



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**ESTANDARIZACION DE LOS SISTEMAS DE DETECCION
DE PROTEINAS CON LA TECNICA DE
INMUNOHISTOQUIMICA: ESTREPTAVIDINA-BIOTINA,
AMPLIFICACION DE LA SEÑAL Y SISTEMA LIBRE DE
BIOTINA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**PRESENTA:
CRUZ HECTOR MAGAÑA MEDINA**



MEXICO, D. F.



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

2005

m 351975



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

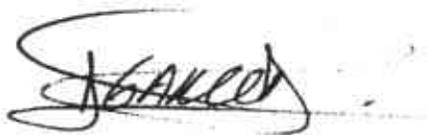
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

Jurado asignado:

Presidente LAURA PENICHE VILLALPANDO
Vocal GRACIELA NAVA DIAZ
Secretario FRANCISCO JAVIER GARCIA VAZQUEZ
1er sup. RAQUEL ORTEGA MUÑOZ
2do sup. ROSALINDA VELÁSQUEZ SALGADO

El tema se desarrollo en el Instituto Nacional de Pediatría.



M en C. FRANCISCO JAVIER GARCIA VAZQUEZ

Asesor



Cruz Héctor Magaña Medina

Sustentante

AGRADECIMIENTOS

A todos aquellos, que de alguna forma me han ayudado.

Gracias

INDICE

| | |
|--|----|
| CAPITULO I..... | 5 |
| Introducción..... | 5 |
| Clasificación de los tumores pediátricos del ojo y orbita..... | 9 |
| CAPITULO II..... | 10 |
| Antecedentes..... | 10 |
| Ciclo celular..... | 10 |
| Regulación por protein-cinasas..... | 10 |
| Protein-cinasas dependientes de ciclina..... | 11 |
| Regulación de las CDC por fosforilación..... | 11 |
| Degradación controlada de ciclina..... | 12 |
| Síntesis regulada de las CDC y ciclinas..... | 13 |
| Inhibición de las CDC..... | 14 |
| Proteína pRB 110..... | 14 |
| Genética molecular del gen RB..... | 17 |
| Función de la proteína pRB en el ciclo celular..... | 19 |
| Oncogenes, genes supresores y muerte celular programada..... | 20 |
| CAPITULO III..... | 27 |
| Detección de proteínas por IHQ..... | 27 |
| CAPITULO IV..... | 32 |
| Planteamiento del problema..... | 32 |
| Objetivo general..... | 33 |
| Objetivos específicos..... | 33 |
| Hipótesis..... | 33 |
| Estrategia general..... | 33 |
| Metodología..... | 34 |
| Detección de proteínas por el método LSAB..... | 34 |
| Detección de proteínas por el método CSA..... | 35 |
| Detección de proteínas por el método EPOS..... | 36 |
| Resultados..... | 36 |
| Discusión..... | 39 |
| Conclusión..... | 42 |
| Anexos..... | 43 |
| Protocolo IHQ para LSAB..... | 45 |
| Protocolo IHQ para EPOS..... | 46 |
| Protocolo IHQ para CSA..... | 47 |
| Glosario..... | 48 |
| Bibliografía..... | 51 |

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

| | |
|---|----|
| Fig. 1..... | 5 |
| Fig. 2..... | 8 |
| Fig. 3..... | 16 |
| Fig. 4..... | 17 |
| Fig. 5..... | 18 |
| Fig. 6..... | 19 |
| Fig. 7..... | 20 |
| Fig. 8..... | 29 |
| Fig. 9..... | 30 |
| Fig. 10..... | 31 |
| Figs. 11, 12, 13,14, 15, 16..... | 37 |
| Figs. 17, 18, 19, 20, 21, 22..... | 38 |
| Figs. 23. 24, 25, 26..... | 39 |
| Figs. 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38..... | 41 |

| | |
|--------------|----|
| Tabla 1..... | 6 |
| Tabla 2..... | 9 |
| Tabla 3..... | 22 |
| Tabla 4..... | 23 |
| Tabla 5..... | 23 |
| Tabla 6..... | 38 |
| Tabla 7..... | 38 |

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

El retinoblastoma es una neoplasia maligna de origen embrionario que se presenta generalmente antes de los 5 años de edad, a nivel mundial se estima que tiene una frecuencia de 1 en 20,000 nacidos vivos, se caracteriza por la presencia de leucocoria, estrabismo y/o signos inflamatorios oculares, se puede manifestar de dos formas, unilateral o bilateral, el 40% de los casos son hereditarios, en estos se incluyen a todos los bilaterales y del 10 al 15% de los unilaterales (Fig 1). El patrón de herencia es autosómico dominante y tiene una penetrancia del 90%. Clínicamente no es posible distinguir entre un retinoblastoma unilateral hereditario de uno no hereditario, aunque el no hereditario es siempre unilateral y se manifiesta generalmente después de un año de edad. (Tabla 1). La probabilidad que tiene un individuo con retinoblastoma hereditario de transmitirlo a su descendencia es del 50% y más de la mitad de los niños con esta forma de retinoblastoma desarrollan tumores extraoculares secundarios en los siguientes 32 años, y más del 90% de aquellos que reciben radioterapia los desarrollan en los siguientes 30 años al tratamiento. Así, los individuos con retinoblastoma hereditario tienen un riesgo mucho mayor que la población en general de desarrollar tumores de tipo mesenquimatoso (osteosarcomas, fibrosarcomas y mielomas) en etapas tempranas de su vida adulta.



Fig 1. Retinoblastoma unilateral

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS DEL RETINOBLASTOMA

| <u>HEREDITARIO*</u> | <u>NO HEREDITARIO**</u> |
|---|--|
| Inicio temprano (<1 año) | Inicio tardío (>1 año) |
| Bilateral (85-90%) | Unilateral (100%) |
| Unilateral (10-15%) | |
| Alteraciones genéticas : | Alteraciones genéticas : |
| <i>Mutaciones puntuales</i> | <i>Mutaciones puntuales</i> |
| <i>Grandes deleciones</i> | <i>Grandes deleciones</i> |
| <i>Translocaciones</i> | <i>Translocaciones</i> |
| Progenie afectada | Progenie normal |
| Alto riesgo a desarrollar otras neoplasias | Sin riesgo a desarrollar otras neoplasias |

(Díaz y Orozco, 1992)

* El 40 % de los casos con RB son hereditarios

** El 60% de los casos con RB no son hereditarios.

De acuerdo a la ley de Knudson, el retinoblastoma es una neoplasia causada por dos eventos mutacionales en el gen Rb1 que trae como consecuencia la inactivación de ambos alelos y conducen al desarrollo del tumor (Fig 2.). El retinoblastoma hereditario se desarrolla debido a la inactivación del primer alelo en las células germinales mientras que la inactivación del segundo se presenta en las células de la retina; en el no hereditario ambas mutaciones ocurren en las células de la retina. Cuando ambos alelos se inactivan se dice que existe pérdida de heterocigocidad (LOH) y que la homocigocidad resultante es causa del desarrollo del tumor. Los mecanismos que conducen a la pérdida de la heterocigocidad son los siguientes:

- Pérdida de un cromosoma: se debe a un error en la división durante el ciclo celular, el cromosoma normal se pierde y la célula adquiere la condición de hemicigocidad quedándose solo con el cromosoma mutado.
- Pérdida de un cromosoma y reduplicación del cromosoma restante: en este evento el cromosoma normal también se pierde por el mecanismo anterior, pero en este caso el cromosoma mutado se duplica, de tal manera que la célula se hace homocigota para el cromosoma mutado.
- Recombinación mitótica: este proceso puede ocurrir después de la segregación, dando lugar a una célula que conserva su heterocigocidad en los loci proximales al punto de recombinación, pero adquiere la condición de homocigocidad en los loci distales, incluyendo al gen Rb1.
- Mutación de novo en el cromosoma homólogo: en este caso el cromosoma normal sufre una mutación puntual en el locus homólogo al del cromosoma mutado. Este fenómeno no conduce a la pérdida de heterocigocidad en las regiones proximales a los alelos mutados. [1]

En un análisis por fragmentos de restricción de longitud polimórfica del cromosoma 13 se reveló que la recombinación mitótica es el mecanismo más común de la pérdida de heterocigocidad.

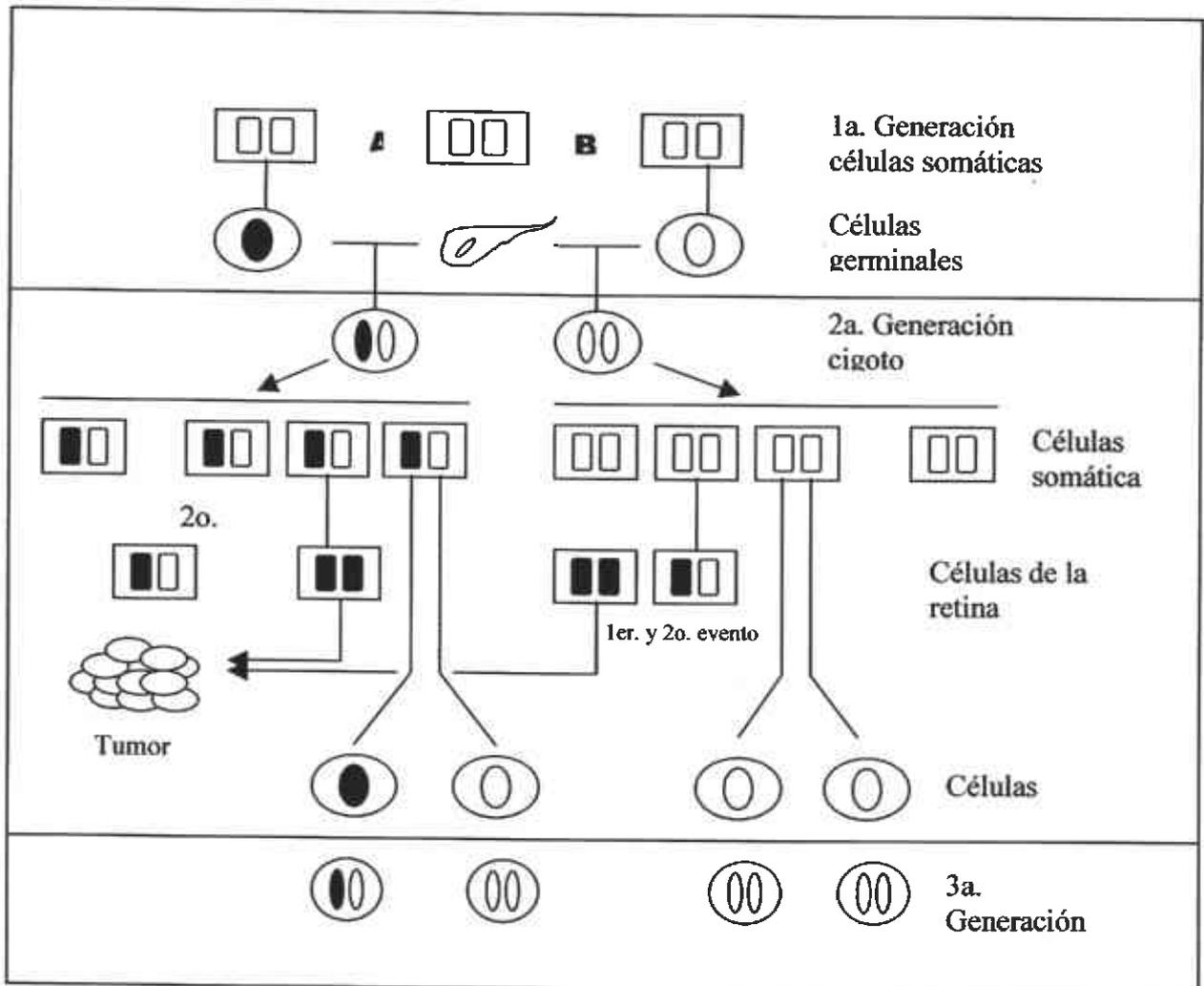


Fig. 2 Teoría de Knudson: De acuerdo a esta hipótesis, el RB es causado por la inactivación de ambos alelos del gen RB1; A) en la forma hereditaria, el 1er. alelo se inactiva en la células germinales y el 2o. alelo se inactiva en las células de la retina; B) en la forma no hereditaria los dos alelos se inactivan únicamente en las células de la retina.

(Knudson 1971)

CLASIFICACION DE LOS TUMORES PEDIÁTRICOS DEL OJO Y ORBITA

La importancia de la temprana identificación y tratamiento de los tumores oculares y orbitales se debe a que muchos tipos de neoplasias, son tumores benignos que se hacen malignos, ejemplo de los segundos el retinoblastoma y el rhabdomyosarcoma. [3]

Una conveniente aproximación a la clasificación de estos tumores, es por su localización: párpado, superficie ocular, orbita e intraocular. Los tumores orbitales luego son clasificados como: del desarrollo, quistes adquiridos, lesiones vasculares, masas inflamatorias, lesiones histiocíticas, hematopoyéticas y linfoproliferativas; tumores mesodérmicos, tumores neurogénicos, tumores de glándulas lagrimales y tumores metastásicos. [3] (Tabla 2).

Tabla 2

| Lesiones del párpado | Tumores de la superficie ocular | Tumores orbitales | Tumores intraoculares |
|----------------------|---------------------------------|--|--|
| Quelación | Granuloma piógeno | Lesiones quísticas | Retinoblastoma |
| Hordeolum | Dermolipoma/lipodermoide | Lesiones vasculares | Meduloepitelioma |
| Papiloma | Papiloma | Masas inflamatorias | Hemangioma capilar de la retina |
| Molusco contagioso | Nevo conjuntival | Masas histiocíticas, hematopoyéticas y linfoproliferativas | Melanocitoma del nervio optico |
| Cuerno cutáneo | Melanosis ocular | Tumores mesodérmicos | Hamartoma astrocítico |
| | | Tumores neurogénicos | Hipertrofia congénita del epitelio pigmentado de la retina |
| | | Glandula lagrimal | Hamartoma combinado del epitelio pigmentado de la retina |
| | | Metastásicos | Osteoma coroidal |
| | | | Melanoma coroidal |
| | | | Teratoma |

ANTECEDENTES

1.1 Ciclo celular

La división celular en eucariotas, ocurre en cuatro fases bien definidas. En la fase S (síntesis), el DNA se replica y produce copias para ambas células hijas. En la fase G₂ (G, significa gap, es decir el espacio, entre las diferentes fases) se sintetizan proteínas nuevas y la célula aproximadamente crece al doble de su tamaño. En la fase M (mitosis), la envoltura nuclear de la célula madre se degrada, los cromosomas son estirados hacia polos opuestos de la célula, cada conjunto de cromosomas producidos rodeado por una envoltura nuclear recién formada y la citocinesis corta la célula por la mitad, produciendo dos células hijas. En tejidos que proliferan rápidamente, cada célula hija se divide de nuevo, pero solo después de un periodo de espera llamado G₁. Después del paso por la mitosis y la entrada a G₁, la célula continúa a través de otra división o cesa de dividirse entrando a una fase de latencia llamada G₀, que puede durar horas, días o toda la vida de la célula. Las células diferenciadas terminales están en fase G₀. Cuando una célula en G₀ empieza a dividirse de nuevo, vuelve a entrar en el ciclo de división en la fase G₁.^[4]

1.2 Regulación por proteín-cinasas

El ciclo celular esta regulado por proteínas llamadas cinasas; uno de los papeles más importantes en los que participan es en la fosforilación de proteínas que modulan la regulación del ciclo celular eucariótico. La "decisión" de una célula de dividirse o no, tiene una importancia crucial para el organismo. Cuando los mecanismos de regulación que limitan la división celular son defectuosos y las células experimentan una división incontrolada, el resultado es catastrófico: Cáncer.

