceder las 16 horas).

Se determinó el crecimiento, por espectrofotometría, manteniendo la turbidez bacteriana, es decir, la densidad óptica a 600 nm.

2.- Aislamiento del plásmido. Lisis por alcali.

Se centrifugó el cultivo obtenido, en jarras para centrifuga de 500 ml, esteriles, durante 10 min. a 7 000 rpm.

Se desechó el sobrenadante en solución germicida.

Se resuspendió el paquete bacteriano en 20 ml de solución 1 (50 mM de glucosa, 25 mM de Tris-HCl pH 8.0 y 10 mM de EDTA) y se agregó lisozima a una concentración final de

5 mg/ml. (Consiguiendo con esto el rompimiento de la pared celular).

Se deposito la solución anterior en tubos corex de 150 ml. Se dejó a temperatura ambiente durante 5 min.

Se añadieron 40 ml de solución 2 (0.2 N NaOH y 1% de SDS) recién preparado, se mezcló suavemente por inversión y se dejó en hielo durante 10 min, para romper las células.

Se añadieron 30 ml de una muestra fría de acetato de potasio por inversión y dejó en hielo durante 10 min. (Precipitan los restos celulares y el SDS, no así el plásmido).

Se centrifugó a 8 000 rpm durante 1.5 horas a 4°C.

Se transfirió el sobrenadante a tubos corex de 150 ml, estériles.

Se añadieron 0.6 volúmenes de isopropanol y se dejó 15 min. a temperatura ambiente para que el plásmido precipite)

Se centrifugó durante 30 min. a 7 000 rpm a temperatura ambiente (pues las sales precipitan a 4°C).

Se desechó el sobrenadante, se lavó con etanol al 70% y se seco al vacío.

Se resuspendió el plásmido en 5 ml de regulador TE (Tris-HCl pH 8.0 10 mM y EDTA 1 mM pH 8.0).

3.- Purificación del plasmido.

Se incubó el plásmido resuspendido en regulador TE pH 8.0 con RNasa a una concentración de 50 ug/ml, durante 45 min a 37°C.

Se paso el plásmido a través de una columna de Sephadex G-50 y coleccionar 12 fracciones.

Se corrió una alicuota de 5 µg de cada fracción en un minigel de agarosa al 0.9% (con bromuro de etidio a una concentración de 0.01 µg/ml) para observar en cada una de ellas en donde se encontraba el ADN plasmídico.

La(s) fracción(es) se precipitaron con una solución de etanol absoluto y 100 mM de NaCl a 4 C (2.5 vol./ml de solución), y se centrifugaron a 14 000 rpm en una centrífuga eppendorff durante 15 min. a 4°C.

La pastilla se desecó y se resuspendió en solución TE de 50 a 100 µl (Ultrapuro).

Se determinó la concentración del ADN, para la cual se hicieron diluciones de la solución del plásmido en TE, y se leyeron al espectrofotómetro (260-280 en UV).(Gráfica # 1).

4.- Caracterización del plásmido p-NP1 por enzimas de restricción.

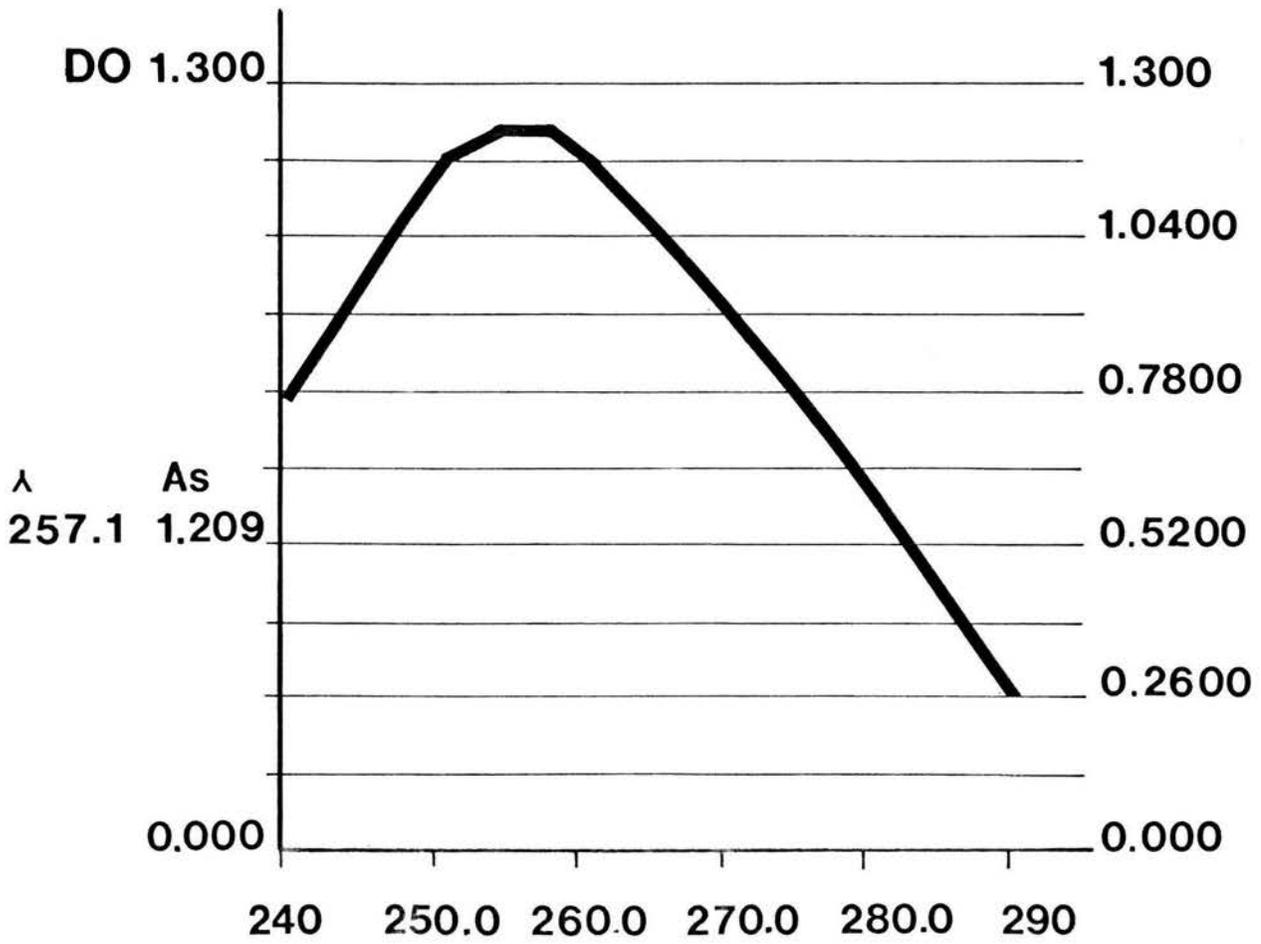
Del laboratorio del Dr. Ronald N. Buick se recibió el plásmido p-NP1, y el mapa de restricción del mismo. En base a este mapa de restricción se eligieron algunas de las enzimas de restricción por el número de cortes que realiza en el plásmido y por la facilidad de obtención en nuestro laboratorio.

Las enzimas utilizadas fueron las siguientes : Eco R1, Bam H1 y Bgl1.

GRAFICA 1

DETERMINACION DEL ADN PLASMIDICO POR DENSIDAD
OPTICA PARA CORROBORAR SU PUREZA.
LECTURAS DE 240 A 290 NM EN LUZ U.V.

Scan # 01.02



Procedimiento:

Se mezclaron en el siguiente orden:

Agua bidestilada esteril.

Regulador de reacción para cada enzima

Plásmido

Enzima.

Se incubó a 37° C durante una hora. Se detuvo la reacción ya fuera colocando los tubos a 0° C, o a 65° C durante 10 min o con 10 mM de EDTA.

Se efectuó la electroforésis en gel de agarosa 0.9% con el fin de separar los fragmentos del plásmido cortado, para compararlos con el plásmido sin cortar y con un marcador de peso molecular ya conocido, (en este caso se utilizó ADN del fago Lambda digerido con la enzima de restricción Hind III).

La agarosa se disolvió en ebullición en el regulador de corrida TPE (Tris fosfatos pH 7.8) y una vez disuelta, se dejó enfriar, a los 50° C se agregó bromuro de etidio a una concentración de 0.01 µg/ml y se mezcló. Se vació en el depósito de la cámara de electroforésis previamente lavada y se dejó enfriar durante aproximadamente 30 min.

Una vez gelificada la agarosa, se desprendió con mucho cuidado el peine y se removieron las tapas de los extremos.

Los depósitos se llenaron lentamente con el regulador TPE de tal manera que su nivel sobrepasara apenas la superficie del gel de agarosa.

Una vez preparadas las muestras con el colorante y glicerol al 30% se procedió a introducir las en los pozos del

gel de agarosa a través del regulador de corrida, con ayuda de una micropipeta.

Se conectaron las terminales de una fuente de poder a los electrodos, y se inició la electroforésis a 50 Volts. La electroforésis para minigel se efectuó durante aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente.

Concluido este tiempo, se apago la fuente de poder y se recuperó el gel de agarosa con ayuda de una mica.

El gel se observó en un transiluminador de luz ultravioleta y se fotografió, (con una escala milimétrica), con una cámara polaroid MP-4, utilizando película 57 ASA 3000 polaroid. Con la foto obtenida se analizó al gel de la siguiente manera:

1. Se graficó el corrimiento del marcador colocando en las abscisas los centímetros recorridos y en las ordenadas el logaritmo del peso molecular de las pares de bases.