Una correcta división celular requiere una secuencia ordenada y precisa de acontecimientos bioquímicos que asegure a cada célula hija el conjunto completo de las moléculas que requiere para vivir, las investigaciones en el control de la

división celular en diversas células eucarióticas han puesto de relieve mecanismos universales de regulación. Las proteín-quinasas y la fosforilación de proteínas, son básicas en el mecanismo de sincronización que determina el inicio de la división celular y asegura el paso ordenado a través de estos acontecimientos. Esta familia de proteínas tiene diversas actividades que cambian en respuesta a señales celulares, gracias a la fosforilación de proteínas específicas a intervalos precisamente sincronizados, estas proteínas dirigen las actividades metabólicas de la célula para producir una división celular ordenada.

1.2.1 Proteín cinasas dependientes de ciclina (CDC's)

Estas cinasas son heterodímeros con una subunidad reguladora: ciclina; y una subunidad catalítica: proteína cinasa dependiente de ciclina (CDC). En ausencia de ciclina, la subunidad catalítica es prácticamente inactiva, pero cuando se une la ciclina, se abre el sitio catalítico, un residuo esencial para la catálisis se vuelve accesible y la actividad de la subunidad catalítica aumenta 10 000 veces. Las células animales tienen al menos diez ciclinas diferentes designadas A, B, C, D, E y así sucesivamente y al menos ocho cinasas dependientes de ciclina que van de la CDC1 a la CDC8, las cuales actúan en varias combinaciones en puntos específicos del ciclo celular.

En una población de células animales que experimentan división sincronizada algunas actividades CDC muestran notables oscilaciones, que son el resultado de cuatro mecanismos de regulación de la actividad de la CDC: fosforilación ó desfosforilación de CDC, degradación controlada de la subunidad de ciclina, síntesis periódica de CDC y ciclinas; y la acción de proteínas inhibitoras de las CDC específicas.

1.2.2. Regulación de las CDC por fosforilación.

La actividad de una CDC se ve afectada notablemente por fosforilación y desfosforilación de dos residuos críticos de la proteína. La fosforilación de la Tyr¹⁵, situada cerca del extremo amino-terminal inactiva la CDC, el residuo P-Tyr esta situado en el sitio de unión del ATP de la cinasa y el grupo fosfato cargado

negativamente bloquea la entrada del ATP. Una fosfatasa específica desfosforila el residuo P-Tyr, permitiendo la unión del ATP. La unión de la Thr¹⁶⁰ en el "bucle T" de la CDC, catalizada por la cinasa activadora de la CDC, fuerza al bucle T a salir de la hendidura que forma el sitio de unión al sustrato permitiendo la unión del sustrato y la actividad catalítica.

Una circunstancia que desencadena este mecanismo de control es la presencia de zonas de cadena sencilla de DNA, que conducen a la detención del ciclo celular en fase G2. Una proteína cinasa específica que es activada por regiones de cadena sencilla de DNA provoca una cascada que conduce a la inactivación de la fosfatasa que desfosforila la Tyr¹⁵ de la CDC. La CDC permanece inactiva y la célula se detiene en G2. La célula ya no se dividirá hasta que el DNA sea reparado y los efectos de la cascada invertidos.

1.2.3 Degradación controlada de ciclina.

La degradación proteolítica de las ciclinas mitóticas es altamente específica y temporalmente precisa, regula la actividad de las CDC a lo largo del ciclo celular. El paso a través de la mitosis requiere primero la activación y luego la destrucción de las ciclinas A y B, las cuales activan la subunidad catalítica de la CDC de la fase M. Estas ciclinas contienen cerca del extremo amino terminal la secuencia siguiente: Arg-Thr-Ala-Leu-Gly-Asp-Ile-Gly-Asn, la "caja de destrucción" que las marca para la degradación. Una proteína que reconoce esta secuencia llamada DBRP (proteína que reconoce la caja de destrucción), inicia el proceso de degradación de la ciclina y pone en contacto a la ciclina y otra proteína: la ubiquitina. La ciclina y la ubiquitina activada se unen covalentemente gracias a la enzima ubiquitina ligasa. A continuación se unen otras moléculas de ubiquitina proporcionando la señal para un complejo enzimático proteolítico, el proteasoma, que degrada la ciclina.

Hay un bucle de retroalimentación en el que el incremento de la actividad de la CDC activa la proteólisis y las ciclinas recién sintetizadas se asocian con la CDC y la activan. La CDC a continuación fosforila y activa las DBRP. La DBRP activa provoca entonces la proteólisis de la ciclina. El descenso de la concentración de

ciclina, provoca que descienda la actividad de la CDC, y la actividad de la DBRP también disminuye a través de una lenta y constante desfosforilación e inactivación por DBRP fosfatasa. El nivel de ciclina se recupera finalmente gracias a la síntesis de nuevas moléculas de ciclina.

El papel de la ubiquitina y el proteasoma no se limita a la regulación de la ciclina, sino que ambos están implicados además en el recambio de proteínas celulares, proceso que es de importancia fundamental en el orden estructural celular.

1.2.4 Síntesis regulada de las CDC y ciclinas.

Otro mecanismo para cambiar la actividad de la CDC es la regulación de la velocidad de síntesis de ciclinas, de la CDC, o de ambas. Por ejemplo, las ciclinas D y E, las CDC 2 y 4 se sintetizan solo cuando un factor de transcripción específico E2F, está presente en el núcleo para activar la transcripción de sus genes. Y la síntesis de E2F es a su vez regulada por señales extracelulares tales como factores de crecimiento y citocinas (inductores de la división celular), componentes esenciales para la división de células de mamífero en cultivos. Estos factores de crecimiento inducen la síntesis de factores de transcripción nucleares específicos para la producción de las enzimas encargadas de la síntesis de DNA. Un importante sustrato de la CDCS es la proteína retinoblastoma (pRB110), que participa en el mecanismo de regulación negativa de la división celular en G1 si se detecta daño en el DNA. Esta proteína es llamada así por la línea celular del tumor de retina en el que fue descubierta, pRB funciona en todos los tipos celulares regulando la división celular en respuesta a diversos estímulos. La pRB no fosforilada se une al factor de transcripción E2F1, y mientras está unido a pRB, E2F1 no puede promover la transcripción de un grupo de genes necesarios para la síntesis de DNA (los genes de la DNA polimerasa α , la ribonucleótido reductasa y otras proteínas). En este estado, el ciclo celular no puede pasar de fase G1 a la fase de síntesis, el paso que compromete a la célula a la mitosis y división celular. (El mecanismo de bloqueo de la pRB-E2F1 se elimina cuando la pRB se fosforila gracias a la ciclina E-CDCS2, lo que tiene lugar en respuesta a una señal para que transcurra la división celular).^[4]

1.2.5 Inhibición de las CDC.

Finalmente las proteínas inhibidoras específicas se unen e inactivan CDC específicas. Una de ellas es la proteína p21.

Estos cuatro mecanismos de control, modulan la actividad de CDC específicas, que a su vez, controlan si la célula se dividirá, se diferenciará, se convertirá en quiescente o empezará un nuevo ciclo de división después de un periodo de latencia.

Los detalles de la regulación del ciclo celular, tales como el número y tipo de ciclinas y de cinasas, y las combinaciones en las que estas actúan, difieren entre los diferentes organismos, pero se conserva el mecanismo básico en la evolución de todas las células eucariotas.

La lista de las proteínas blanco sobre las que actúan las CDC continúa creciendo. Pero podemos ver un patrón de la regulación de la CDC observando los efectos de las CDC sobre las estructuras de la laminina y la miosina y sobre la actividad de la proteína del retinoblastoma.

La estructura de la envoltura nuclear se mantiene en parte gracias a la alta organización de la red de filamentos intermedios formados por la proteína laminina. La ruptura de la membrana nuclear antes de la segregación de las cromátidas hermanas en la mitosis se debe en parte a fosforilación de la laminina por una CDC, que provoca la despolimerización de los filamentos de laminina.

Un segundo blanco de la cinasa es la maquinaria contráctil de la actomiosina impulsada por ATP, que pinza una célula en división dando dos partes iguales en la citocinesis. Después de la división, la CDC fosforila una pequeña subunidad reguladora de miosina, provocando la disociación de la miosina de los filamentos de actina e inactivando la maquinaria contráctil. Luego, la desfosforilación permite el reensamblaje del aparato contráctil para la siguiente etapa de citocinesis.

1.3 Proteína pRB 110

La fosfoproteína pRB110 se une de manera específica al factor de transcripción E2F1 y puede ser fosforilada por proteincinasas, siendo la más

importante la cdc2. Durante la fase M la pRB110 se encuentra en su forma activa (No fosforilada) y tiene la capacidad de formar complejos con otras proteínas celulares y de manera específica con el factor promotor de la transcripción E2F1; inhibiendo la progresión del ciclo celular al final de G0, a principios de G1 la pRB110 interactúa con cinasas dependientes de ciclinas (cdcs) transformándose en su forma inactiva (fosforilada), como resultado de este proceso, el factor E2F1 y las proteínas celulares asociadas al complejo, quedan libres, e inducen a la fase S, entre ellos se incluyen algunos productos de proto-oncogenes que promueven la división celular como c-myc, c-jun y c-fos. Al final de la fase S, la interacción, pRB110/cdcs se rompe y la pRB110 regresa a su forma activa recuperando en la fase M del siguiente ciclo celular su capacidad para formar complejos inactivos con el factor E2F1 y otras proteínas celulares. Así la ausencia en la función de pRB110, es una condición para el desarrollo del tumor, por lo que el gen Rb se considera un gen supresor de la tumorigénesis.

Cuando el daño en el DNA, tal como una rotura de cadena simple es detectado por las proteínas cinasas ATM y ATR, (proteínas cinasa que detectan DNA dañado) estas activan p53, que sirve como factor de transcripción que estimula la síntesis de la proteína p21. Esta proteína inhibe la actividad proteína cinasa de la ciclina E-CDC2. En presencia de p21, pRB permanece desfosforilada y unida a E2F, bloqueando la actividad de este factor de transcripción, y el ciclo celular se detiene en G1. Esto da a la célula tiempo para reparar el DNA antes de entrar a la fase S, evitando así la transferencia potencialmente desastrosa de un genoma defectuoso a una o a las dos células hijas. (Fig. 3)

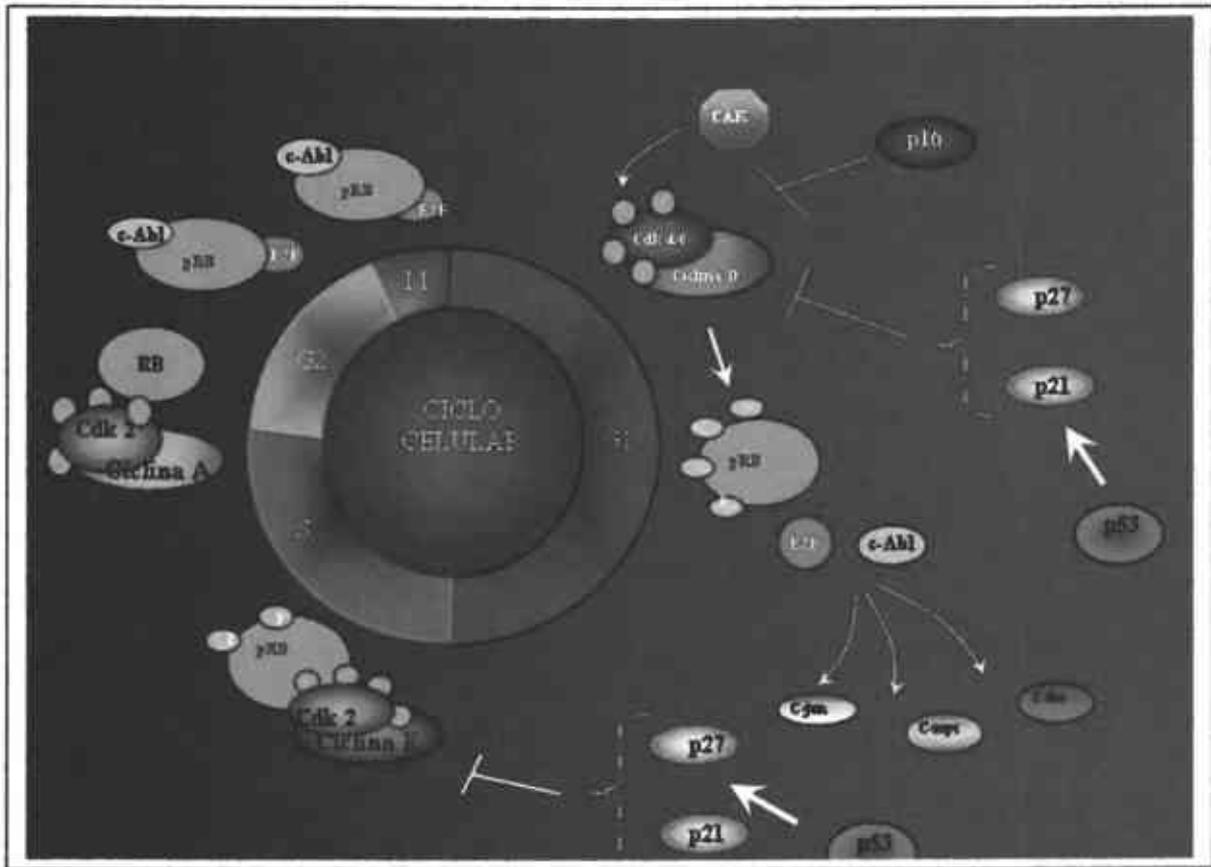


Fig. 3 Función de la pRB110 en el ciclo celular. La unión de la pRB110 al factor E2F está regulada durante el ciclo celular por procesos de fosforilación y desfosforilación. La forma desfosforilada se une a E2F mientras que la forma fosforilada no puede hacerlo.

(Hollingworth Robert E 1993, Lewin Benjamin 2004)

1.3.1 Genética molecular del gen RB

El gen RB1 se localiza en la banda 14 del brazo largo del cromosoma 13 (Figura 4), tiene una longitud de 27 exones, se transcribe en un mRNA de 4.7 kb que codifica para una fosfoproteína nuclear de 928 aminoácidos con un peso molecular de 110 kd (pRB110). (Fig. 5).

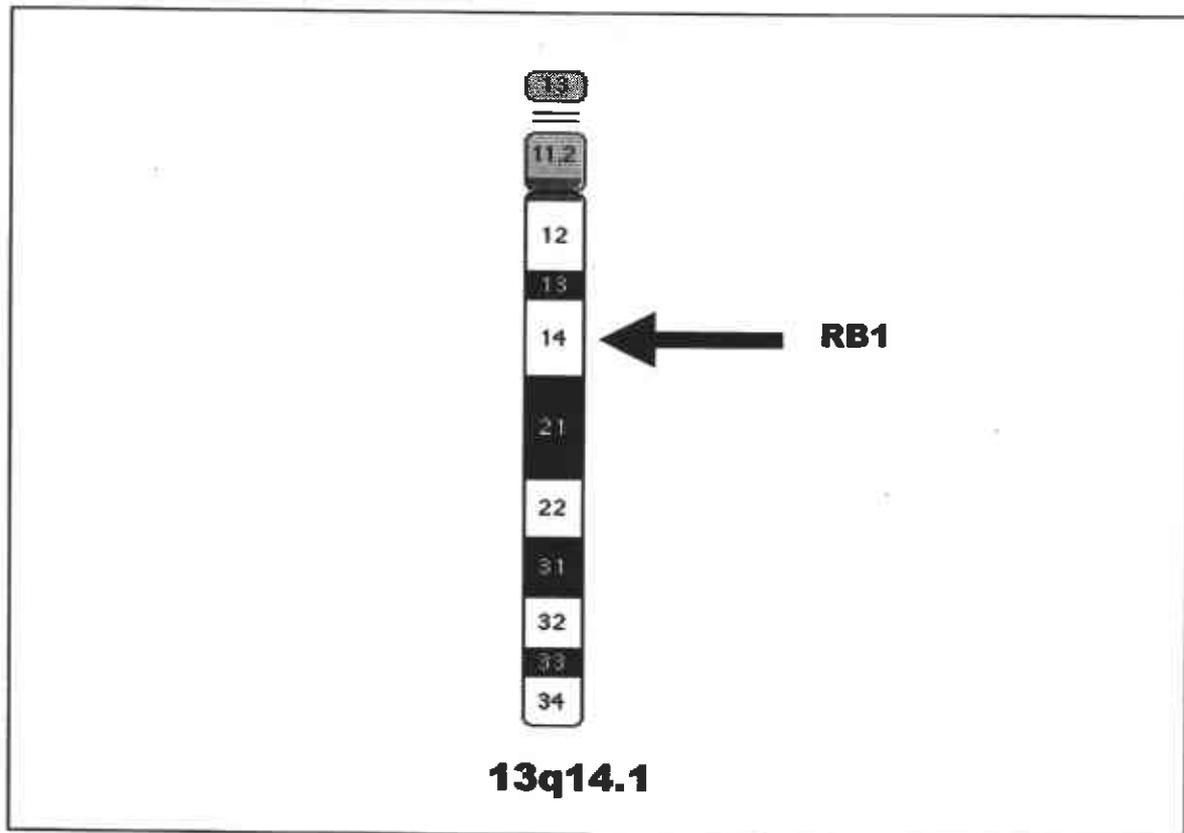


Fig. 4 Esquema del cromosoma 13 con la técnica de las bandas G. La flecha indica el locus del gen RB1 en la región cromosómica 13q14.1

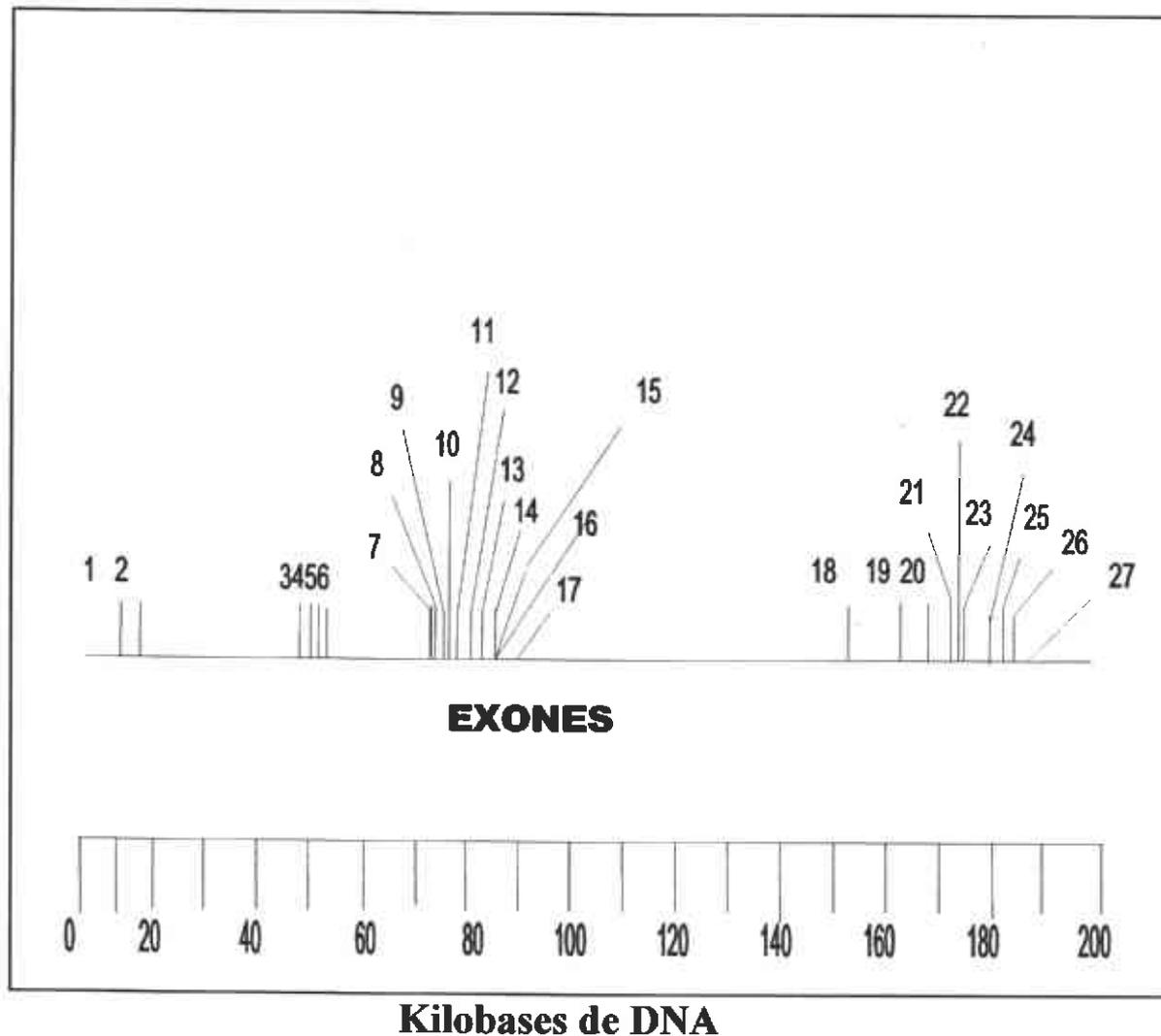


Fig. 5 Mapa del gen de retinoblastoma humano. Los 27 exones codifican para un mRNA de 4.7 Kb.

(Yandell D; Dryja T 1989)

1.3.2 Función de la proteína pRB en el ciclo celular

Como se mencionó anteriormente, esta fosfoproteína se une de manera específica al factor de transcripción E2F1 inhibiendo la progresión del ciclo celular, dicha actividad es controlada por procesos de fosforilación y desfosforilación dependiente de protein cinasas. La pRB110 está constituida por tres dominios, A, B y C (Fig.6), los dos primeros están conservados entre las diferentes especies y son necesarios para formar la unidad represora de pRB110, sin embargo esta unidad represora también es capaz de unirse a oncoproteínas de tipo viral como E1A de adenovirus, antígeno T del virus SV40 y E7 del virus del papiloma humano (VPH) de "alto riesgo". Las oncoproteínas virales E6 y E7 del VPH de alto riesgo frecuentemente están asociadas con lesiones que pueden progresar a carcinoma. (Fig. 7).

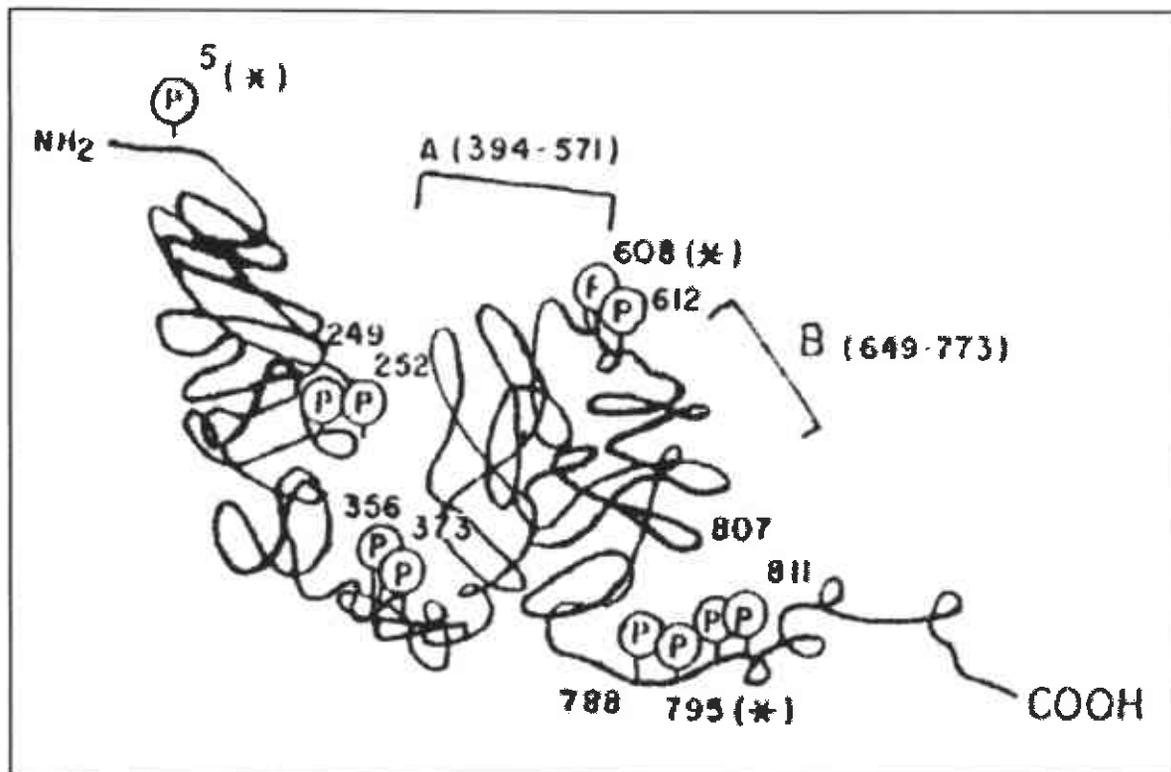


Fig. 6 Estructura de la proteína pRB110, se pueden observar los dos dominios funcionales (A, B) y los posible sitios de fosforilación en los aminoácidos.

(Hollingsworth 1993).

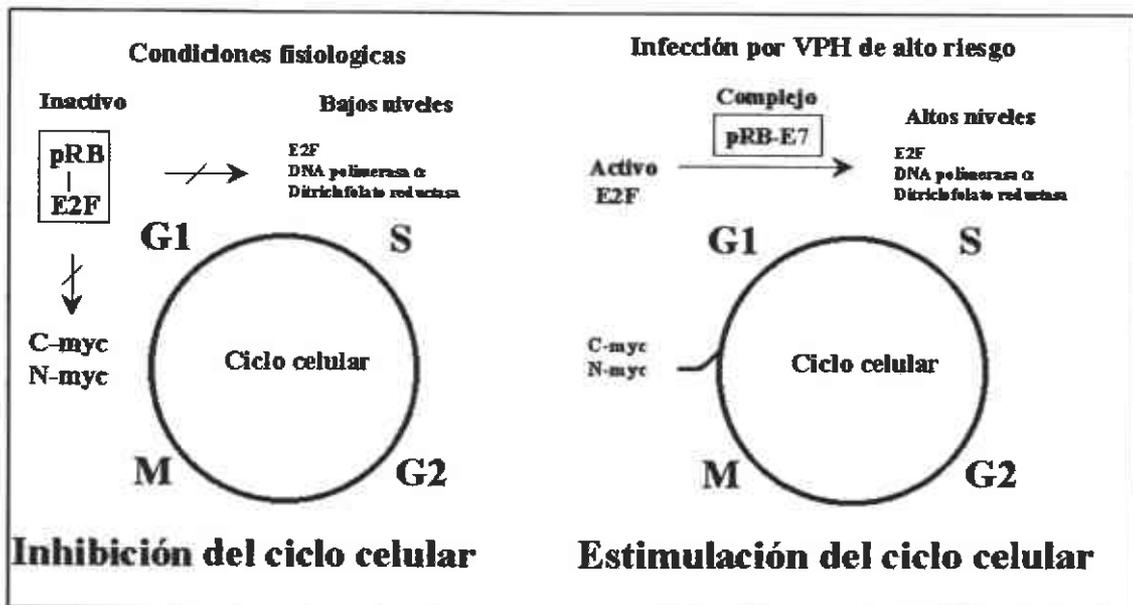


Fig. 7 Mecanismo de inactivación de la proteína pRB110 por la oncoproteína E7 del VPH.