2. Se obtuvo el recorrido en centímetros de cada banda y se calculó su peso molecular en pares de bases, para así poder comprobar el resultado con lo esperado.

5.- Marcado del plásmido p-NP1

El siguiente procedimiento se llevó a cabo con las debidas precauciones para el manejo de radiactividad.

La enzima ADN polimerasa I de E. coli añade residuos nucleotídicos en el extremo 3' que se crea cuando una de las dos cadenas de la molécula de ADN es abierta. Además, la enzima por medio de su actividad exonucleasa, puede remover a

los nucleotidos del extremo 5' de la apertura.

La eliminación de los nucleotidos del extremo 3' da como resultado el movimiento de rompimiento y sustitución a lo largo de las cadenas de ADN.

Con el reemplazo de los nucleotidos preexistentes con nucleotidos altamente radiactivos es posible preparar ADN marcado con p32 con una alta actividad específica. (Wensink y Maniatis).

Para realizar la acción se contó con un equipo para el marcado, proveido por la casa Amersham, lo mismo que el isótopo

1. Se disolvió el plásmido por marcar en el regulador TE a una concentración de 200 ug/ml.

2. En un microtubo de 1.5 ml se llevó a cabo la reacción a 4° C, (en hielo) poniendo la solución de ADN, solución de nucleotidos, dNTP marcado radiactivamente, agua bidestilada esteril y solución enzimática.

3. El tubo se tapó y se mezcló suavemente por inversión.

4. Se colocó en un baño a 15° C durante 3 horas. Es muy importante que la temperatura permanezca constante.

5. Se agregó EDTA 10 mM para preparar la reacción.

6.- Cromatografía del plásmido a través de una columna de Sephadex G-50.

Para separar el ADN plasmídico marcado, del resto de los nucleótidos libres, se utilizó la técnica de cromatografía en columna de Sephadex G-50.

Falta página

N° 43

Después de preparar el Sephadex con agua estéril, y de empaquetarlo en la columna, se equilibró la misma pasando en ella el regulador en el que se encontraba suspendido el plásmido, y después se le pasó el mismo regulador con glicerol al 10% para separar las fracciones.

El ADN marcado se depositó en la columna y se dejó introducir en ella, después se agregó más regulador a manera de pequeños lavados para que se introdujera la muestra de ADN. Se permitió un flujo de 0.5 ml por minuto aproximadamente.

Se colectaron de 12 a 15 fracciones de 0.5 a 1 ml, cada una, en microtubos. La separación puede seguirse con un monitor geiger.

Un μ l de cada una de las alicuotas se colocó en un filtro de papel Wattman 3MM y se contó la radiactividad en un contador de centelleo líquido.

De los dos picos obtenidos, el primero correspondió a la sonda de ADN con nucleotidos incorporados, y el segundo, mas pequeño, correspondió a los nucleotidos no incorporados. (Grafica # 2).

El plasmido marcado se guardó a -20 C, cubierto con plomo

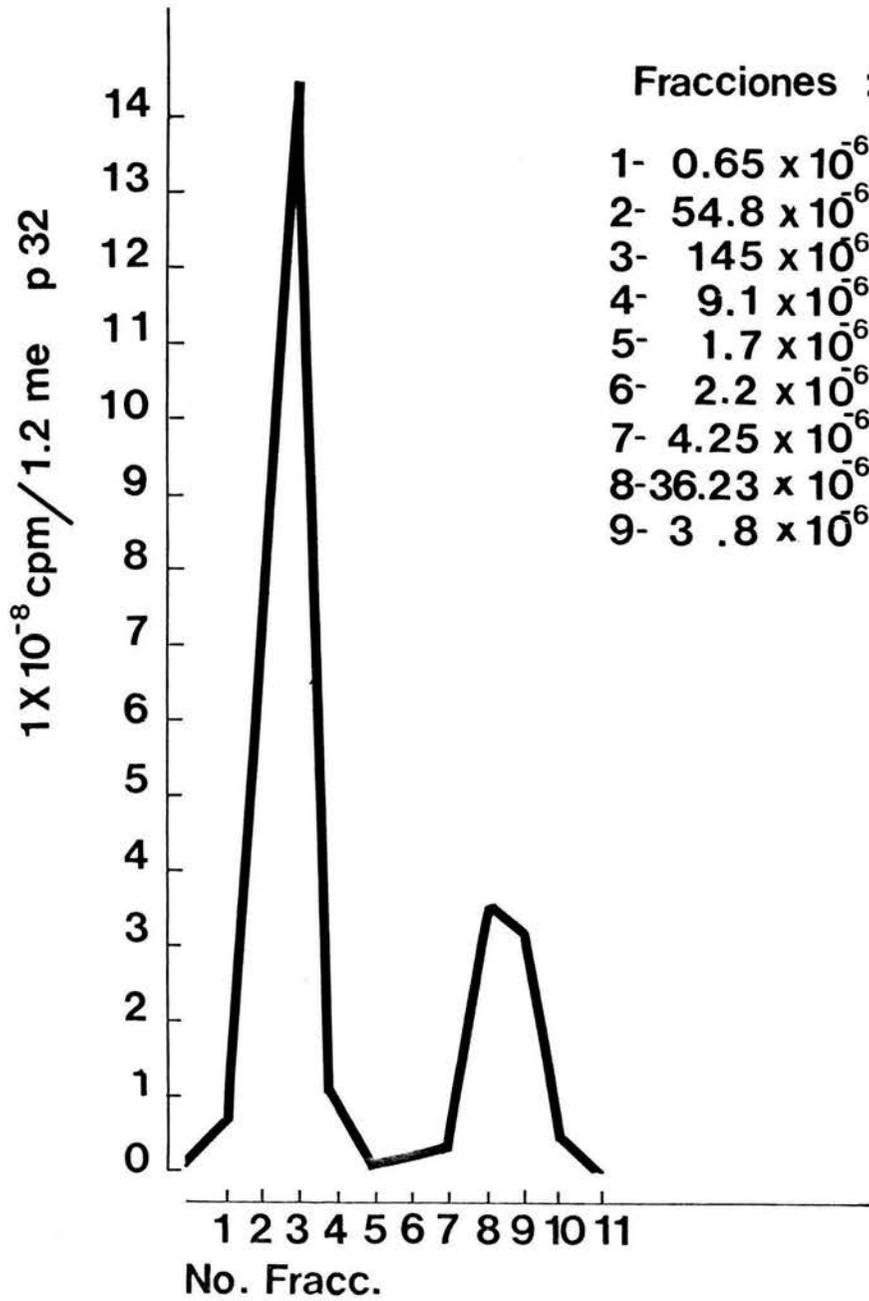
7.- Homogenización del tejido Tumoral y Normal .

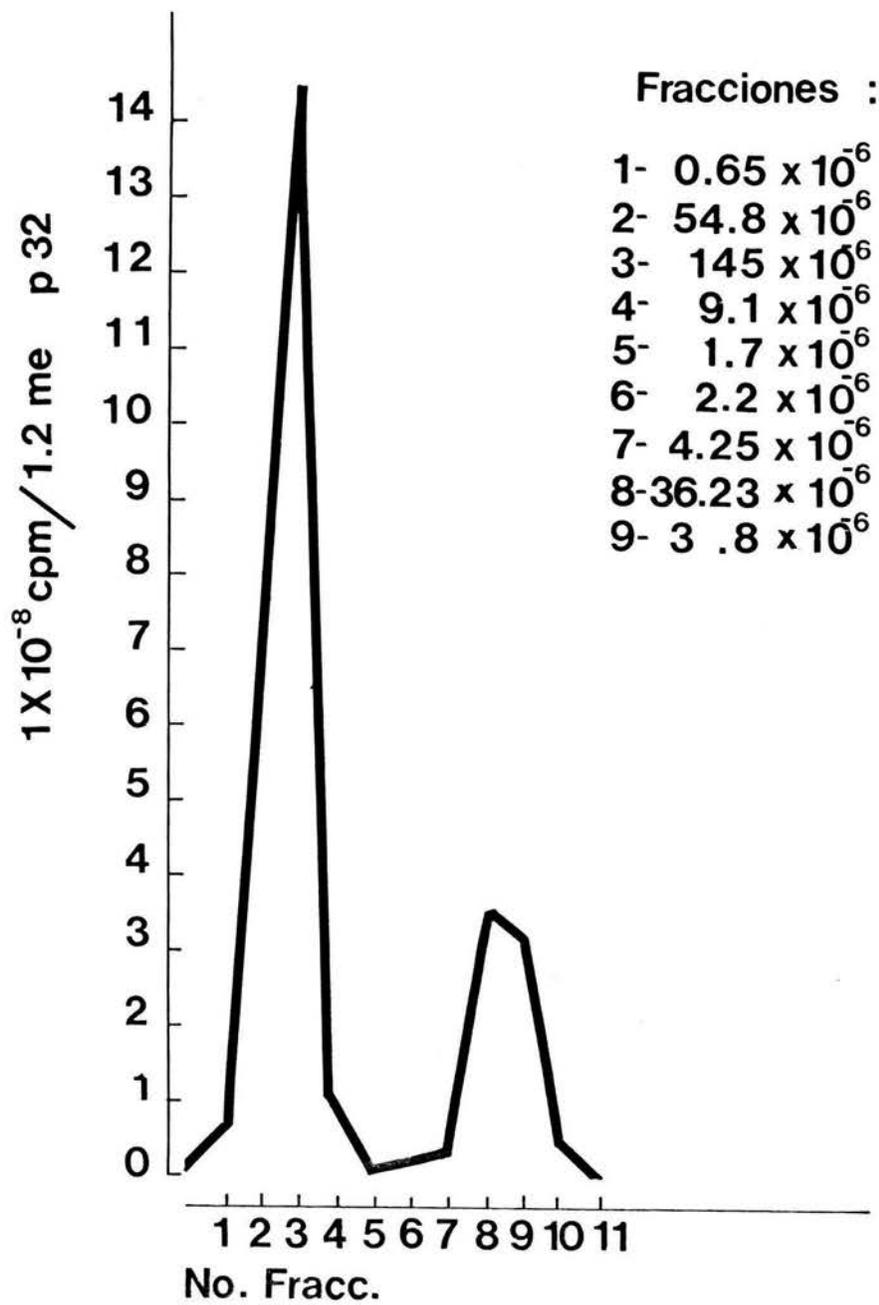
Extracción del ADN.