1.4 Oncogenes, genes supresores y muerte celular programada.

Los tumores son el resultado de una división celular no controlada; normalmente, la división celular se regula mediante una familia de factores de crecimiento extracelulares, proteínas que provocan la división de las células latentes y en algunos casos, la diferenciación. Algunos factores de crecimiento estimulan solo la división de las células que contienen receptores apropiados, otros tienen un efecto más general. Los defectos en la síntesis, regulación o reconocimiento de los factores de crecimiento pueden originar un proceso neoplásico.

Los oncogenes son formas mutadas de genes de proteínas que regulan el ciclo celular y fueron originalmente descubiertas en virus asociados al desarrollo de neoplasias, más tarde se vio que eran muy similares o que procedían de genes presentes en las células huésped del animal llamadas proto-oncogenes, los cuales codifican proteínas reguladoras del crecimiento. Durante las infecciones virales, la secuencia de DNA de un proto-oncogen se copia a veces por el virus y se

incorpora en su genoma y en algún punto durante el ciclo de la infección viral el gen puede convertirse en defectuoso por una mutación. Cuando este oncogén viral se expresa en su célula huésped durante una infección posterior, el producto proteico anormal interfiere con la regulación normal del crecimiento celular, dando lugar a veces al desarrollo de una neoplasia. [3]

Los proto-oncogenes pueden convertirse en oncogenes sin necesidad de un intermediario viral. Reordenamientos cromosómicos, agentes químicos y radiación, son entre otros, factores que pueden producir mutaciones oncogénicas. Las mutaciones que producen oncogenes son genéticamente dominantes; si alguno de los cromosomas del par contiene un gen defectuoso, este producto genético envía la señal de "división" y se origina el tumor. El defecto oncogénico puede hallarse en cualquiera de las proteínas que intervienen en la comunicación de la señal de "división". Se conocen oncogenes que codifican proteínas de secreción, factores de crecimiento, proteínas transmembranales (receptores), proteínas citoplasmáticas (proteínas G y proteín-quinasas) y factores nucleares de transcripción que controlan la expresión de genes esenciales para la división celular (Fos, Jun, Myc, etc). Algunos oncogenes codifican receptores de superficie con sitios de unión de señal defectuosos o ausente, de manera que no hay modulación de la actividad tirosin-quinasa. (Tabla 2).

Los defectos en los genes supresores tumorales, eliminan restricciones normales de la división celular, ya que los genes supresores codifican proteínas que normalmente restringen este proceso y la mutaciones en uno o varios genes pueden dar lugar a la formación de tumores. (Tabla 3). El crecimiento incontrolado, provocado por genes supresores defectuosos es, a diferencia de los oncogenes, genéticamente recesivo, así, los tumores se formaran sólo si los dos cromosomas del par contienen el gen defectuoso. Una persona que hereda una copia correcta y otra defectuosa no padecerá la enfermedad, pero cada célula del cuerpo de esta persona contendrá una copia defectuosa del gen, así, si alguna de esas 10^{12} células somáticas sufre después una mutación en la copia normal, puede generarse un tumor a partir de esa célula doble mutante (Tabla 4). Mutaciones en ambas copias de los genes pRB, p53 o p21 producen células en las que las

restricciones sobre la división celular están ausentes, con lo que se forma un tumor (ley de Knudson o del doble hit) (Fig. 2).

Tabla. 3

| ACTIVACIÓN DE ONCOGENES EN NEOPLASIAS HUMANAS | | | |
|---|--|------------------------------|--|
| GEN | PROPIEDADES DE LA PROTEINA | MECANISMO DE ACTIVACION | TIPO DE TUMOR |
| EGFR | Receptor del factor de crecimiento epidermal | Amplificación | Gliomas, carcinomas |
| NEU | Receptor de factor de crecimiento | Amplificación | Mama, útero y ovario |
| N-MYC | Factor de transcripción | Amplificación | Neuroblastoma, de pulmón de células pequeñas |
| L-MYC | Factor de transcripción | Amplificación | pulmón de células pequeñas |
| MDM2 | Proteína de unión a p53 | Amplificación | Sarcomas |
| GLI | Factor de transcripción | Amplificación | Sarcomas, gliomas |
| CDK4 | Cinasa dependiente de ciclinas | Amplificación | Sarcomas, gliomas |
| CYCD1 | Ciclina D1 | Amplificación, Translocación | Mama, linfoma cel.B |
| K-RAS | p21 GTPasa | Mutación puntual | Pulmón, pancreático, colorectal, leucemia |
| N-RAS | p21 GTPasa | Mutación puntual | Leucemia mieloide |
| H-RAS | p21 GTPasa | Mutación puntual | Cáncer de vejiga |
| RET | Receptor tirosina cinasa | Mutación puntual | Tiroides papilar |
| MYC | Factor de transcripción | Translocación, amplificación | Linf. Burkitt, pulmón células pequeñas |
| BCL2 | Oncoproteína anti-apoptosis | Translocación | Linfoma folicular |

Tabla. 4

| GENES SUPRESORES INVOLUCRADOS EN TUMORES HUMANOS | | | | | |
|--|----------|------------------------------------|---|--------------------------------|-------------------------------------|
| GEN | LÓCUS | LOCALIZACIÓN / FUNCIÓN | MUTACIONES | SÍNDROME | NEOPLASIA HEREDITARIA |
| RB1 | 13q14 | Núcleo/regulador transcripcional | Delecciones y enzimática | Retinoblastoma | Retinoblastoma, Osteosarcoma |
| P53 | 17p13.1 | Núcleo/regulador transcripcional | Sentido erróneo | Li-Fraumeni | Mama y de corteza adrenal, sarcomas |
| APC | 5q21 | Citoplasma/transducción de señales | Delecciones, codones de terminación | Poliposis familiar adenomatosa | Colon, tiroides y estómago |
| MCC | 5q21 | Citoplasma/transducción de señales | Mutaciones puntuales | Carcinoma colorectal | No se conoce |
| DCC | 18q | Membrana/transducción de señales | Delecciones, inserciones y mutaciones puntuales | Carcinoma colorectal | No se conoce |
| WT1 | 11p13 | Núcleo/factor de transcripción | Sentido erróneo | Tumor de Wilms | Wilms |
| NF1 | 17q11 | Citoplasma/inhibidor de GTPasa | Delecciones, mutaciones puntuales | Neurofibromatosis tipo I | Neurales |
| BRCA1 | 17q21 | Núcleo/replicación de ADN | Delecciones, codones de terminación | Cáncer de mama/ovario familiar | Mama y ovario |
| BRCA2 | 13q12-13 | Núcleo/replicación de ADN | Delecciones, codones de terminación | Cáncer de mama/ovario familiar | Mama y ovario |

Tabla. 5

| DIFERENCIAS ENTRE ONCOGENES Y GENES SUPRESORES | | |
|--|--|--|
| | ONCOGENES | GENES SUPRESORES |
| TIPO DE MUTACIÓN | TRANSLOCACIONES PUNTALES AMPLIFICACIONES | TRANSLOCACIONES PUNTALES DELECCIONES |
| EXPRESIÓN CELULAR | SOBRE-EXPRESIÓN DOMINANTE | PÉRDIDA DE FUNCIÓN RECESIVO |
| CÉLULAS AFECTADAS | SOMÁTICAS | SOMÁTICAS GERMINALES |
| GÉNESIS | ADQUIRIDA | ADQUIRIDA HEREDADA |

El retinoblastoma es un tumor de la retina que afecta a niños con los dos alelos RB defectuosos. Los niños de muy corta edad que desarrollan retinoblastoma presentan normalmente múltiples tumores en ambos ojos. Cada tumor es consecuencia de una sola célula que ha sufrido una mutación en una de las copias normales del gen RB (un feto con los dos alelos mutados en todas las células no es viable). Los pacientes con retinoblastoma, tienen también una alta incidencia de desarrollo de otras neoplasmas principalmente de pulmón, próstata o mama. Un hecho menos frecuente, es que una persona que nazca con dos copias normales de un gen, sufra dos mutaciones independientes del mismo gen en la misma célula, pero puede llegar a ocurrir. Algunos individuos desarrollan retinoblastoma al final de la infancia, normalmente con un único tumor en un solo ojo, estos individuos probablemente nacieron con dos copias normales de RB en cada célula, pero han sufrido mutaciones en ambos genes RB en una sola célula de la retina, lo que provoca un tumor. (Fig. 2).

Las mutaciones en el gen p53, también causan tumores; en más del 90% de los carcinomas cutáneos de células escamosas en humanos (cáncer de piel) y en aproximadamente un 50% del resto de las neoplasias, p53 es defectuoso. Algunos individuos, que heredan una copia defectuosa de p53 normalmente presentan el síndrome de Li-Fraumeni, que da lugar a múltiples neoplasias (de mama, cerebro, huesos, sangre, pulmón y piel) a temprana edad con una frecuencia muy alta. La explicación para estos tumores múltiples en este caso es igual que para las mutaciones de RB; un individuo que nace con una copia defectuosa de p53 en cada célula somática es probable que sufra una segunda mutación de p53 en más de una célula en su vida.

El efecto de las mutaciones en oncogenes y genes supresores tumorales, no es de todo o nada. En algunos tumores o quizá en todos, la progresión desde una célula normal a un tumor maligno implica la acumulación de mutaciones (a veces durante varias décadas), ninguna de las cuales es responsable del efecto final.

La apoptosis es el suicidio celular programado, en el cual las células pueden controlar con precisión el tiempo de su propia muerte. En el desarrollo de un embrión por ejemplo, algunas células deben morir, para poder construir el

cuerpo adulto. La apoptosis, cumple también algunas misiones en otros procesos además del desarrollo. Cuando una célula productora de anticuerpos produce anticuerpos contra un antígeno presente en el cuerpo, esa célula experimenta una muerte programada en el Timo (este mecanismo es esencial para la eliminación de anticuerpos contra sí mismo). Algunas veces el suicidio celular, no está programado, sino que tiene lugar en respuesta a circunstancias biológicas que amenazan al resto del organismo, como en las células infectadas por un virus que muere antes de completar el ciclo infeccioso, impidiendo la propagación del virus a células vecinas, también varias situaciones de estrés severo, como calor, hiperosmolaridad, luz UV y radiación gamma, desencadenan el suicidio celular, ya que seguramente el organismo se encontrará mejor sin esas células vivas y defectuosas. [4]

Los mecanismos de regulación que desencadenan la apoptosis, algunas veces son controladas por las mismas proteínas que regulan el ciclo celular. La señal de suicidio a menudo proviene del exterior, a través de un receptor de superficie. Algunas de estas proteínas son: a) El factor de necrosis tumoral (TNF), producidas por células del sistema inmune, interactúan con las células a través de receptores específicos de TNF. Estos receptores tienen sitios de unión de TNF en la cara externa de la membrana plasmática y un "dominio de muerte" de aproximadamente 80 residuos de aminoácidos, que pasan la señal de autodestrucción a través de la membrana a proteínas del citoplasma, tales como TRADD (dominio de muerte asociado al receptor del TNF). B) Fas tiene un dominio de muerte similar que le permite interactuar con la proteína citoplásmica FADD (dominio de muerte asociado a Fas), que activa una proteasa citosólica llamada caspasa 8, esta enzima pertenece a una familia de proteasas implicadas en la apoptosis, todas son sintetizadas como proenzimas inactivas, todas tienen un residuo Cys crítico en el sitio activo y todas hidrolizan sus proteínas blanco en el lado carboxilo-terminal de residuos de Asp específicos. Cuando la caspasa 8, "iniciadora", se activa por una señal apoptótica procedente de FADD, se autoactiva por escisión de su propia forma proenzimática. La mitocondria es uno de los blancos de la caspasa 8 activa, que da lugar a la liberación de ciertas proteínas

localizadas entre las membranas mitocondriales interna y externa (citocromo C y varias caspasas "efectoras"). El citocromo C se une a la forma proenzimática de las caspasas efectoras y estimula su propia activación proteolítica por la caspasa 8 y las caspasas efectoras activadas a su vez catalizan la destrucción total de las proteínas celulares, lo cual es una de las principales causas de muerte celular apoptótica. Uno de los blancos específicos de la acción de las caspasas es la DNasa activada por caspasas.

Los productos monoméricos de la degradación del DNA y de las proteínas, se liberan en un proceso controlado que les permite ser captados y reutilizados por células vecinas. De este modo la apoptosis permite al organismo eliminar una célula sin desperdiciar sus componentes. ^[4]

CAPITULO III

DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOHISTOQUÍMICA

La inmunohistoquímica (IHQ), tiene aproximadamente 55 años, pero en la actualidad en muchos lugares aún es considerada como una tecnología nueva. En los últimos 15 años su utilidad para el diagnóstico de procesos neoplásicos se incrementó ya que por medio de la IHQ se puede determinar el sitio de origen y la identidad del tumor en un 95% de los casos.

El patólogo, es siempre el responsable del diagnóstico final de estas neoplasias y dependiendo de este se establecerá el tratamiento a seguir. Algunas veces la historia clínica ayuda a tomar una decisión para determinar si la lesión es maligna o benigna, o bien para diferenciar si se trata de una neoplasia de tipo epitelial, mesenquimatoso o hematopoyético en esos casos el diagnóstico es sencillo, pero en otros casos es difícil ya que el 5% de las neoplasias son clasificadas como poco diferenciadas, clasificación basada principalmente en la tinción histológica de rutina, hematoxilina-eosina (HE), y este 5% variará dependiendo de la calidad de la tinción y de la interpretación-experiencia del patólogo. Durante la década de los 70's y 80's, el microscopio electrónico de transmisión fue la técnica de moda para la clasificación de las neoplasias no diferenciadas, pero el alto costo y los tiempos prolongados para obtener los resultados impidieron muchas veces su aplicación. A partir de los 90's, y hasta la fecha la IHQ ha sido la herramienta más útil para el diagnóstico diferencial de neoplasias poco diferenciadas.

Para poder llevar acabo la IHQ en la actualidad existen diferentes métodos directos e indirectos, la mayoría de ellos utiliza el sistema Biotina-Avidina, Biotina-Estreptavidina, ó sistemas libres de Biotina; en ambos casos lo fundamental de la IHQ son los anticuerpos primarios, así que comenzaremos por dar una breve explicación de estos.

Los anticuerpos son moléculas segregadas por células plasmáticas que se han diferenciado a partir de células B que a su vez recibieron información de células presentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas) que han procesado material extraño al del organismo animal, sin embargo la obtención de

estos anticuerpos también se puede realizar *in vitro*. Por mencionar un ejemplo, supongamos que inoculamos un antígeno a un organismo animal, las células presentadoras de antígenos lo reconocerían inmediatamente como una sustancia extraña, la célula fragmentará el antígeno en diferentes tamaños de péptidos y en un nódulo linfático lo expondrá a los linfocitos B y T, los cuales al ser estimulados producirán anticuerpos y células citotóxicas. Los anticuerpos generados en esta etapa son policlonales, ya que son segregados por diferentes linfocitos B y reconocen diferentes epítopes del antígeno, los linfocitos B sufren un proceso de diferenciación, replicación y multiplicación (clona) al término del cual, estos producen anticuerpos específicos contra un epítipo, de esta manera se generan los anticuerpos monoclonales, estos, obtenidos *in vitro* son útiles en técnicas inmunológicas para el diagnóstico, como: inmunoprecipitación inmunofluorescencia, Western Blot e inmunohistoquímica (IHQ), a esta última, a partir de este momento llamaremos inmunoperóxidasa o inmunofosfatasa. Para poder visualizar los anticuerpos en esta técnica, es necesario llevar a cabo una reacción química colorimétrica, en otras palabras, los dos objetivos fundamentales de la IHQ son: a) Detectar e identificar los epítipes en el tejido, b) Hacer visible la reacción epítipo/anticuerpo.

Existen métodos directos e indirectos para poder alcanzar estos objetivos, los primeros se basan en el marcaje del anticuerpo primario con fluoresceína o una enzima, mientras que los métodos indirectos se apoyan en un segundo anticuerpo que reconozca al primario, este segundo anticuerpo debe de ser generado en otra especie diferente de donde se genero el anticuerpo primario, posteriormente es necesario la participación de una enzima (peroxidasa ó fosfatasa alcalina) la que en presencia del sustrato específico permite la oxidación del cromógeno (colorante) que se puede visualizar en el microscopio de luz.

De los métodos actuales para la detección de los determinantes antigénicos por la técnica de IHQ, los más comunes son los siguientes:

- a) Directa. Anticuerpo primario marcado con fluoresceína, o con una enzima (peroxidasa o fosfatasa).

- b) Indirecta. Anticuerpo primario que posteriormente es reconocido por un anticuerpo secundario (creado en diferente especie) ligado con peroxidasa ó fosfatasa y posteriormente revelado con un colorante (substrato).
- c) Indirecta Peroxidasa-anti-peroxidasa (PAP). Anticuerpo primario que posteriormente es reconocido por un anticuerpo secundario que actúa como puente para el complejo PAP y posteriormente revelado con colorante (substrato). En este sistema el anticuerpo secundario es creado en diferente especie que el anticuerpo primario y el complejo PAP.
- d) Indirecta Avidina-Biotina (ABC). Anticuerpo primario que posteriormente es reconocido por un anticuerpo secundario químicamente unido con Biotina, que actúa como puente para la unión del complejo Avidina-peróxidasa y revelado posteriormente con colorante; la enzima en presencia de peróxido de Hidrógeno lleva a cabo un proceso de oxidación del colorante y esta reacción final es la que entonces es visualizada.
- e) Indirecta Estreptavidina-Biotina LSAB+ (*labelled Streptavidin-Biotin*). Esta técnica es idéntica a la anterior, la única diferencia radica en el complejo, ya que en esta, el lugar de ser Avidina, utilizamos Estreptavidina que tiene mucha mayor afinidad por la Biotina y por lo tanto la reacción es más estable a pequeños cambios de pH. (Fig. 8)

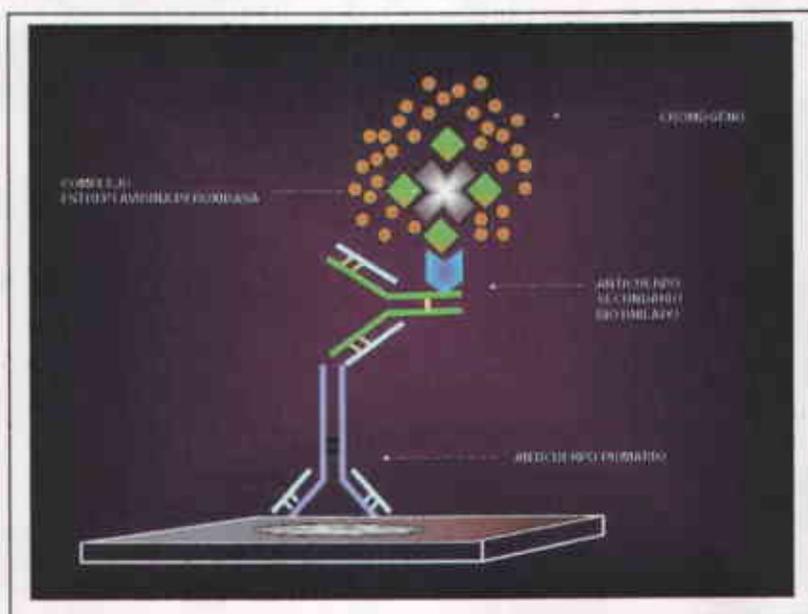


Fig.8 Sistema LSAB+

La tecnología desarrollada en IHQ, actualmente permite detectar menos de 100 copias de proteínas por célula; esta sensibilidad esta revolucionando los patrones de referencia establecidos para aquellos determinantes antigénicos que hasta ahora no se podían demostrar por los métodos anteriormente mencionados. Los sistemas de detección más sensibles en IHQ son los siguientes:

- a) Sistema de Amplificación de la Señal Catalizada CSA (*Catalized Signal Amplification*). Esta tecnología tiene como fundamento el sistema de Estreptavidina-Biotina, la gran diferencia radica en el conjugado Tiramida-Biotina que es añadido después del complejo estreptavidina-biotina (biotina en lugar de peroxidasa), es decir este primer complejo funciona como un segundo puente, ya que permite la unión de (n)moléculas del conjugado Tiramida-Biotina, y la posterior unión en misma cantidad de (n)moléculas del complejo estreptavidina-peroxidasa y la subsecuente oxidación del colorante en presencia de peróxido de Hidrógeno para su visualización. (Fig. 9)

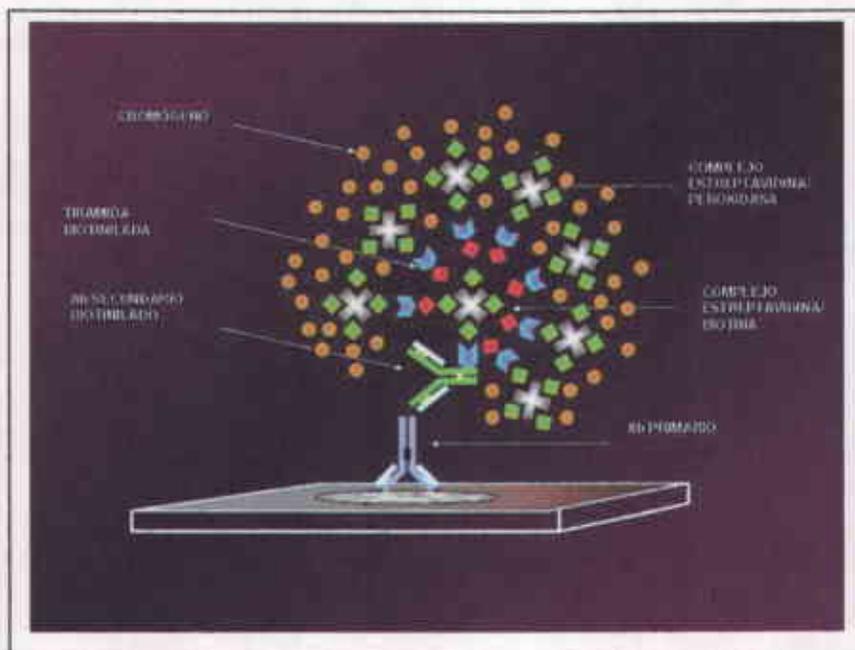


Fig.9 Sistema de Amplificación de la Señal

b) Sistema libre de biotina EPOS (*Enhanced Polymer One Step*). Este sistema no utiliza la biotina como una herramienta para el puente entre el anticuerpo primario y el complejo estreptavidina-peroxidasa, sino más bien, se fundamenta en la unión de (n) moléculas de peroxidasa y de anticuerpo secundario a un polímero, este conjugado anticuerpo secundario-peroxidasa-polímero permite llevar a cabo la reacción de IHQ en un solo paso y la visualización de la reacción se realiza por la oxidación del colorante en presencia de peróxido de Hidrógeno.(Fig. 10).

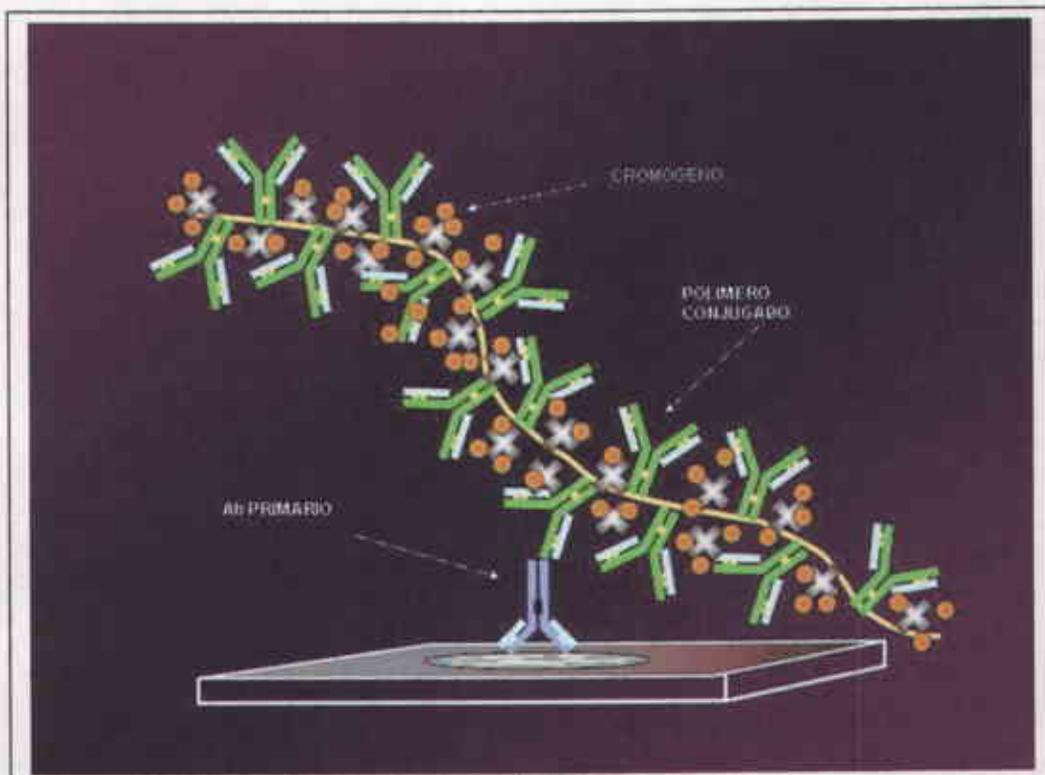


Fig.10 Sistema Libre de Biotina (EPOS)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad la detección de proteínas tiene una gran importancia en el diagnóstico e investigación de la génesis del cáncer, por tal motivo, la detección de la expresión de las mismas *"in situ"* es de vital importancia en el diagnóstico y tratamiento del paciente, sin embargo esta detección no es la misma dependiendo de la técnica empleada; la detección de proteínas por la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) hasta hace poco tiempo tenía una sensibilidad inferior a la técnica de Western Blot, sin embargo a diferencia de esta última, la IHQ sigue teniendo la ventaja que la interpretación de la expresión de las proteínas se realiza *"in situ"* del material que se desea analizar lo que facilita la interpretación de los resultados, por esta razón, en la actualidad la IHQ es una herramienta imprescindible en un Departamento de Patología para realizar el diagnóstico diferencial de procesos neoplásicos poco diferenciados. Gracias a los avances tecnológicos, la sensibilidad de la técnica actualmente es igual que la técnica de hibridación *in situ*, por esta razón la detección de proteínas con un nivel de expresión muy pequeño o que tienen una vida media muy corta pueden ser detectadas sobre el tejido a analizar, algunas proteínas que tienen estas características son las que participan en la regulación del ciclo celular, por tal motivo en este trabajo se correlacionará la expresión de algunas de ellas por diferentes métodos de inmunodetección, en diferentes tejidos para su posterior aplicación en tejidos neoplásicos, y finalmente en el diagnóstico y pronóstico de tumores de los pacientes del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Pediatría.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión de proteínas del ciclo celular en diferentes cortes histológicos de tejidos fijados en formaldehído/embebidos en parafina del laboratorio del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Pediatría.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar la técnica de inmunohistoquímica con los métodos: Estreptavidina-Biotina (LSAB+), Amplificación de la Señal Catalizada (CSA) y Sistema Libre de Biotina (EPOS), en los siguientes tejidos: cérvix, papiloma laringeo, amígdala, apéndice y adenocarcinoma.
- Detectar la expresión de las proteínas C-fos, C-jun, E2F, Ki-67, p53 y pRB110 en los tejidos antes mencionados.

HIPÓTESIS

Si la expresión de las proteínas del ciclo celular en los diferentes tejidos a analizar tienen un nivel de expresión bajo, entonces la detección de las mismas mediante los diferentes métodos de inmunodetección será diferente.

ESTRATEGIA GENERAL

Se realizaron cortes histológicos a 2 μm de los diferentes tejidos embebidos en parafina para estandarizar la detección por inmunohistoquímica la expresión de las proteínas: C-fos, C-jun, E2F, Ki-67, p53 y pRB110 con anticuerpos mono y policlonales comerciales utilizando diferentes métodos de inmunodetección: Sistema Estreptavidina-Biotina (LSAB+), Sistema de amplificación de la señal

(CSA) y Sistema libre de Biotina (EPOS), se utilizaron los siguientes tejidos para la estandarización: cervix, papiloma laríngeo, amígdala, apéndice, adenocarcinoma y otros tumores para de esta manera utilizar aquellos en los cuales la inmunodetección fue apropiada y específica para c/u de los anticuerpos utilizados y así emplearlos como controles positivos en el análisis de expresión de las proteínas en estudios posteriores. Se incluyeron en este trabajo 20 bloques de parafina de pacientes con diagnóstico clínico e histopatológico de Retinoblastoma que acudieron al Instituto Nacional de Pediatría de los años de 1999 al 2001, a los cuales ya se les había realizado la prueba de inmunohistoquímica con un sistema de detección avidina-biotina, pero que los resultados obtenidos no cumplían con la calidad suficiente para su interpretación. Los bloques en parafina de los pacientes se seleccionaron considerando que tenían suficiente material para analizar.