El tejido se homogenizó en una solución de NaCl al 0.9% en un volumen de aproximadamente un mililitro, con un

GRAFICA 2

DETERMINACION DE LA INCORPORACION DE α -dCTP
RADIATIVA EN EL PLASMIDO pNP 1 POR EL METODO
DE ROMPIMIENTO Y SUSTITUCION

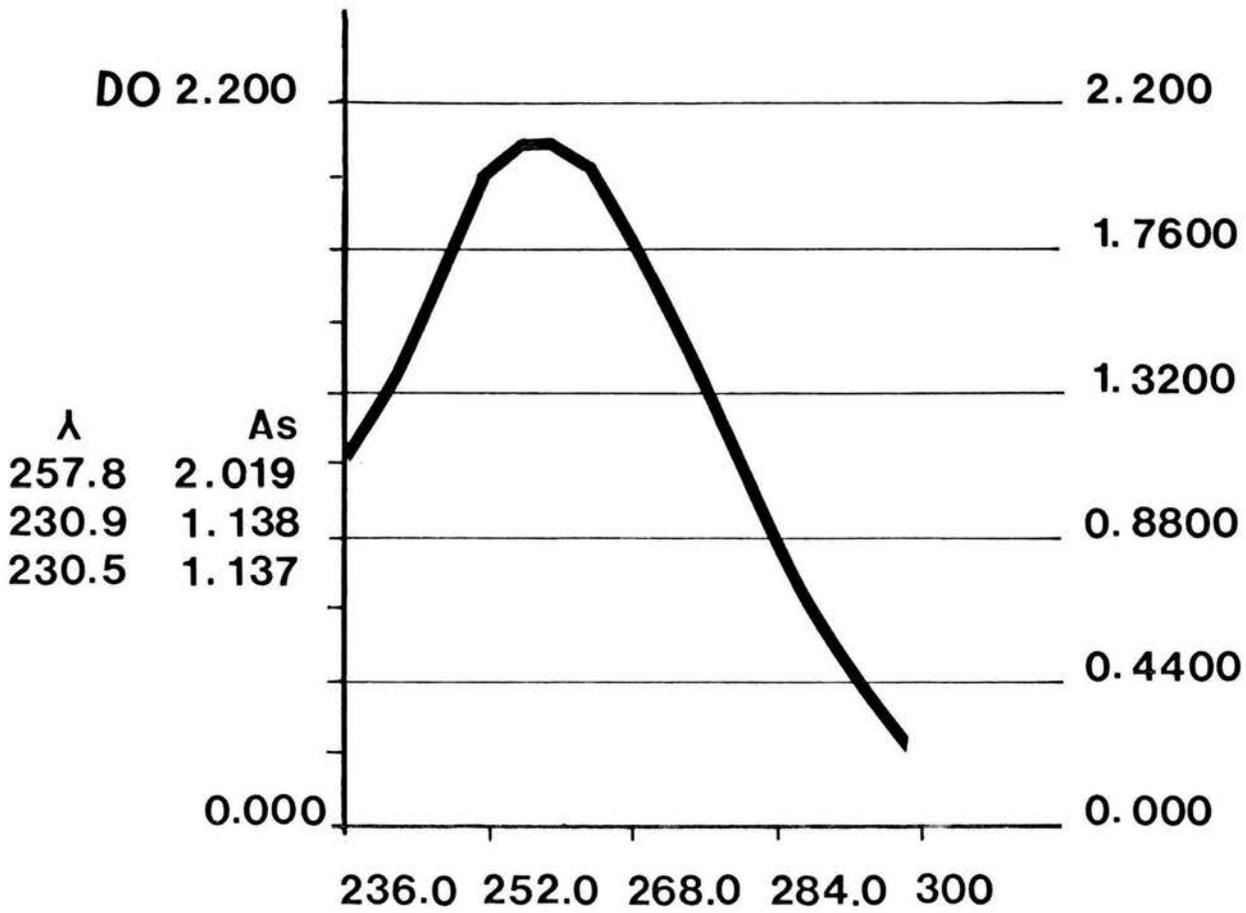




GRAFICA 3

DETERMINACION DEL ADN DE TEJIDO NORMAL
Y TUMORAL POR DENSITOMETRIA PARA
CORROBORAR SU PUREZA.
LECTURAS DE 236 A 300 NM EN LUZ U.V.

Scan # 01.02



homogenizador Daunce. Se lavaron las células tres veces con la solución anterior, centrifugando para empaquetar después de cada lavada a 3 000 rpm durante 10 min.

El paquete celular se resuspendió en un regulador que contenía 0.2% de SDS y 500 µg/ml de proteinasa . Esta solución se incubó a 37°C de 9 a 12 horas en agitación constante.

La solución se centrifugó y el paquete celular se lavó tres veces con fenol saturado con TE, con centrifugaciones de 10 min a 3 000 rpm, recuperandose el ADN siempre en la fase acuosa.

Después se extrajo una vez mas con una solución de fenol-cloroformo (1:0.5).

Se lavo con una solución de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1)

La fase acuosa se mezcló con etanol absoluto frio para precipitar al ADN celular.

Se incubó a -70 C durante 30 min.

Se centrifugó a 6 000 rpm durante una hora y la pastilla obtenida se dejo secar al vacio en un desecador.

El ADN se resuspendió en TE pH 7.5.

La concentracion se determinó leyendo en el espectrofotómetro a 260-280 nm.

Una vez obtenido el ADN, aislado y purificado, se digirió con la enzima de restricción Eco R1, la cual origina un fragmento de 9.2 y otro de 7.0 Kpb que contienen a los exones 1 y 2; y a los exones 3 y 4 del gene N ras respectivamente.

8.- Electroforesis en geles de agarosa

El ADN ya digerido facilita que este mismo penetre en el gel de agarosa al 0.9% y puedan los fragmentos generados de la digestión ser separados por medio de la aplicación de corriente eléctrica.

La agarosa se preparó en regulador TPE (0.08 M de Tris fosfato, 0.008 M de EDTA pH 7.8) a ebullición, una vez disuelta, se dejó enfriar y a los 50° C se le agrega bromuro de etidio a una concentración final de 0.01 µg/ml.

La agarosa se depositó en la columna de electroforesis y se colocó el peine para la formación de pozos a una distancia igual para ambos lados de la cámara, dejándose gelificar.

-El amortiguador TPE se agregó sobre el gel y se quitó el peine, observándose los pozos en el gel, en donde se depositaron las muestras del ADN, con una micropipeta.

Se aplicó corriente de 40-50 volts durante 16 horas a temperatura ambiente.

El gel de agarosa se observó en un transiluminador de luz ultravioleta y posteriormente se fotografió con una película 57 asa 3 000, polaroid.(Figura # 5).

9.- Transferencia tipo Southern

Esta técnica se basa principalmente en el empuje hacia arriba de las moléculas de ADN por capilaridad y alta concentración de sales, provocando que las moléculas de ADN

FIGURA 5

FOTOGRAFIA DEL GEL DE AGAROSA AL 0.9%
DESPUES DE LA FORMACION ELECTROFORETICA
Y TINCION CON BROMURO DE ETIDIO.

CARRIL 1 MARCADOR DE PESO MOLECULAR
(FAGO LAMBDA) DIGERIDO CON LA ENZIMA DE
RESTRICCION HIND III

T TEJIDO TUMORAL

N TEJIDO NORMAL

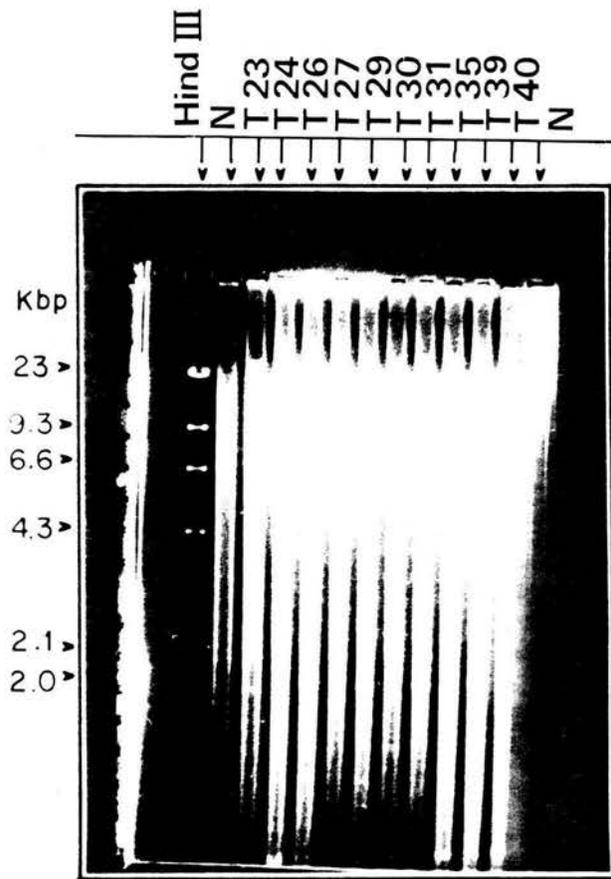


FIGURA 5

queden en el papel de nitrocelulosa.

El gel se lavó durante una hora en agitación con una solución desnaturalizadora que contiene 0.5 N de NaOH y 1.5 M de cloruro de sodio.

La solución anterior se desechó y el gel se lavó dos veces en agua bidestilada estéril.

El gel se sumergió en una solución neutralizadora a temperatura ambiente en agitación constante que contenía Tris-HCl 1M pH8.0 y NaCl 1.5 M.

El gel se lavó tres veces con agua bidestilada.

Para la transferencia del ADN al papel, se colocó un recipiente con regulador SSC 20 X que contenía Cloruro de sodio y Citrato de sodio. (175.3 gr de NaCl y 88.2 gr de Citrato de Sodio).

Sobre este se colocó una placa de lucita y sobre ella se colocó un puente de papel Wattman 3MM perpendicular a la placa, de manera que atravesara la misma por encima y sus extremos permitieran el contacto con el regulador y por lo tanto existiera un flujo del mismo.

El gel de agarosa se colocó sobre el papel Wattman 3MM y se eliminaron las posibles burbujas con ayuda de una pipeta.

El filtro de nitrocelulosa se humedeció en regulador 2 y SSC y se colocó sobre el gel, eliminando las burbujas.

Se humedecieron dos pedazos de papel Wattman 1 MM del mismo tamaño del gel y del papel de nitrocelulosa y se colocaron encima del papel (después de humedecerse).

Sobre todo esto se colocaron toallas de papel absorbente hasta alcanzar una altura de aproximadamente 7 cm y sobre esta se colocó un peso de aproximadamente 500 gr (que quedara distribuido homogeneamente).

La transferencia se dejo de 20 a 24 horas para permitir que los fragmentos del ADN eluyeran del gel hacia el filtro de nitrocelulosa y permanecieran en el.

El filtro de nitrocelulosa se sumergio en una solución de 6X de regulador SSC durante 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se horneó entre dos papeles Wattman 1MM durante 2 horas a 80 C y al vacío.

El papel se introdujo en una bolsa de plástico y se sello hasta su posterior uso.

10.-Prehibridización e Hibridización

El filtro de nitrocelulosa se sumergió en regulador SSC 6X durante 2 min y posteriormente se colocó en una bolsa de plástico especial para resistir altas temperaturas, tipo Sears o Seal-n-save. La bolsa se selló por todos los lados, menos en una de sus esquinas, en donde se introdujo la solución prehibridizadora que contenía : 50% de formamida, 5X de solución Denhard's, 5X de SSPE, 10 ug/ml de ADN de esperma de salmón previamente colocado en ebullición por 10 min y enfriado directamente en hielo y 10X de SDS.

La bolsa se sello completamente, tratando de sacar todas las burbujas de aire, y se sumergió en un baño a 42°C durante 24 horas.

Se desechó la solución prehibridizadora y se agregaron 50 µl de solución hibridizadora por cada cm² de papel. La solución contenía 480 µl de EDTA 0.50 M. 0.25 M de ADN marcado radiactivamente, (previamente calentado a ebullición y colocado en hielo), SSPE 5X, SDS 5X, solución Denhard's 5X y ADN de esperma de Salmón desnaturalizado en ebullición durante 10 min y colocado hielo.

La bolsa se selló perfectamente y se dejó incubando 24 horas a 42° C.

La sonda se depositó en un tubo y se dejó cubierta con plomo.

El papel se sacó de entre los plásticos y se lavó 3 veces con una solución SSC 2X a 50 C durante 15 min.

Se llevaron a cabo 2 lavados más con una solución SSC 0.1% y SDS 0.1 %.

El filtro se dejó secar a temperatura ambiente sobre un papel Wattman 3MM.

El filtro bien seco se colocó en plástico Egapac y se dejó exponer en un cassette para autorradiografía entre dos placas de rayos X-omat AR. El cassette tenía pantallas amplificadoras para cada lado.

La exposición es variable dependiendo del tiempo de decaimiento de la sonda.

Para el revelado de las placas, se colocó en revelador Kodak durante 1.5 min, 30 segundos en la solución de paro y 3 min en solución fijadora. Se dejó durante 10 min en agua y se secaron sin que la placa tocara ninguna superficie.

Falta página

N° 56

Las placas se fotografiaron y se leyeron en el espectrofotómetro a 560 nm (densitometria para observar el grado de amplificación con respecto al control).

RESULTADOS.

En la primera parte de este trabajo, se llevó a cabo al aislamiento, caracterización y purificación del plásmido p-NP1 construido a partir del vehículo de clonación p-K5 que mide 5.8 kb, más el fragmento de 1.0 Kb que contiene la secuencia Hind III-Hind III del primer exon del gene N-ras (Figura # 6A)

El crecimiento de la bacteria fue positivo en medio Luria con ampicilina, y negativo con tetraciclina, es decir, la cepa es resistente a la ampicilina y sensible a la tetraciclina. Mediante algunas de las técnicas mencionadas en la metodología, se obtuvo el plásmido p-NP1 que se encuentra libre de proteínas, como puede observarse en la Gráfica # 1 obtenida por espectrometría.

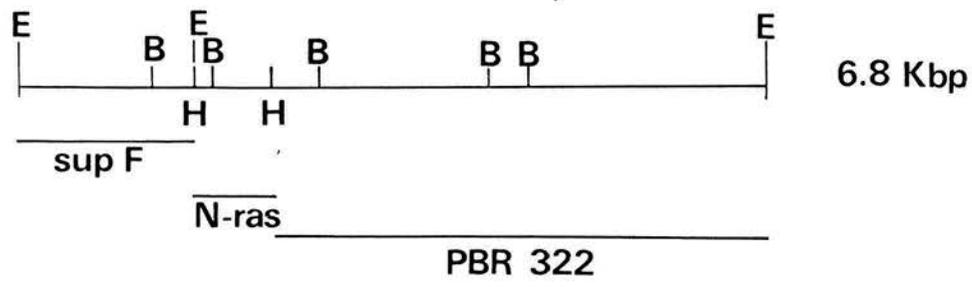
Una vez purificado el plásmido, fue digerido con diferentes enzimas de restricción. Estas enzimas fueron Eco R1, Bgl 1 y Hind III, y los fragmentos que resultaron con la digestión de cada una de ellas fueron migrados en un gel de agarosa al 9%, teñido con bromuro de etidio; pueden observarse en la Figura # 6B en donde para cada una de las enzimas se obtuvieron los siguientes fragmentos: Con Eco R1, dos de 5.3 y 1.5 Kb; con Bgl 1, cinco de 2.9, 1.9, 1.0, 0.5 y 0.2 Kb; y para Hind III, dos bandas de 5.8 y 1.0 Kb, en donde se encuentra el primer exón del oncogene N-ras. (Estos fragmentos fueron correlacionados con los reportados en la literatura). En el carril del plásmido sin cortar, (s.c.) se pueden observar las bandas esperadas para las tres formas del

FIGURA 6A

MAPA DE RESTRICCIÓN DEL PLASMIDO p NP 1
EN DONDE SE OBSERVA EL VEHICULO DE
CLONACION PK5 (DERIVADO DEL PLASMIDO
PBR 322 MAS EL GENE SUP F). LA REGION
H-H CORRESPONDE AL FRAGMENTO DEL PRIMER
EXON DEL GENE N-ras.

ADEMAS SE OBSERVAN ALGUNOS SITIOS DE
RESTRICCIÓN DE LAS SIGUIENTES ENZIMAS:

E	ECO R1
B	BGL 1
H	HIND III



PNP-1

FIGURA 6 A

FIGURA 6B

MIGRACION ELECTROFORETICA DE LOS FRAGMENTOS
RESULTANTES DE LA DIGESTION DEL PLASMIDO
p-NP1 CON TRES DIFERENTES ENZIMAS DE
RESTRICCIÓN.

E ECO R1

B BGL 1

H HIND III

M.P.M. MARCADOR DE PESO MOLECULAR.

EN ESTE CASO EL FAGO LAMBDA
DIGERIDO CON LA ENZIMA DE
RESRICCIÓN HIND III.

S.C. PLASMIDO SIN CORTAR.