METODOLOGÍA

Detección de proteínas por el método LSAB+ (*labelled Streptavidin-Biotin*)

Para la técnica de inmunohistoquímica, las piezas quirúrgicas fueron fijadas en formaldehído al 10% amortiguado con fosfatos e incluidas en parafina. Se realizaron cortes a 3 y 2 μ m, los cuales fueron utilizados para el diagnóstico histopatológico con hematoxilina-Eosina (H&E) y para la inmunotinción respectivamente.

Se realizó la inmunodetección de las proteínas con el complejo biotina-estreptavidina/peroxidasa, mediante el sistema de detección LSAB+ (Labelled streptavidin-Biotin, Dako Corporation, Carpintería Calif. USA). Se empleó un buffer a base de Citrato de Sodio al 0.1 M, pH 6.2 (Target Dako Corporation, Carpintería Calif. USA) para el desenmascaramiento de epítopes, para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena, las muestras fueron tratadas con peróxido de Hidrógeno al 0.9% en medio acuoso por 5 minutos, para eliminar los sitios de

unión inespecíficos las muestras fueron tratadas con Albúmina Sérica Bovina al 1% en PBS por 5 minutos, posteriormente las muestras se incubaron por 45 minutos con los respectivos anticuerpos: C-fos (Policlonal de conejo, cat. PU348-UP), C-jun (Clona c-jun88, cat. AM349-5M), ambos de Biogenex Calif. USA, E2F 1 (Clona KH95, cat. sc-251, Santa Cruz Biotechnology), Ki-67 (Clona MIB-1, cat. M7240), p53 (Clona DO-7, cat. M7001) y pRB110 (Clona Rb1, cat. m7131), estos últimos de Dako Cymation, Carpintería Calif. USA. Las muestras fueron incubadas con el anticuerpo biotinilado (anti-ratón/anti-conejo) y con el complejo estreptavidina/peroxidasa por 30 minutos c/u, para visualizar la reacción se utilizó como sustrato 3,3'-diaminobencidina-H₂O₂ (Dako Cymation, Carpintería Calif. USA). Se utilizaron los siguientes tejidos para la detección de: Papiloma laringeo (C-fos, C-jun y E2F1), Osteosarcoma (p53 y pRB110) y amígdala para Ki-67, además se incluyeron las 20 muestras (bloques de parafina) de los pacientes con diagnóstico de retinoblastoma, como control negativo suero normal de ratón en PBS, que se agrega en lugar del anticuerpo primario. Toda la pieza quirúrgica fue analizada por IHQ.

Detección de proteínas por el método CSA (Catalyzed Signal Amplification)

Los cortes histológicos de las muestras fueron tratadas igual que con el sistema anterior hasta el paso de la incubación con el anticuerpo secundario biotinilado, después de este paso las muestras fueron incubadas con el complejo estreptavidina/biotina, posteriormente con el conjugado tiramida/biotina, continuando con el complejo estreptavidina/peroxidasa por 30 minutos c/u (CSA HRP, cat. K15001 Dako Cymation, Carpintería Calif. USA), para visualizar la reacción se utilizó como sustrato 3,3'-diaminobencidina-H₂O₂ (Dako Corporation, Carpintería Calif. USA), empleando los mismos tejidos y control negativo que en el sistema anterior.

Detección de proteínas por el método EPOS (Enhanced Polymer One Step)

Los cortes histológicos de las muestras fueron tratadas igual que con el sistema LSAB+ hasta el paso de la incubación con el anticuerpo primario, después de este paso se incubaron con el polímero conjugado con el anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo por 20 minutos (EnVision+ System Labelled Polymer-HRP, cat. K4001 y K4003, Dako Cymation, Carpintería Calif. USA), para visualizar la reacción se utilizó como sustrato 3,3'-diaminobencidina-H₂O₂ (Dako Corporation, Carpintería Calif. USA), empleando los mismos tejidos y control negativo que en el sistema LSAB+.

RESULTADOS

Teniendo como antecedentes que los diferentes métodos de detección de proteínas en cortes histológicos de tejidos fijados en formaldehído/embebidos en parafina tienen diferente sensibilidad, se estandarizó la detección de proteínas del ciclo celular por la técnica de IHQ con los diferentes métodos de detección (LSAB+, CSA y EPOS) en diferentes tejidos con el propósito de evaluar la sensibilidad de cada uno de ellos, para de esta manera utilizar el más adecuado en la inmunodetección de las proteínas C-fos, C-jun, E2F1, Ki-67, p53 y pRB110 en tejidos neoplásicos (empleando en este trabajo como modelo el retinoblastoma) (Tabla 5).

La valoración de la inmunexpresión de las proteínas se realizó de acuerdo a la intensidad de la coloración con DAB asignando la escala siguiente: (-) cero expresión, (+) poca, (++) media, y (+++) alta expresión de acuerdo a los parámetros establecidos en el Departamento de Patología del Instituto, se tomó como referencia positiva, aquellos en los cuales la inmunexpresión fue de (++) y (+++) en cada uno de los métodos utilizados.

Por el método LSAB+ es posible detectar la mayoría de las proteínas en los cortes histológicos, pero se observó que tiene una sensibilidad limitada para

Detección de proteínas por el método EPOS (Enhanced Polymer One Step)

Los cortes histológicos de las muestras fueron tratadas igual que con el sistema LSAB+ hasta el paso de la incubación con el anticuerpo primario, después de este paso se incubaron con el polímero conjugado con el anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo por 20 minutos (EnVision+ System Labelled Polymer-HRP, cat. K4001 y K4003, Dako Cymation, Carpintería Calif. USA), para visualizar la reacción se utilizó como sustrato 3,3'-diaminobencidina-H₂O₂ (Dako Corporation, Carpintería Calif. USA), empleando los mismos tejidos y control negativo que en el sistema LSAB+.

RESULTADOS

Teniendo como antecedentes que los diferentes métodos de detección de proteínas en cortes histológicos de tejidos fijados en formaldehído/embebidos en parafina tienen diferente sensibilidad, se estandarizó la detección de proteínas del ciclo celular por la técnica de IHQ con los diferentes métodos de detección (LSAB+, CSA y EPOS) en diferentes tejidos con el propósito de evaluar la sensibilidad de cada uno de ellos, para de esta manera utilizar el más adecuado en la inmunodetección de las proteínas C-fos, C-jun, E2F1, Ki-67, p53 y pRB110 en tejidos neoplásicos (empleando en este trabajo como modelo el retinoblastoma) (Tabla 5).

La valoración de la inmunexpresión de las proteínas se realizó de acuerdo a la intensidad de la coloración con DAB asignando la escala siguiente: (-) cero expresión, (+) poca, (++) media, y (+++) alta expresión de acuerdo a los parámetros establecidos en el Departamento de Patología del Instituto, se tomó como referencia positiva, aquellos en los cuales la inmunexpresión fue de (++) y (+++) en cada uno de los métodos utilizados.

Por el método **LSAB+** es posible detectar la mayoría de las proteínas en los cortes histológicos, pero se observó que tiene una sensibilidad limitada para

las proteínas del ciclo celular, ya que por este método sólo se logro detectar la inmunoexpresión de la proteína Ki-67 en una escala de (++) y (+++) (Figs. 11, 12) y en las proteínas p53 y E2F1 la inmunoexpresión sólo se pudo observar en (+) (Figs. 13, 14, 15, 16) y no fue posible detectar las proteínas C-fos, C-jun ; en el caso de la proteína pRB110, la inmunoexpresión tuvo diferentes patrones de expresión que fueron desde 0 a + en los diferentes tejidos (tabla 5 y 6).



Fig. 11 Ki-67
LSAB 10X

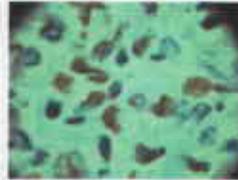


Fig. 12 Ki-67
LSAB 40X



Fig. 13 E2F 10X
LSAB

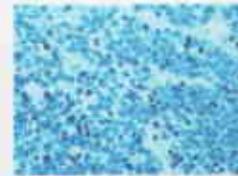


Fig. 14 E2F LSAB
40X



Fig. 15 p-53 LSAB
10X

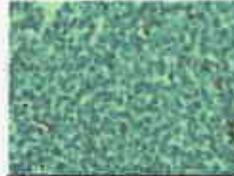


Fig. 16 p-53 LSAB
40X

Por el método **CSA**, fue posible detectar la inmunoexpresión de las proteínas del ciclo celular, Ki-67, pRB110, p53, E2F1, C-fos y C-jun, pero el empleo de este método para la inmunodetección de proteínas tiene sus ventajas y desventajas; para la detección de proteínas nucleares se obtienen excelentes resultados, sin embargo para la detección de proteínas citoplasmáticas ó de membrana se obtienen resultados falsos negativos, la interpretación de los resultados no es adecuada, debido a esto, pueden ser fácilmente mal interpretados por personal con poca experiencia o deficiente capacitación, esta "mala" interpretación se debe a la reacción cruzada de las inmunoglobulinas con

su receptor y al empleo del conjugado tiramida-biotina en este sistema (fotografías no mostradas).

Por el método **EPOS**, también fue posible detectar la inmunoexpresión de las proteínas del ciclo celular, y a diferencia del método CSA con este método no se obtienen falsos negativos en la expresión de las proteínas citoplasmáticas y de membrana, en comparación con el método LSAB+ y CSA con este método se elimina la poca tinción de fondo observada en los métodos antes mencionados, lo que facilita la interpretación de los resultados (Figs. 17, 18, 19, 20, 21, 22).

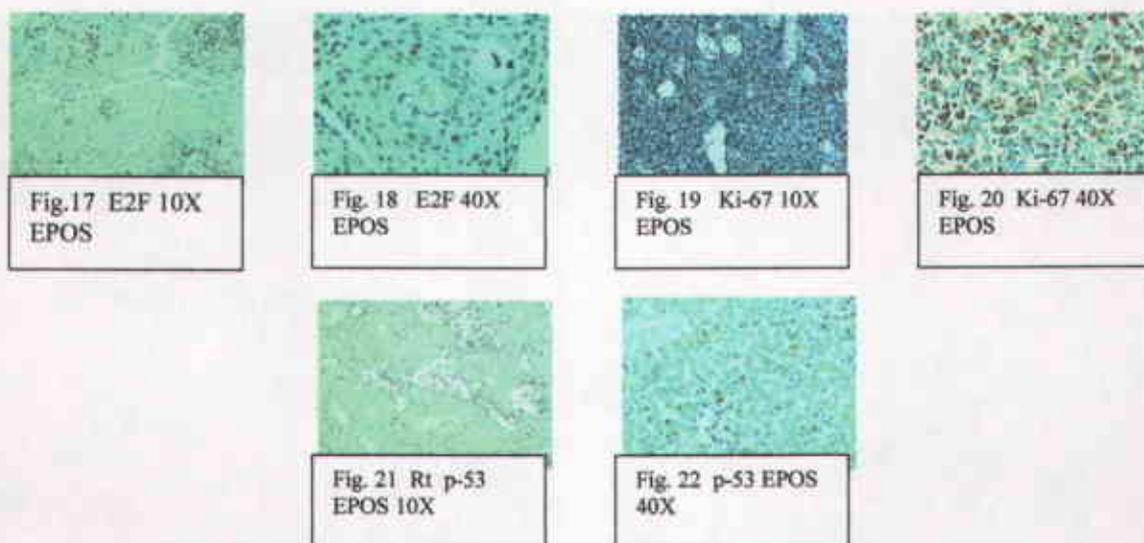


TABLA 6. SENSIBILIDAD DE LOS DIFERENTES SISTEMAS

| | C-fos | C-jun | E2F1 | Ki-67 | p53 | pRB110 |
|--|-------|-------|------|-------|-----|--------|
| LSAB+ Labelled Streptavid-Biotin | - | - | + | +++ | + | - |
| EPOS Enhanced Polymer One Step | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ |
| CSA Catalyzed Signal Amplification | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |

(-) negativo, (+) poca expresión, (++) media expresión, (+++) alta expresión

TABLA 7. REACCIÓN DE LOS SISTEMAS CON DIFERENTES ESPECIES

| | Ratón | Conejo | Rata | Cabra | Cerdo | Cobayo | Gallina de Guinea |
|---|-------|--------|------|-------|-------|--------|-------------------|
| LSAB+ Labelled Streptavidin-Biotin | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ |
| EPOS Enhanced Polymer One Step | √ | √ | | | | | |
| CSA Catalyzed Signal Amplification | √ | √ | | | | | |

DISCUSIÓN

En el caso del sistema de detección LSAB+, no es óptimo para trabajar en modelos experimentales animales ya que por la tecnología empleada en éste, ocasiona tinción de fondo en el tejido analizado debido a las inmunoglobulinas presentes en el tejido y que puede ser interpretada como reacción positiva por personal mal capacitado o con poca experiencia, pero que en realidad esta tinción es una reacción cruzada de los anticuerpos secundarios del sistema LSAB+. (Figs. 23, 24, 25, 26).



Fig. 23 RB
linfocitos CSA
10X tinción
inespecífica



Fig. 24 RB
linfocitos CSA
40X tinción
inespecífica



Fig. 25 RB LSAB
10X tinción
inespecífica.



Fig. 26 RB LSAB
40X tinción
inespecífica.

TABLA 7. REACCIÓN DE LOS SISTEMAS CON DIFERENTES ESPECIES

| | Ratón | Conejo | Rata | Cabra | Cerdo | Cobayo | Gallina de Guinea |
|---|-------|--------|------|-------|-------|--------|-------------------|
| LSAB+ Labelled Streptavidin-Biotin | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ |
| EPOS Enhanced Polymer One Step | √ | √ | | | | | |
| CSA Catalyzed Signal Amplification | √ | √ | | | | | |

DISCUSIÓN

En el caso del sistema de detección LSAB+, no es óptimo para trabajar en modelos experimentales animales ya que por la tecnología empleada en éste, ocasiona tinción de fondo en el tejido analizado debido a las inmunoglobulinas presentes en el tejido y que puede ser interpretada como reacción positiva por personal mal capacitado o con poca experiencia, pero que en realidad esta tinción es una reacción cruzada de los anticuerpos secundarios del sistema LSAB+. (Figs. 23, 24, 25, 26).



Fig. 23 RB
linfocitos CSA
10X tinción
inespecífica



Fig. 24 RB
linfocitos CSA
40X tinción
inespecífica



Fig. 25 RB LSAB
10X tinción
inespecífica.



Fig. 26 RB LSAB
40X tinción
inespecífica.

En el caso de los sistemas CSA y EPOS, ambos pueden ser empleados en modelos experimentales animales siempre y cuando se utilice el complementario al tejido del modelo experimental en cuestión y no sean ratones o conejos.

La estandarización en la detección de la expresión de proteínas del ciclo celular en los diferentes tejidos mediante la técnica de IHQ empleando los diferentes sistemas permitió optimizar los insumos en el departamento de Patología del INP, así como también corroborar de manera indirecta que los sistemas de detección empleados no pueden ser empleados en todos los modelos animales ya que estos generan reacción cruzada, lo que trae como consecuencia una mala interpretación de los resultados como se pudo observar en los experimentos realizados, con estos resultados se cumplió con el objetivo principal planteado en este trabajo.

Teniendo ya estandarizados los diferentes sistemas de detección, se realizó una prueba con muestras 20 pacientes de tejido fijado/embebido en parafina de con diagnóstico clínico e histopatológico de retinoblastoma para la detección de las proteínas E2F, Ki-67, p53 y pRB110, ya que al realizar la detección de estas proteínas con el sistema avidina-biotina no se pudieron detectar ó sólo se observó una inmunoreacción de +, (resultados similares al emplear el sistema LSAB+), sin embargo al emplear los sistemas CSA y EPOS la inmunoreacción se incremento hasta +++ (Fig. 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38) en aquellas muestras donde anteriormente con los sistemas avidina-biotina y LSAB+ sólo se observaba una reacción de +, los casos en los cuales, con estos sistemas no se pudo detectar a la proteína de interés podemos decir que son negativos ó que la concentración de proteína es muy pequeña por lo que no es posible su detección mediante la técnica de inmunohistoquímica, confirmados los resultados esperados, (amplificación de la señal hasta +++), se continuo con la detección de las demás proteínas en el laboratorio de Patología Molecular, actualmente el análisis de la expresión de estas proteínas en los tejidos fijados en formaldehído/embebidos en parafina de pacientes con diagnóstico clínico e histopatológico de retinoblastoma están siendo analizados por personal experto del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Pediatría, cabe aclarar que la interpretación de estos datos para su aplicación en la clínica, no la puede

realizar cualquier profesional que no tenga los conocimientos adecuados en patología, ya que el análisis de la expresión de proteínas sobre cortes histológicos, involucra un trabajo académico muy extenso además de la experiencia profesional, en otras palabras interpretar la IHQ no es sólo "ver si se tiñe o no con los cromógenos empleados", por esta razón el objetivo principal de este trabajo fue la estandarización de los anticuerpos con los diferentes sistemas de detección.



Fig. 27 E2F 10X
EPOS

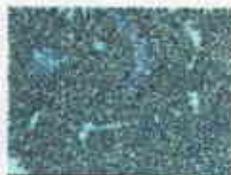


Fig. 28 E2F 10X
CSA

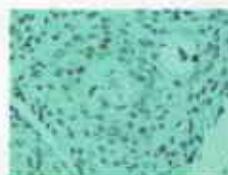


Fig. 29 E2F
EPOS 40X

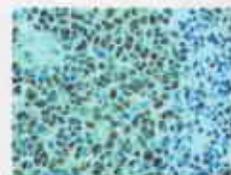


Fig. 30 E2F CSA
40X



Fig. 31 Ki-67
EPOS/HRP/DAB
10X

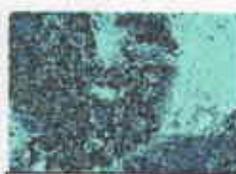


Fig. 32 Ki-67 CSA
10X

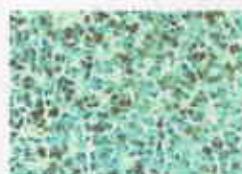


Fig. 33 Ki-67
EPOS 40X

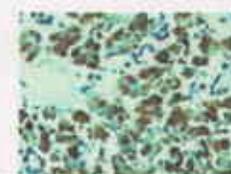


Fig. 34 Ki-67 CSA
40X



Fig. 35 Rt p-53
EPOS 10X

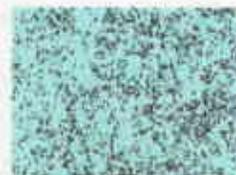


Fig. 36 p-53 CSA
10X



Fig. 37 p-53 EPOS
40X

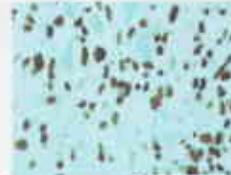


Fig. 38 p-53 CSA
40X

CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos en la detección de la expresión de proteínas del ciclo celular en los diferentes tejidos utilizados y en los casos de retinoblastoma, es posible sugerir que la detección de este tipo de proteínas se realice ya sea con el sistema de detección CSA o EPOS ya que con estos se obtuvieron los mejores resultados para la interpretación de los mismos. No olvidando que el sistema CSA no es recomendable para la detección de proteínas citoplasmáticas o de membrana y que la inmunodetección con estos sistemas es mas adecuada que con el sistema LSAB+.

La única ventaja que la tecnología empleada en el sistema LSAB+ nos proporciona, es que permite trabajar con anticuerpos primarios obtenidos de diferentes especies tales como: ratón, rata, cabra, conejo, gallina y cobayo; y en el caso de los sistemas CSA y EPOS solo permiten trabajar con anticuerpos primarios obtenidos de ratón y de conejo (Tabla 6).

BIBLIOGRAFÍA

1. García Vázquez F. J. Mecanismos de inactivación de la proteína pRB110 en retinoblastoma. Tesis; Marzo, 2000.
2. García Vázquez F. J. Herramientas en Patología "Inmunohistoquímica e Hibridación *in situ*". Manual de Procedimientos del Laboratorio de Patología Molecular, Departamento de Patología. Instituto Nacional de Pediatría, México. 2005
3. CASTILLO B. V, KAUFMAN L. Pediatric tumors of the eye and orbit. Pediatric Clinics of North America. 2003, 50(1).
4. Lehninger et al. Principios de Bioquímica. Tercera edición. Ed Omega. Barcelona España 2001.
5. KARP G. Biología Celular. Segunda edición. Ed. Mc Graw Hill. México, 1987.
6. ANTHONY J. F. GRIFFITHS, et. al. Genética. Séptima ed. Ed. McGraw Hill Interamericana U.S.A. 2000
7. BENJAMIN LEWIN. Genes VII. Oxford University Press. U.S.A. 2000.
8. DAVID J. DABBS. Diagnostic Immunohistochemistry. 2002, Ed. Churchill Livingstone. E.U.
9. EDNA B. PROPHET, BOB MILLS, et. Al., Métodos Histotecnológicos. Instituto de Patología de las fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). Washington, D.C. E.U. 1995.
10. ENZINGER FM, WEISS SW. Soft Tissue Tumor, St Louis, Mosby-Yearbook U.E.
11. SHARON W. WEISS, JOHN R. GOLDBLUM. Soft Tissue Tumor, Ed. Mosby-Yearbook U.E. 2001.
12. ULRIKA V. MIKEL, editor. Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology. Instituto de Patología de las fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). Washington, D.C. E.U. 1994.
13. Abramson M et al (1990). Retinoblastoma: Diagnosis, treatment and implications. *Pediat Ann* 19:387-395.

14. Ausubel F Brent R (1988). Current protocols in Molecular Biology. Overview of DNA Sequencing Methods. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience. New York. pp 12.8.9.
15. Benedict W; Xu H; Hu S (1990). Role of the retinoblastoma gene in the initiation and progression of human cancer. *J Clin Invest* 85: 988-993.
16. Cowell J (1991). The Genetics of Retinoblastoma. *Br J Cancer* 63: 333-336.
17. Damjan Glavac and Michael Dean (1994). A comparison of the sensitivity of the single-strand conformation polymorphisms and heteroduplex methods. *Methods in Neurosciences* 1-8.
18. Damjan Glavac and Michael Dean (1993). Optimization of the single-strand conformation polymorphisms (SSCP) technique for detection of point mutations *Human Mutation* 2: 404-414.
19. David W Yandell and Thaddeus P Dryja (1989). Detection of DNA sequence polymorphisms by enzymatic amplification and direct genomic sequencing. *Am J Hum Genet* 45: 547-555.
20. Díaz M, Orozco L (1992). Estudio Clínico-Genético del Retinoblastoma. *Boletín Médico Hospital Infantil de México* 49:175-179.
21. Draper G et al (1986). Second neoplasms in patients with retinoblastoma. *Br J Cancer* 53: 661.
22. Dryja T and Rapaport J (1986). Molecular detection of deletions involving band q14 of chromosome 13 in retinoblastomas. *Proc Natl Acad Sci* 83: 7391-7394.
23. Dunn J et al (1988). Identification of germline and somatic mutations affecting the Retinoblastoma Gen. *Science* 241:1797-1800.
24. Dyson N et al (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243: 934-937.
25. Eisenstein B I (1990). The polymerase chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *New England Journal Medical* 322: 178-183.
26. Emery and Rimoin's (1996). Principles & Practics of Medical Genetics Ed. Churchill Livingstone 3a. ed. Vol II pp. 2585-2609.

27. Frank Karlsen et al (1996). Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of Human Papillomavirus. *J Clin Microbiol* 34: 2095-2100.
28. Friend S et al (1986). A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323: 643-6.
29. Fung Y; Murphree A (1987). Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. *Science* 236: 1567-1661.
30. Gallie L and Joremy A (1990). Biology of disease. Mechanism of oncogenesis in Retinoblastoma. *Lab Invest* 62:175-179.
31. Hollingsworth R (1993). Retinoblastoma protein and the cell cycle. *Curr Opin Genet Develop* 3: 55-62.
32. Horowitz J; Yandell D; Sango P (1989). Point mutational inactivation of the Retinoblastoma Antioncogene. *Science* 243: 937-940.
33. H zur Hausen (1996). Papillomavirus infections-a major cause of human cancers. *Biochimica at Biophysica Acta* 1288: F55-F78.
34. Irene Szijan et al (1995). Identification of RB1 germline mutations in argentinian families with sporadic bilateral retinoblastoma. *J Med Genet* 32: 475-479.
35. Kevin Morgan, et al (1996). A rapid and efficient method for DNA extraction from paraffin wax embedded tissue for PCR amplification. *J Clin Pathol Mol Pathol* 49: M179-M180.
36. Knudson A (1971). Mutation and cancer: Statistical study of Retinoblastoma. *J NIH Res* 2: 67-72.
37. Linn Murphree (1996). Principles & Practics of Medicals Genetics en: Emery & Rimon's. 3^a ed. Vol II Ed. Churchill Livingstone. USA pp 2585-2604.
38. L T Wang et al (1996). Nested PCR-SSCP assay for the detection of p53 mutations in paraffin wax embedded bone tumours: improvement of sensitivity and fidelity. *J Clin Pathol Mol Pathol* 49: M176-M178
39. Lundlow J; De Caprio J; Huang C (1989). SV40 large T antigen binds preferentially to and underphosphorilated member of the Retinoblastoma susceptibility gene product family. *Cell* 56: 57-65.

40. Macías M. (1998). Detección de mutaciones en pacientes con retinoblastoma. Tesis de posgrado (Maestría en Biología Experimental) UAM-I, México pp 97
41. Maniatis T; Sambrook J (1989). Molecular Cloning, a laboratory manual. V11 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA pp 7.87.
42. Markus Grompe (1993). The rapid detection of unknown mutations ion nucleic acids. *Nature Genetics* 5: 111-116.
43. Masato Orita et al (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-sstrand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2766.2770.
44. Masato Orita et al (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5: 874-879.
45. M M Manos et al (1989). Use of Polymerase chain reaction amplification for the detection of genital Human Papillomaviruses. *Cancer cell* 7: 209-214.
46. Metka R; Damjan G; Dean M. (1995). Sensitivity of single-strand conformation polymorphism and heteroduplex method for mutation detection in the Cystic Fribosis Gene *Hum Mol Genetics*.
47. Mitchell C; Cowell J (1988). Molecular evidence that the esterase-D gene lies proximal to the retinoblastoma susceptibility locus in chromosome region 13q14. *Hum Genet* 81: 57-60.
48. Muñoz-N et al (1996). Risk factors for HPV DNA detection in meddle-aged women. *Sex-Transm-Dis* 23(6): 504-510.
49. Muñoz-N et al (1997). Cervical cancer and human papillomavirus: epidemiological evidence and perspectives for prevention. *Salud-Publica-Mex.* 39 (4): 362-377.
50. Naumova A; Sapienza C (1994). The genetics of Retinoblastoma, revisted. *Am J Hum Genet* 54: 264-273.
51. Oarty J et al (1988). Incidence of second neoplasms in patients with bilateral Retinoblastoma. *Ophthalmology.* 95:1583.

52. Orjuela M et al (1998). Presence of HPV-like sequences in tumor tissue from children with retinoblastoma. En prensa.
53. Orozco L (1993). Biología molecular aplicada al estudio de las enfermedades hereditarias en: "Genética y Biología Molecular en Cardiología". Sociedad Mexicana de Cardiología. México. pp. 87-104.
54. P Quirke & G R Taylor (1994). PCR a practical approach. Ed by M J McPherson pp 29-39.
55. Pharmacia LKB, Biotechnology (1991). Gene Assembler Plus (80-2081-57) Users Manual.
56. Roarty J; Mclean I; Zimmerman L (1988). Incidence of second neoplasms in patients with bilateral Retinoblastoma. *Ophthalmology* 95: 1583.
57. Sanger F; Nicklen S; Coulson A (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74: 5463-5467.
58. Scheffer H et al (1989). Linkage analysis of families with hereditary Retinoblastoma: Nonpenetrance of mutation, revealed by combined use of markers A within and flanking the RB1 gene *Am J Hum Genet* 45: 252-260.
59. Shirodkar S; Ewen M; De caprio J (1992). The transcription factor E2F interacts with the retinoblastoma product and a p107-cyclin A complex in a cell cycle-regulated manner. *Cell* 68: 157-166.
60. Takashi Shimizu et al (1994). Detection of mutations off the RB1 gene in retinoblastoma patients by using exon-by-exon PCR-SSCP analysis. *Am J Hum Genet* 54: 793-800.
61. Tjong-Won Park et al (1995). Molecular Biology of cervical cancer and its precursors. *Cancer Suppl* 76(10): 1902-1913.
62. Véronique Blanquet et al (1993). Identification of germline mutations in the RB1 gene by denaturant gradient gel electrophoresis and polymerase chain reaction direct sequencing. *Human Molecular Genetics* 2: 975-979.
63. Véronique Blanquet et al (1995). Spectrum of germline mutations in the RB1 gene: a study of 232 patients with hereditary and non hereditary retinoblastoma. *Human Molecular Genetics* 4: 383-388.