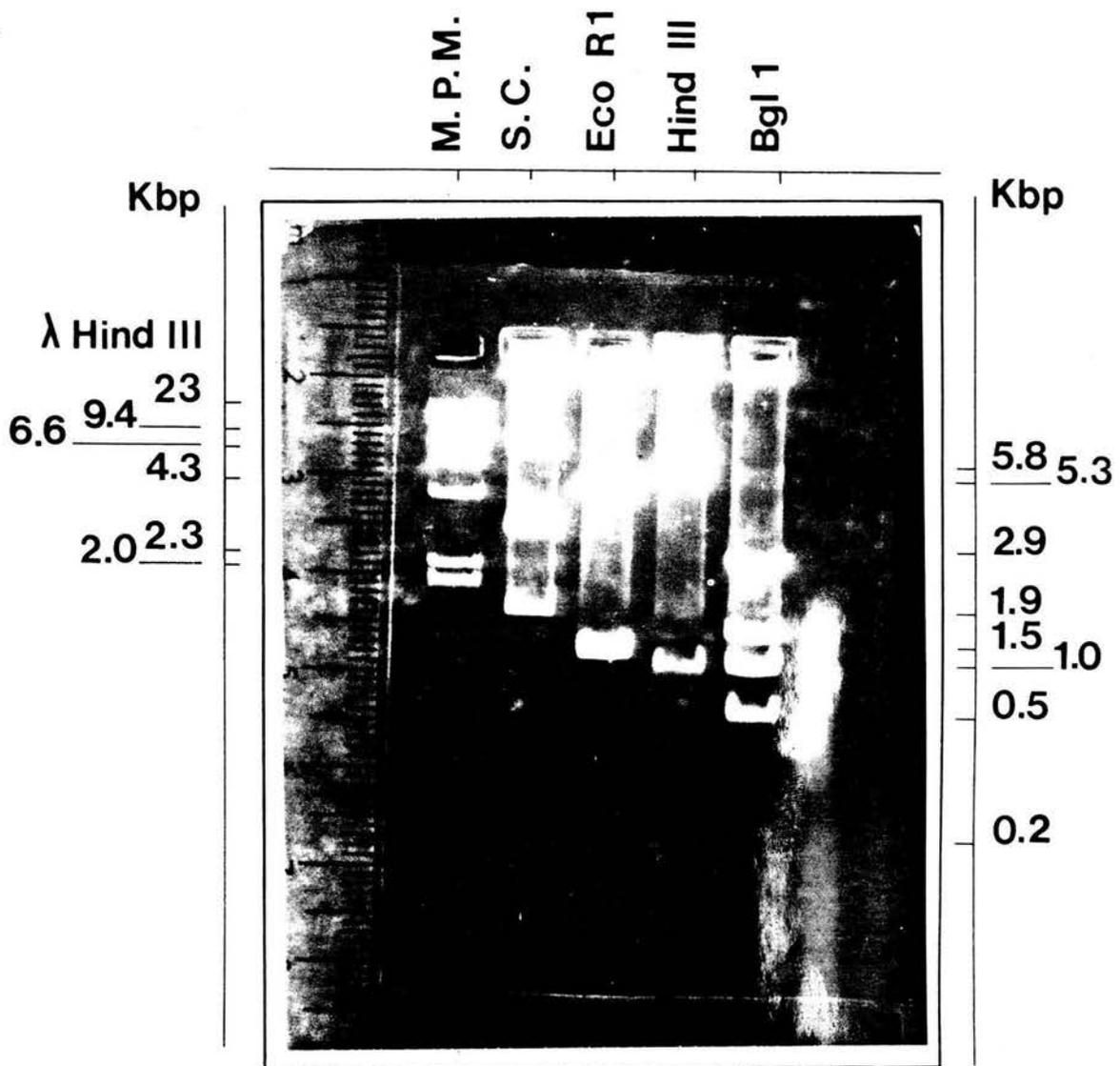


FIGURA 6 B

ADN, circular, lineal y superenrollada. Se uso como marcador de peso molecular, al fago lamda digerido con la enzima de restricción Hind III (m.p.m.).

Estos fragmentos del plásmido, derivados de la digestión con las anteriores enzimas, comprueban que este realmente, es el p-NP1.

Una vez realizado lo anterior, se procedio a marcar el plásmido mediante la técnica de " rompimiento y sustitución" (ver metodología). En la gráfica # 2 puede verse la cinética de incorporación del d-CTP al plásmido.

El plásmido marcado se utilizó como sonda de detección del gene N-ras en el ADN de neoplasia de cerebro humano, digerido con la enzima de restricción Eco R1.

Las muestras analizadas fueron donadas por el departamento de Genética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de la S.S.A., de las que 8 fueron Astrocitomas, 8 Adenomas, 7 Meningiomas, 2 Meduloblastomas, 2 Glioblastomas, 1 Germinoma, 1 Craneofaringeoma y 1 Oligodendroglioma (Ver Tabla 5), así como 8 muestras de tejido normal de cerebro (obtenido de autopsias).

El ADN de los tumores y tejido normal fue digerido con la endonucleasa de restricción Eco R1, dando, para el gene N-ras de tejido normal, dos fragmentos, uno de 9.2 y otro de 7.0 Kb, que fueron migrados por electroforésis en un gel de agarosa al 0.9% y teñido con bromuro de etidio (Figura # 5) y mas tarde fueron transferidos a papel de nitrocelulosa por la técnica de Southern e hibridado con la sonda p-NP1.

TABLA NO.5

TUMOR	EDAD	SEXO	DIAG. HISTOPAT.	PROCEDENCIA
02	22	F	MENINGIOMA	EDO. DE MEX.
05	55	F	MENINGIOMA	D.F.
08	53	M	ASTROCITOMA	EDO. DE MEX.
10	44	F	MENINGIOMA	D.F.
11	65	F	MENINGIOMA	D.F.
18	20	F	ASTROCITOMA	GUERRERO
22	19	M	ADENOMA	EDO. DE MEX.
23	22	F	MEDULOBLASTOMA	D.F.
24	16	M	ASTROCITOMA	D.F.
25	37	M	GLIOBLASTOMA	OAXACA
26	52	F	GLIOBLASTOMA	HIDALGO
27	57	F	ADENOMA	D.F.
29	57	M	OLIGODENDROGLIOMA	B.C.N.
30	43	M	ADENOMA	D.F.
31	65	M	ADENOMA	D.F.
35	41	F	ADENOMA	PUEBLA
36	52	F	ADENOMA	VERACRUZ
40	33	F	ADENOMA	EDO. DE MEX.

EVOLUCION	C-myc		N-myc		N-ras	
	A	R	A	R	A	R
2 AÑOS	11X	-	5X	-	-	-
4 AÑOS	32X	-	1X	+	-	-
15 AÑOS	18X	+	5X	-	-	-
3 AÑOS	4X	+	3X	-	-	-
3 AÑOS	1X	+	1X	-	-	-
5 MESES	17X	-	5X	-	-	-
6 AÑOS	1X	-	1X	-	-	-
2 MESES	1X	-	1X	-	-	-
3 MESES	1X	-	1X	-	-	-
3 MESES	4X	-	1X	-	-	-
6 MESES	1X	-	6X	-	-	-
4 AÑOS	-	-	-	-	-	-
9 MESES					-	-
6 AÑOS					-	-
40 AÑOS					-	-
2 AÑOS					-	-
5 AÑOS					-	-
7 AÑOS					-	-

Como puede observarse en las Figuras # 7 y 8, el fragmento de 9.2 Kb del Gene N-ras fue detectado, y en esta banda no se observa ninguna alteración para ninguno de los tumores estudiados.

Además de esta, se detectó un fragmento de aproximadamente 6.7 Kb que corresponde a un homólogo del N-ras, que pensamos pueda ser posiblemente el K-ras ya que este al ser digerido con la enzima Eco R1 da varios fragmentos, uno de los cuales es de 6.7 Kb (41) en donde se encuentra el primer exon, que presenta el 93% de homología con el primer exon del gene N-ras (9) para el cual se encuentra dirigida la sonda. Además se observa una banda adicional de 6.0 Kb que no se observa en el ADN del tejido normal y que se ha reportado también como una homología con el gene N-ras (31).

En la Figura # 8, para las muestras tumorales T31, T35, T36 y T40 se observa una amplificación en la banda de 6.7 Kb, no siendo así para las demás muestras tumorales; estas amplificaciones son de 4 a 7 veces con respecto al ADN del tejido normal, y las 4 muestras corresponden al mismo tipo de neoplasia: Adenoma (Ver Tabla # 5). Es por ello que en el laboratorio se llevaran a cabo trabajos posteriores de hibridación del ADN de estos tumores con una sonda específica para el K-ras, con el fin de corroborar los datos anteriores.

La Tabla # 5 resume los estudios histológicos y moleculares de las neoplasias intracraneales para el N-ras y en algunos de los casos para los oncogenes N-myc y c-myc, en donde se señalan las principales alteraciones de los

FIGURA 7

AUTORRADIOGRAFIA DEL ADN TUMORES DE CEREBRO DE HUMANO Y DE TEJIDO NORMAL DIGERIDO CON LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN ECO R1, E HIBRIDIZADO CON UN SEGMENTO DE 1 KB DEL GENE N-ras.

T	TEJIDO TUMORAL
N	TEJIDO NORMAL

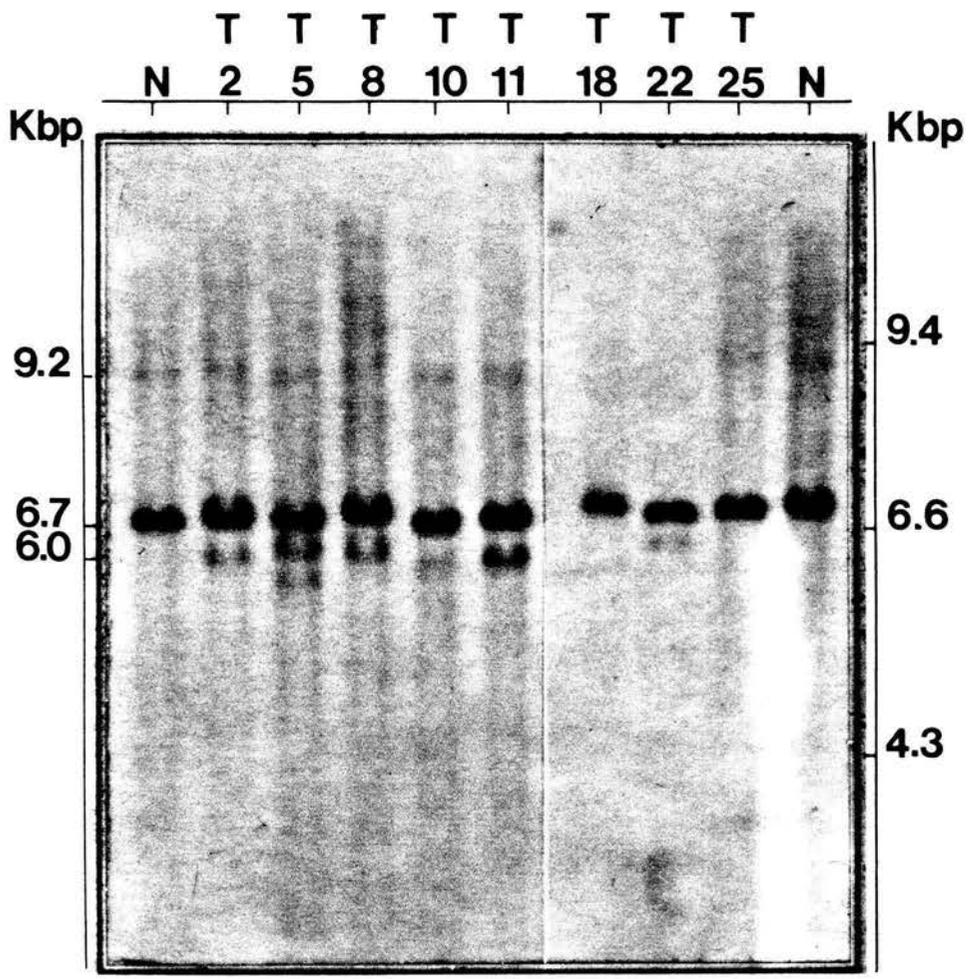


FIGURA 7

FIGURA 8

AUTORRADIOGRAFIA DEL ADN DE TUMORES DE CEREBRO DE HUMANO Y TEJIDO NORMAL DIGERIDO CON LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN ECO R1, HIBRIDADO CON UN SEGMENTO DE 1 KB DEL GENE N-ras.

N	TEJIDO NORMAL
T	TEJIDO TUMORAL

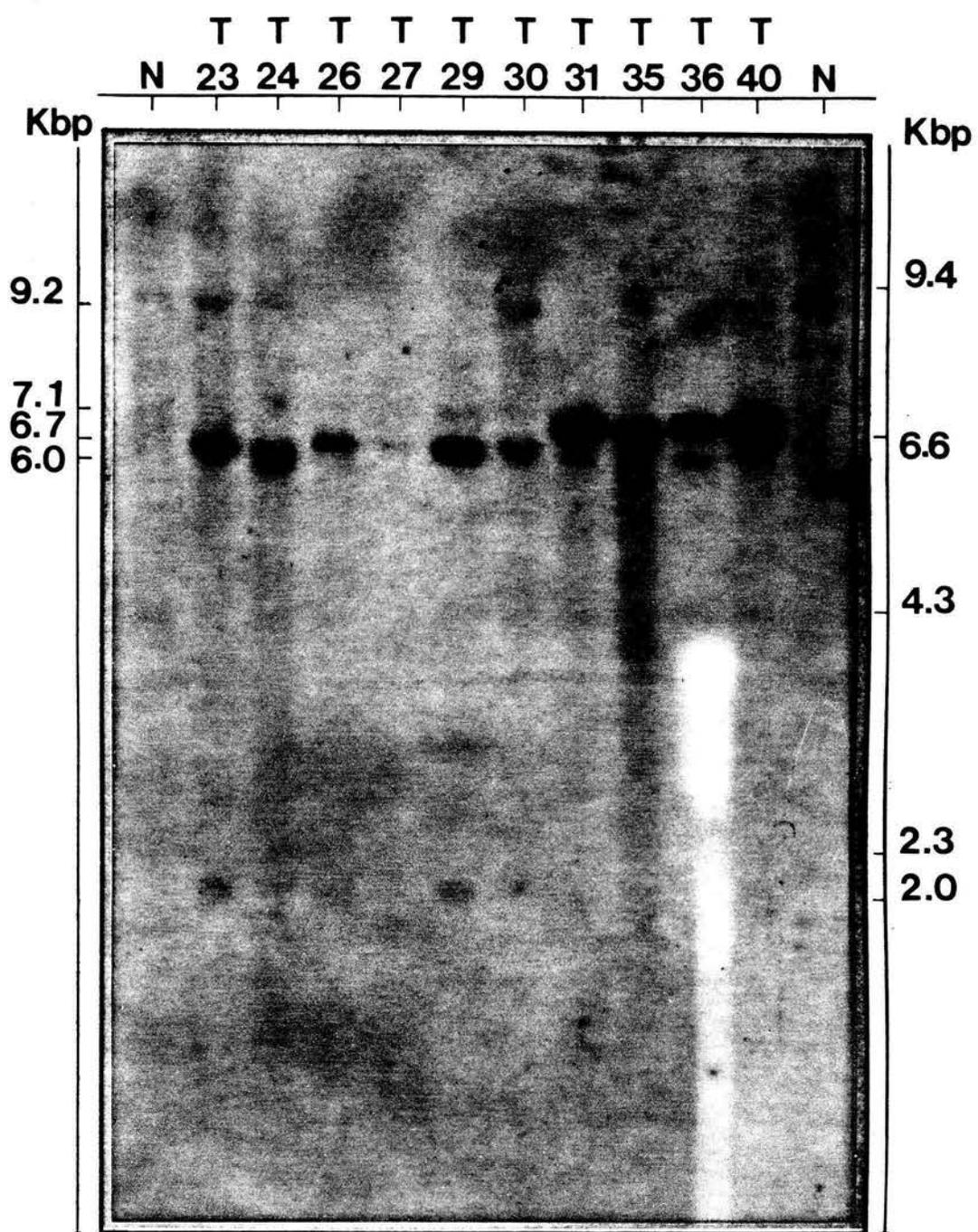


FIGURA 8

oncogenes mencionados, así como datos adicionales de cada caso, como lo son la edad, sexo y procedencia.

Dichas alteraciones para el caso del c-myc pueden ser observadas en las Figuras # 9 y 10, resultado del trabajo realizado por los alumnos , R. Ocadiz y R. Saucedo en el laboratorio del Dr. Patricio Gariglio en el CINVESTAV.

FIGURA 9 Y 10

AUTORRADIOGRAFIAS DEL ADN DE TEJIDO TUMORAL Y NORMAL DE CEREBRO DE HUMANO DIGERIDO CON LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN ECO RI(E) Y HIND III(H), SEPARADO MEDIANTE ELECTROFORESIS, TENIDO CON BROMURO DE ETIDIO E HIBRIDIZADO CON LA SONDA ESPECIFICA PARA EL GENE C-MYC (HLM-XBA).

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO POR LOS ALUMNOS RENE SAUCEDA LOPEZ Y RODOLFO OCADIZ EN EL LABORATORIO DEL DR. PATRICIO GARIGLIO.