64. Watson J D et al (1992). The polymerase chain reactions en: Recombinant DNA. 2ª. Edición. Ed. Scientific Americans Books. U.S.A. pp 79-95.
65. Weatherall (1991). The new genetics and Clinical practice. 3ª ed. Ed. Oxford University Press. Oxford pp 376.
66. Weinberg A Robert (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. Cell 81: 323-330
67. Wiggs J; Nordenskjold H; Yandell D (1988). Predictions of the risks of hereditary retinoblastoma usings DNA polymorphisms within the retinoblastoma gene. The New Engl J Med 318: 151-157.
68. Yamada T et al (1997). Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. J Virol 71 (3): 2463-2472.
69. Yandell D, Dryja T (1989). Sequencing of alleles at the human retinoblastoma locus: Applications to Cancer Diagnosis and Genetics Cousenling en: Molecular Diagnosis of Human Cancer. Cancer Cell. Cold Spring Harbor Laboratory. Massachusetts U.S.A. pp 223-227
70. Yoshikawa H et al (1990). Detection and typing of multiple HPVS. Int J Cancer 45: 990-992.

ANEXOS

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Formaldehído amortiguado al 10%

| | |
|-------------------------------|----------------|
| Formaldehído 37-40% | 100 mL/L |
| Fosfato de Potasio monobásico | 4.0 g/L. |
| Fosfato de Potasio dibásico | 6.5 g/L |
| Agua desionizada | c.b.p. 1000 mL |

Citrato de Sodio 0.1 M

| | |
|--------------------------------|---------------|
| Citrato de Sodio (P.M. 294.2) | 29.4 g/L |
| Agua desionizada | 900 mL |
| pH 6, ajustar pH con HCl conc. | pH 6 |
| Tween 20 | 1 mL |
| Agua Desionizada | c.b.p.1000 mL |

PBS

| | |
|-------------------------------|---------------|
| Agua desionizada | 900 ml. |
| Fosfato de Potasio monobásico | 0.24 g/L |
| Fosfato de Potasio dibásico | 1.44 g/L |
| KCl | 0.2 g/L. |
| NaCl | 8.0 g/L. |
| Agua desionizada | c.b.p.1000 mL |

TBST

| | |
|--------------------------------|----------------|
| Agua desionizada | 750 mL |
| Tris | 6.05 g/L. |
| NaCl | 8.76 g/L. |
| Tween 20 | 1 mL |
| Etanol absoluto (opcional) | 50 mL /L. |
| pH ajustar pH con HCl conc. | 7.5 |
| Agua desionizada | c.b.p. 1000 mL |

Albúmina Bovina 1%

| | |
|------------------------|------------|
| Albúmina sérica bovina | 1 g/100 mL |
| PBS (agua estéril) | 100 mL |

Peróxido de Hidrógeno 0.9%

| | |
|---------------------------|---------------|
| Agua destilada | 70 mL |
| Peróxido de Hidrógeno 30% | 3 mL |
| Agua destilada | c.b.p. 100 mL |

PBS/diluyente de anticuerpos

| | |
|----------------------------------|-------------------|
| Agua desionizada estéril | 90 mL |
| Fosfato de Potasio monobásico | 0.024 g/100mL |
| Fosfato de Potasio dibásico | 0.144 g/100 mL |
| KCl | 0.02 g/100 mL |
| NaCl | 0.80g/100 mL. |
| Agua desionizada estéril | c.b.p. 100 ml. |
| NaN ₃ 15 mM. | 0.975 g/100 mL |

PROTOCOLO IHQ LSAB+/HRP/DAB

| | | |
|------------------------------------|--|---|
| FUNDIR PARAFINA. | 30 min.-24 hrs. | 56 °C-59 °C. |
| DESPARAFINAR | Xilol | 5 min. |
| | Xilol | 30 seg. |
| HIDRATAR | Alcoholes degradados. | 2 c/u por 30 seg. |
| **DESENMASCARAMIENTO | Horno de microondas/olla de presión | 1 X 5 min, con Citrato de Sodio ó con E. D. T. A. |
| REPOSO | Baño María a Temperatura ambiente. | 1 X 20 min. |
| **DIGESTIÓN ENZIMÁTICA | Sistema coverplate | 1 X 6 min. Proteinasa K |
| LAVADO | Agua destilada. | 2 X 30 seg. |
| BLOQUEO PEROX. ENDO. | H ₂ O ₂ 3% | 1 X 5 min. |
| LAVADO | PBS Tween 20 0.1% | 1 X 4 min. |
| BLOQUEO DE PROTEÍNAS | BSA 1% | 1 X 5 min. |
| ANTICUERPO PRIMARIO | Temperatura ambiente. | 1 X 45 min. |
| LAVADO | PBS Tween 20 0.1% | 1 X 4 min. |
| ANTICUERPO BIOTIN. | Temperatura ambiente. | 1 X 30 min. |
| LAVADO | PBS Tween 20 0.1% | 1 X 4 min. |
| ESTREPTAVIDINA-HRP | Temperatura ambiente. | 1 X 30 min. |
| LAVADO | PBS Tween 20 0.1% | 1 X 4 min. |
| DAB | Temperatura ambiente. | Monitorear al microscopio. |
| LAVADO | Agua destilada | Vaso de pp de 600 ml. |
| CONTRA-TINCIÓN | HEMATOXILINA DE GILL | 3-7 min. |
| DIFERENCIAR | NH ₄ OH 0.37 M. | 30-60 seg. |
| LAVADO | Agua destilada | 2 cambios de 400 ml c/u. |
| DESHIDRATAR | Alcoholes degradados, hasta Etanol Absoluto Anhidro. | 2 c/u por 30 seg. |
| SECAR | Campana de extracción | Temperatura ambiente. |
| MONTAR Y CUBRIR | Resina - Cubreobjeto | |
| OBSERVAR RESULTADOS AL MICROSCOPIO | | |

(García Vázquez F J. 2005)

PROTOCOLO EPOS/HRP/DAB

| | | |
|------------------------------------|--|---|
| FUNDIR PARAFINA. | 30 min.-24 hrs. | 56 °C-59 °C. |
| DESPARAFINAR | Xilol | 5 min. |
| | Xilol | 30 seg. |
| HIDRATAR | Alcoholes degradados. | 2 c/u por 30 seg. |
| **DESENMASCARAMIENTO | Horno de microondas/olla de presión | 1 X 5 min, con Citrato de Sodio ó con E. D. T. A. |
| REPOSO | Baño María a Temperatura ambiente. | 1 X 20 min. |
| **DIGESTIÓN ENZIMÁTICA | Sistema coverplate | 1 X 6 min. Proteínasa K |
| LAVADO | Agua destilada. | 2 X 30 seg. |
| BLOQUEO PEROX. ENDO. | H ₂ O ₂ 3% | 1 X 5 min. |
| LAVADO | PBS Tween 20 0.1% | 1 X 4 min. |
| ANTICUERPO PRIMARIO | Temperatura ambiente. | 1 X 15-30 min. |
| LAVADO | PBS Tween 20 0.1% | 1 X 4 min. |
| COMPLEJO Ab 2º/ Polímero/HRP. | Temperatura ambiente. | 1 X 15-30 min. |
| LAVADO | PBS Tween 20 0.1% | 1 X 4 min. |
| DAB | Temperatura ambiente. | Monitorear al microscopio. |
| LAVADO | Agua destilada | Vaso de pp de 600 ml. |
| CONTRA-TINCIÓN | HEMATOXILINA DE GILL | 3-7 min. |
| DIFERENCIAR | NH ₄ OH 0.37 M. | 30-60 seg. |
| LAVADO | Agua destilada | 2 cambios de 400 ml c/u. |
| DESHIDRATAR | Alcoholes degradados, hasta Etanol Absoluto Anhidro. | 2 c/u por 30 seg. |
| SECAR | Campana de extracción | Temperatura ambiente. |
| MONTAR Y CUBRIR | Resina - Cubreobjeto | |
| OBSERVAR RESULTADOS AL MICROSCOPIO | | |

(García Vázquez F J. 2005)

PROTOCOLO CSA/HRP/DAB

| | | |
|------------------------------------|--|---|
| FUNDIR PARAFINA. | 30 min.-24 hrs. | 56 °C-59 °C. |
| DESPARAFINAR | Xilol | 5 min. |
| | Xilol | 30 seg. |
| HIDRATAR | Alcoholes degradados. | 2 c/u por 30 seg. |
| DESENMASCARAMIENTO | Horno de microondas/olla de presión | 1 X 5 min, con Citrato de Sodio ó con E. D. T. A. |
| REPOSO | Baño María a Temperatura ambiente. | 1 X 20 min. |
| LAVADO | Agua destilada. | 2 X 30 seg. |
| BLOQUEO PEROX. ENDO. | H ₂ O ₂ 3% | 1 X 5 min. |
| LAVADO | PBS Tween 20 0.1% | 1 X 4 min. |
| BLOQUEO DE PROTEÍNAS | BSA 1% | 1 X 5 min. |
| ANTICUERPO PRIMARIO | Temperatura ambiente. | 1 X 45 min. |
| LAVADO | PBS Tween 20 0.1% | 1 X 4 min. |
| ANTICUERPO BIOTIN. | Temperatura ambiente. | 1 X 30 min. |
| LAVADO | PBS Tween 20 0.1% | 1 X 4 min. |
| COMPLEJO ESTREPTAVIDINA-BIOTINA | Temperatura ambiente | 1 X 30 min. |
| LAVADO | PBS Tween 20 0.1% | 1 X 4 min. |
| COMPLEJO TIRAMIDA-BIOTINA | Temperatura ambiente | 1 X 30 min. |
| LAVADO | PBS Tween 20 0.1% | 1 X 4 min. |
| ESTREPTAVIDINA-HRP | Temperatura ambiente. | 1 X 30 min. |
| LAVADO | PBS Tween 20 0.1% | 1 X 4 min. |
| DAB | Temperatura ambiente. | Monitorear al microscopio. |
| LAVADO | Agua destilada | Vaso de pp de 600 ml. |
| CONTRA-TINCIÓN | HEMATOXILINA DE GILL | 3-7 min. |
| DIFERENCIAR | NH ₄ OH 0.37 M. | 30-60 seg. |
| LAVADO | Agua destilada | 2 cambios de 400 ml c/u. |
| DESHIDRATAR | Alcoholes degradados, hasta Etanol Absoluto Anhidro. | 2 c/u por 30 seg. |
| SECAR | Campana de extracción | Temperatura ambiente. |
| MONTAR Y CUBRIR | Resina - Cubreobjeto | |
| OBSERVAR RESULTADOS AL MICROSCOPIO | | |

(García Vázquez F J. 2005)

GLOSARIO

Alelo: variantes de un gen polimorfo en un locus genético dado.

Antígeno: cualquier molécula capaz de ser reconocida por un anticuerpo o receptor de célula T.

Antígeno CD: designación de los cúmulos de diferenciación asignados a moléculas de superficie de leucocitos, que se identifican con un grupo dado de anticuerpos monoclonales.

Apoptosis: forma de muerte celular programada, caracterizada por la digestión del DNA con Endonucleasa.

Cininas: familia de polipéptidos liberados durante la respuesta inflamatoria, que incrementan la permeabilidad vascular y la contracción de la musculatura lisa.

Clon: células idénticas derivadas de un solo progenitor.

Delección clonal: proceso por el cual el contacto con un antígeno en un estadio temprano de la diferenciación de linfocitos induce la muerte celular por apoptosis.

Determinante antigénico: cúmulo de epítomos.

Epítopo: parte de un antígeno reconocida por un receptor de antígeno.

Factor de necrosis tumoral (TNF o TNF α): junto con la linfoxina citosina relacionada (TNF β), en principio se denominó así por su efecto citotóxico sobre ciertas células tumorales, pero también tiene funciones inmunorreguladoras.

Fagolisosoma: vacuola intracelular en la que tienen lugar la destrucción y la digestión del material fagocitado, después de la fusión del fagosoma con el lisosoma.

Fagosoma: vacuola intracelular producida luego de la invaginación de la membrana celular alrededor del material fagocitado.

Halotipo: conjunto de variantes alélicas presentes en determinada región genética.

Inmunógeno: cualquier sustancia que induce una respuesta inmune. Mientras que todos los inmunógenos son antígenos, no todos los antígenos son inmunógenos.

Interferones (IFN): el $IFN\alpha$ deriva de diversos leucocitos, el $IFN\beta$ de los fibroblastos y el $IFN\gamma$ de los linfocitos. Los tres tipos inducen un estado antiviral en las células, y el $IFN\gamma$ actúa como citocina en la regulación de respuestas inmunes.

Interleucinas (IL): designación de algunas citocinas secretadas por los leucocitos.

LOH: Pérdida de heterocigocidad

Proteasoma: complejo de enzimas proteolíticas citoplasmáticas que intervienen en el procesamiento del antígeno para su asociación con el CMH.

Proteína tirosina cinasa: enzimas capaces de fosforilar las proteínas de las tirosinas; a menudo actúan como una cascada en el sistema de transducción de señales de las células.

Regiones determinantes de complementariedad (CDR): secuencias hipervariables de aminoácidos dentro de las regiones variables del anticuerpo y

del receptor de células T, que interactúan con aminoácidos complementarios sobre el antígeno o el complejo péptido-CMH.

RB: Retinoblastoma

RB1: Gen retinoblastoma humano

Kb: Kilobases

E2F: Factor 2 promotor de la transcripción

E2F1: Factor 2 promotor de la transcripción humana

CDC: Cinasa dependiente de ciclina