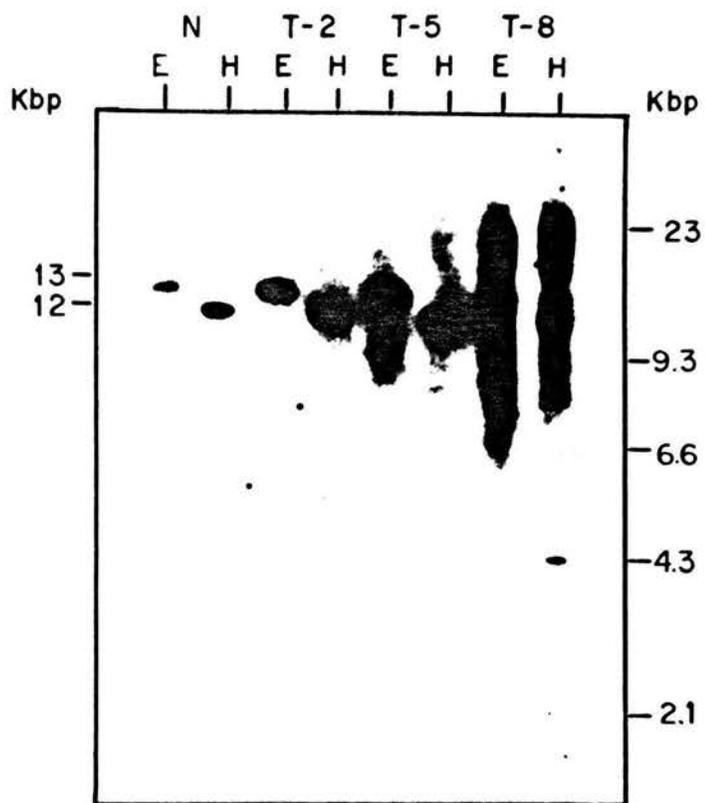
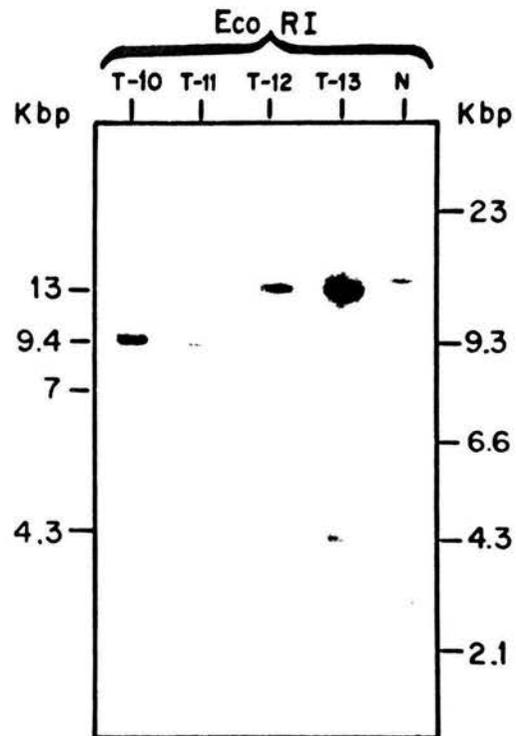
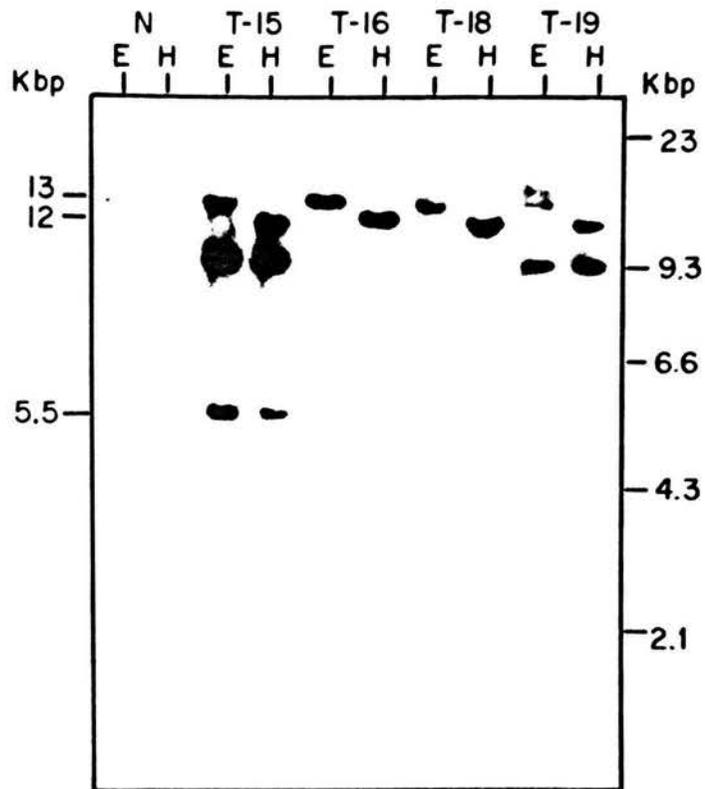
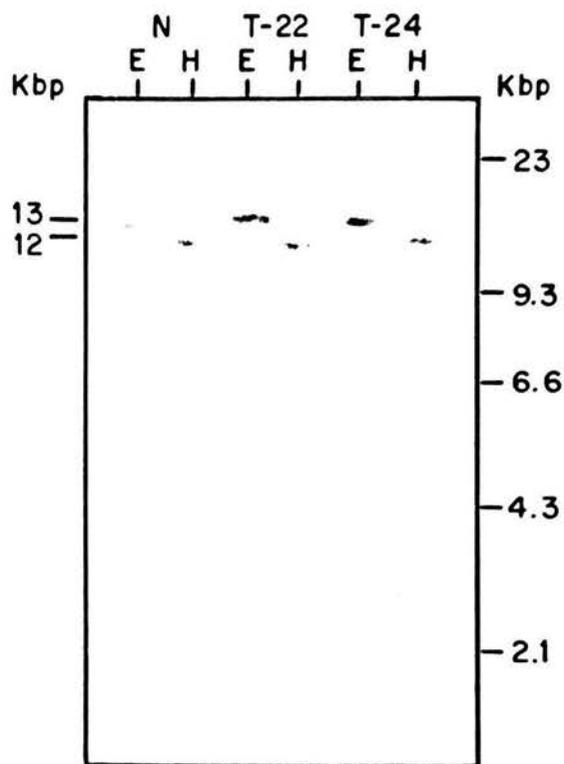


FIGURA 9 10







DISCUSION

1.- La cepa de E. coli que contiene al plásmido p-NP1, creció en medios de cultivo con ampicilina, mientras que el crecimiento en tetraciclina fue negativo. Con esto se detecta la presencia del plásmido resistente a ampicilina y sensible a tetraciclina. Cuando dicho plásmido se aisló, purificó y restringió, las bandas obtenidas con las diferentes enzimas comprueban que este es realmente el p-NP1 que posee el primer exon del gene N-ras. Después de lo anterior, el plásmido se marco con α -dCTP (ver Metodología) para su posterior utilización como sonda con la cual detectar al oncogene N-ras en tumores de cerebro de humano.

2.-El gene N-ras detectado en las muestras de neoplasias intracraneales analizadas, no presentó ningún tipo de las alteraciones comunes en la familia ras, y específicamente en el proto-oncogene N-ras, como lo son las amplificaciones y/o rearrreglos (8,10,45) o mutaciones puntuales (41,42,45) que alteraran, al menos, los sitios de corte para la enzima Eco R1, que fue la utilizada en este trabajo.

Existen varios estudios sobre algunas de las alteraciones del proto-oncogene N-ras, reportadas principalmente en líneas celulares (8,9,10,41,42,45), mientras que en este trabajo, el ADN analizado se obtuvo a partir de muestras tumorales frescas de personas sin ningún tratamiento radiológico y/o quimioterapéutico.

De todas las muestras estudiadas, trece de ellas fueron

analizadas para detectar a los oncogenes c-myc y N-myc, en un trabajo realizado anteriormente en el laboratorio, por los alumnos R. Saucedo y R. Ocadiz, de los cuales el 70 % de los tumores benignos presento amplificación, rearrreglo o ambas, para el gene c-myc; mientras que en los tumores malignos, el 57 % de ellos presento ambas alteraciones. El porcentaje de alteración para el N-myc fue del 45% (ver Tabla # 5). Las demás muestras fueron por primera vez analizadas para la realización del estudio molecular.

En trabajos realizados en la línea celular HL60 (de anemia promielocitica humana) se ha encontrado activado al oncogene N-ras, junto con una amplificación del c-myc (22,23,45a) (el N-ras no presenta amplificación en dichas células),pero, se asume que dicha cooperación es requerida para el desarrollo de carcinogénesis. De las alteraciones observadas en el N-ras las mutaciones puntuales son las más frecuentemente observadas(41,42,45,45a,49), pero este tipo de alteración no puede ser detectado mediante las técnicas utilizadas en este trabajo, por lo que no se descarta la posibilidad de que este tipo de alteración exista, y en cuyo caso se presente a nivel de la proteína (que se sabe tiene un papel importante en la regulación celular) y tenga algún papel cooperador con el c-myc y/o el desarrollo de la neoplasia.

La determinación de los niveles de ARNm no siempre puede correlacionarse con el grado de amplificación de un oncogene, ya que se ha observado que puede existir un número

normal de copias de un ADN y una expresión aumentada; por otro lado existen trabajos en donde no existe cooperación alguna entre dos o mas oncogenes para la transformación de cultivos primarios de células, (5,5a,15a,22,23,32a,33a,).

Todo esto nos hace pensar que el N-ras, que aparentemente no se encuentra alterado, puede estar involucrado en el desarrollo de estas neoplasias, por lo que podria ser interesante la continuación de dichos trabajos.

En la mayoría de los ADN de las neoplasias estudiadas, y en el ADN de los tejidos normales, se detectó una banda adicional a la de 9.2 Kb, que corresponde al N-ras, de aproximadamente 6.7 Kb, lo que podria sugerir que corresponde a uno de los fragmentos del K-ras digerido con la enzima de restricción Eco-R1 , ya que dicho fragmento corresponde al primer exón del gene K-ras que tiene un 93% de homología con el primer exon del N-ras para cuya detección esta dirigida la sonda. (9,31,41).

El hecho de encontrar una banda amplificada con respecto a la encontrada para el ADN de tejido normal, nos hace pensar que este se encuentra amplificado, pero se requiere la utilización de una sonda especifica para el K-ras (de preferencia dirigida hacia el exón III o IV que presenta la zona de mayor divergencia entre ambos genes) para poder asegurar el origen de dicho fragmento, y de la banda de 6.0 Kb.

Estos resultados concuerdan con los trabajos realizados por varios investigadores en laboratorios de otros paises, en

los que también se detectan bandas adicionales a las esperadas, tanto para el ADN de tejido normal como de tejido tumoral, así como también en líneas celulares tumorales, y que ellos sugieren son bandas detectadas por homología con algún gene de la familia ras. Tal es el caso de los trabajos de Shimizu y col. 1983, en el que el ADN de fibroblastos de ratón transformados con ADN de células SK-N-SH (que contienen al N-ras alterado), presentan además de las bandas esperadas, bandas de 4.5, 10.5 y 15 Kpb y que concluyen son secuencias homólogas altamente conservadas en la evolución. Otro ejemplo es el trabajo de Graham y col. 1985, en donde se detecta al gene N-ras amplificado 20 veces en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama de humano, y que además de la banda de 9.2 Kb obtenida por hibridación con la sonda p-NP1 se obtienen bandas de aproximadamente 2.3, 4.0 y 6.0 Kb y que reportan como homólogo al N-ras . Lo mismo ocurre en el trabajo de Yoichi y col., 1984, en el que se detectan algunas bandas no esperadas de aproximadamente los mismos pesos moleculares que los trabajos anteriores. (En estos trabajos no se da una explicación más amplia a cerca de la aparición de estas bandas homólogas detectadas con las sondas utilizadas).

Como ya se mencionó, el hecho de no haber encontrado alteraciones mediante estas técnicas en el N-ras de tumores de cerebro de humano, no significa que estas no existan, y otro tipo de pruebas pueden ayudar a encontrar alguna posible alteración a nivel de ARNm o proteínas en el gene N-ras.

CONCLUSIONES

-El haber encontrado a la cepa E. coli ampicilina resistente y tetraciclina negativa fue el primer paso para la identificación del plásmido, y su análisis con las diferentes enzimas de restricción después de su aislamiento y purificación nos corroboró que en realidad el plásmido obtenido era el p-NP1.

- Una vez obtenido el p-NP1, y marcado con radiactividad, fue una buena sonda para la detección del gene N-ras en tumores de cerebro de humano ya que pudo detectar un gene individual de entre miles de genes que contiene el genoma de una célula de mamífero, (5a,29). El hecho de detectar un posible homólogo del N-ras nos manifiesta que mediante esta metodología somos capaces de detectar específicamente un gene, o familias de varios genes a partir del genoma celular completo, usando algunas técnicas de Ingeniería Genética.

-La detección del oncogene N-ras, que no presento ningún tipo de amplificación o rearrreglo, sugiere que este no se encuentra fuertemente involucrado en el desarrollo de estas neoplasias intracraneales, y solamente podría actuar como agente causal en dichas muestras, pero el hecho de que mediante las técnicas utilizadas no se detecten otro tipo de alteraciones como por ejemplo las mutaciones puntuales, comunes en los miembros activos de la familia ras y que se encuentran involucrados con la aparición de transformación celular, así como tampoco se detectan niveles alterados del

ARNm, nos hace pensar en una posible alteración no detectable. (Trabajo de R. Ocadiz, comunicación personal).

Con este trabajo se contribuye de cierta manera al esclarecimiento de las causas moleculares del cáncer, como es la participación de varios oncogenes en un solo tipo de tumor, (c-myc, N-myc y N-ras en el cerebro). El hecho de encontrar al gene c-myc alterado, pudiera sugerir que la alteración es debida a este oncogene, pero existen evidencias en donde la transformación requiere de la participación de por lo menos dos oncogenes, uno que tenga la característica de transformar, y el otro que tenga la característica de inmortalizar a las células, (5a,15a,23,33a), por lo que existe la posibilidad de que un segundo oncogene participara en el desarrollo de estas neoplasias, que bien pudiera ser al N-ras, pues existen evidencias de la cooperación de estos dos oncogenes en el desarrollo carcinogénico, o bien pudiera ser el N-myc que se encuentra alterado también. (5a,22,23,32a,33a)

-A pesar de que este trabajo es un análisis preliminar, este tipo de experimentos en los que se observan modificaciones en los oncogenes (en este caso, en el oncogene c-myc) a nivel de ADN que se relacionan con el proceso tumoral , esta ayudando a un mejor entendimiento del origen molecular del cáncer y como consecuencia la definición de un posible camino con valor terapéutico para cánceres de muy baja probabilidad de sobrevivencia, que afecta principalmente a personas en edad productiva (que viven en zonas de alta contaminación). (Comunicación verbal Dr.H.

Figuroa del INNN, de la SSA).

-Debido a que el cáncer despierta un gran interés y atrae mucho apoyo financiero, los investigadores de esta enfermedad se encuentran en la obligación de poder anunciar alguna novedad terapéutica trascendente, o a falta de ello, algún proceso importante en la comprensión de la enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Adams J.M., Gerondakis S., Weeb L.M., y col. 1983.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol.80:1982.
- 2.- Alitalo, Schwab y Varmous. 1983. Proc. Natl. Acad.
Sci. USA. Vol.80. pp 1707.
- 3.- Ames B.N., 1977. Science. Vol.204: 587.
- 4.- Bailman A. 1985. J. Cancer. Vol.51:1
- 5.- Bishop. 1981. Cell. Vol.23:5.
- 5a.- Bishop. 1983. Ann. Rev. Biochem. Vol.52 :301.
- 6.- Bissenden. 1982. Nature. Vol.4:781.
- 7.- Bister, Jonsen H.W., Graf, Hyman. 1983. J. Virol.
Vol.46:337.
- 7a.- Igual que la número 9.
- 8.- Boz, Tokosol, Marshal, y col. 1985. Nature.
Vol. 315:726
- 9.- Brown, Marshal, Sheila y col. 1984. EMBO Journal.
Vol.36:1321.
- 10.- Buik, Graham, y col. 1985. Cancer Research.
Vol. 45:2201.
- 10b.- Capon, Seeburg, McGrant, y col. 1983. Nature.
Vol.304:507.
- 11.- Cooper G.M., 1982. Science. Vol.218:801.
- 12.- Cooper G.M., Hunter. 1983. J. Biol. Chem.
Vol.258:1108.
- 13.- Coins J. 1981. Nature. Vol.289:353.
- 14.- Coins J. 1975. Nature. Vol.255:197.
- 15.- Colins S., Groudine M. 1982. Nature. Vol.299:61.

- 15a.-Dalla-Favera, Wong, Gallo y col. 1982. Nature
Vol.299:61.
- 16.- De Martinville y col. 1983. Nucl. Acid Res.
Vol.11:5267.
- 17.- Dfeo y col. 1983. Nature.Vol.306:707.
- 18.- Downward J.,Yarden Y.,Mayes E.y col 1984. Nature.
Vol.307:521.
- 19.- Dulbecco. 1984. Mundo Cientifico. Vol.3:168.
- 21.- Erickson J.,Rushdi A., Drawing A., y col.1983.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA. Vol.80:820
- 22.- Gariglio P., 1982. Avance y Perspectiva. Mexico.
Vol.27:10.
- 22a.-Gibbs,Sigal,Poe, y col. 1984. Proc. Natl. Acad.
Sci. Vol.81:5704.
- 23.- Gilden R., Rice N., McAllister R., 1984. Gen. Anal.
Techn. Vol.1:23.
- 24.- Goldfarb. 1982. Nature.Vol. 296:404.
- 25.- Graf,Stehelin. 1982. Biochem.Biophys.Acta.
Vol.651:245
- 25a.-Graham y col. 1985
- 26.- Harrison . 1986. Principles of Internal Medicine.
McGraw Hill.USA. pp.1734-1737.
- 27.- Harvey J.J., 1986. Nature. Vol. 204:1104.
- 27a.-Hattori,Ulish,Kalliday y col. 1985. Mol Cel Biol.
Vol.5:1449
- 28.- Huffman E.M. 1983. Cell. Vol.35:393.
- 29.- Hunter T., 1984. Scientific American. Vol.251:60.

- 30.- Kares W.S., Hayward y Hanatuse. 1979. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Vol.76:3154.
- 30a.-Kasbor D., Croce M. 1984. Cancer Res. Vol.44:438.
- 31.- Kathrin,Graham,Carol,y Buik. 1985. Cancer Res. Vol.3:1209.
- 32.- Longbeheim,Shih,Scolnick. 1980. Virology. Vol.106:292
- 32a.-Land ,Parada y Weinberg. 1983. Nature. Vol 304:596.
- 33.- McBride O.W., Swan D.C., 1982. Nature. Vol.300:773
- 33a.-Murray, Cunningam, Parada y col.1983. Cell. Vol. 33:749.
- 34.- Newbiel. 1984. Nature. Vol.310:323.
- 35.- Olper P.M.,y col. 1977. Rev.Med.IMSS. Mexico. Vol.16(1):39.
- 36.- Pepescu. Cell. Mol. Genet. 1985. Vol.11:149.
- 36a.-Redy E.P.,Raynolds R.K.,Santos E.y col. 1982. Nature. Vol.300:149.
- 37.- Robbins and Angell. 1971. Basic Phatology. USA. Ed. W.C. Sounders Company.
- 37a.-Ruley. 1983. Nature. Vol.304:602.
- 38.- Santos,Reddy,Pueciant,y col. 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol.80:4679
- 39.- Santos y col. 1984. Nature. Vol.298:393.
- 39a.-Sauceda R. 1986. Tesis UNAM. Mexico.
- 39b.-Sauceda R.,Ocadiz R.,Gariglio P. 1986. Taller de Actualizacion de Bioquimica. Mexico.

- 40.- Schab, Ellison, Busch, y col. 1984. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 81:4940.
- 41.- Shimizu, y col. 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 80:2112.
- 42.- Shimizu, Birnbaun, Ruley, y col. 1983. Nature. Vol. 304:497.
- 43.- Stavanzer, Gerhard R.C. 1981. J. Virol. Vol. 39:920
- 44.- Stephenson et al. 1980. Molecular Biol. of RNA Viruses. Academic Press. N.Y. USA. pp 911.
- 44a.- Tabin, Bradley, Bergmann, y col. 1982. Nature. Vol. 300:143.
- 45.- Taparowsky, Shimizu, Goldfarb, Wigler. 1983. Cell. Vol. 34: 581-586.
- 45a.- Taparowsky, Suard, Fasand, y col. 1982. Nature. Vol. 300:762.
- 45b.- Taya, Hosogay, Hirohashi, y col. 1984. EMBO J. Vol. 3:2943.
- 45c.- Trahey, Milleni, Cole y col. 1987. Vol:7 No.1 541.
- 46.- Ushiro, Cohen. 1980. J. Biol. Chem. Vol. 255:8363.
- 47.- Varmous. 1984. Ann. Rev. Genet. Vol. 18:553-612.
- 48.- Voichi. Taya, Kazuyuki, Hosogay y col. 1984. EMBO J. Vol. 3:1780.
- 49.- Willicke, Schafar. 1984. Human Oncogenes. Vol. 66:132
- 50.- Willingham, Jay, Daston. 1979. Cell. Vol. 18:125.
- 51.- Weiss, Teich, Varmous, Coffin. 1982. Cold Spring

Harbor. N.Y. USA.1234.

52.- Yufrolovai. 1985. Mol. Biol.(In Russian)

Vol.19:177

53.- Zabarabskii. 1985. Institute of Molecular Biol.

Academy of Sciences opf URSS. Moscu. Vol. 19:9-35.