



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

TESIS

“Detección de la proteína de fusión PAX3-FKHR y nativas en células de rhabdomyosarcoma
alveolar por medio de anticuerpos policlonales y monoclonales”

Para obtener el título de:
Químico Farmacéutico Biólogo

PRESENTA:

Ingrid Gutiérrez Villegas

ASESORAS:

Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo

UNAM

Dra. Gabriela Elisa Mercado Celis.

INMEGEN

Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

2012



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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**



**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **TESIS**

Detección de la proteína de fusión PAX3-FKHR y nativas en células de rabdiosarcoma alveolar por medio de anticuerpos policlonales y monoclonales.

Que presenta la pasante: **Ingrid Gutiérrez Villegas**
Con número de cuenta: **30258659-4** para obtener el Título de: **Química Farmacéutica Bióloga**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Junio de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	Dr. Francisco López Mejía	
SECRETARIO	QFB. Rosalba Bonilla Sánchez	
1er SUPLENTE	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
2do SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a la vida, la familia, los amigos y todas aquellas personas que compartieron y comparten su tiempo, cariño y amor conmigo. Este trabajo, aunque sencillo, se realizó gracias a los esfuerzos de muchas personas que me brindaron su estima, apoyo, comprensión, ayuda, experiencia y muchas cosas más. No creo me alcance esta hoja para citar a todas aquellas personas involucradas y que de una u otra forma han puesto un grano de arena para que esto fuera posible, sin embargo, agradezco a: mis padres, Lalo, Leo y Maco, por todo su amor, Doña Celia; a Migue por su amor y a la familia Velázquez Gómez, por su gran apoyo, cariño y amistad y a la familia Galicia Santiago. Mis amigos de carrera y mis nuevos amigos que me hicieron sentir como en familia Jenny, Memo, Meche, Armando, Dulce, Cass y todos lo que me apoyaron en el INMEGEN ,Fabi, Chava y José Luis. Por supuesto a mis dos asesoras a la Dra. Gaby por acercarme a la experimentación científica y permitirme ser autodidacta y a la Dra. Sandra por su paciencia, comprensión y orientación en diferentes aspectos. Lo mejor es que en esta experiencia aprendí que nada se obtiene sin esforzarse y que la investigación es como un arte hay que imaginar, crear y hacer posible y que durante ese tiempo estará colmada de frustraciones, repeticiones, cosas inexplicables que con el trabajo en equipo y esfuerzo brindaran frutos.

GRACIAS

Si no puedes volar, corre.....Si no puedes correr, camina.....Si no puedes caminar, arrástrate

Pero Continúa....

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo bajo la tutoría de la

Dra. Gabriela Mercado Celis,

investigadora en Ciencias Médicas del laboratorio de oncogenómica en el

Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

ÍNDICE GENERAL

I. ÍNDICE.....	i
II. ÍNDICE DE FIGURAS	lii
III. ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	iii
IV. ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
V. ABREVIATURAS.....	v

	Página
ÍNDICE	
1. Resumen.....	1
2. Marco Teórico: Rabdomiosarcomas.....	2
2.1. Características.....	2
2.2. Tipos de Rabdomiosarcomas.....	3
2.2.1 Rabdomiosarcoma embrionario.....	3
2.2.2. Rabdomiosarcoma alveolar.....	3
2.2.3. Rabdomiosarcoma anaplásico.....	4
2.2.4. Rabdomiosarcoma botroide	4
2.3. Supervivencia.....	5
2.4. Pronóstico.....	5
2.5. Estadíos.....	6
2.6. Tratamiento.....	7
2.7. Genes de fusión en RMS	8
2.7.1. Familia PAX.....	8
2.7.1.1 PAX3	9
2.7.2. FKHR (FOXO1)	9
2.8. Proteína quimérica PAX3- FOXO1.....	10
2.9. Blancos Transcripcionales.	11
2.10. Silenciamiento del gen de fusión, PAX3-FKHR, como posible tratamiento	12
2.11. Generalidades de la técnica de Western blot.....	13
3. Justificación.....	18
4. Objetivos.....	19
5. Metodología general.....	20
6. Resultados.....	23
6.1 Expresión de gen de fusión en líneas celulares de Rabdomiosarcoma.....	23
6.2 Expresión proteica de PAX3-FKHR por medio de WB.....	24
6.2.1. Extracción de proteínas.....	24
6.2.2. Separación de proteínas por SDS-Page.....	25
6.2.3. Transferencia.....	26

6.2.4 Detección.....	26
7.Discusión.....	30
7.1 Expresión del gen de fusión en Rbdomiosarcomas.....	30
7.2 Expresión proteica de PAX3-FKHR por medio de WB.	31
7.2.1. Extracción de proteínas.....	31
7.2.2 Separación de proteínas por SDS-Page.....	32
7.2.3. Transferencia.....	32
7.2.4 Detección.....	33
8.Conclusión.....	36
9.Anexo I.....	37
10. Bibliografía.....	50

I.II ÍNDICE DE FIGURAS

Número de figura	Título	Número de Página
1.	Estructura de las proteínas quiméricas PAX3/PAX7-FKHR.	10
2.	Geles desnaturizantes para ARN.	23
3.	Gráficas de amplificación para PAX3-FKHR de las líneas celulares RD y RH30	24
4.	Geles SDS-PAGE de integridad proteica	26
5.	Esquema de las proteínas nativas y la de fusión representando los sitios de unión de los anticuerpos evaluados	27
6.	Imágenes escaneadas los anticuerpos evaluados	29

I.III ÍNDICE DE GRÁFICAS

Número de gráfico	Título	Número de Página
1.	Curva de calibración de BSA	25

I.IV ÍNDICE DE TABLAS

Número de tabla	Título	Número de Página
1.	Grupos de riesgo y porcentaje de sobrevida	5
2.	Estadíos y fases de la enfermedad.	6
3.	Clasificación de los pacientes con RMS	7
4.	Agrupamiento quirúrgico de RMS para tratamiento	7
5.	Aspectos generales para el tratamiento de cáncer	8
6.	Porcentaje del gel de acrilamida de acuerdo al peso molecular de la proteína de interés.	13
7.	Diferencias entre membranas para transferencia	14
8	Diferencias entre la cámara húmeda y semiseca.	15
9.	Lista de anticuerpos evaluados	22
10.	Concentración de RNA total en líneas celulares	23
11.	Valores de expresión de PAX3-FKHR y GADPH en líneas celulares.	24
12.	Concentración empleada de cada línea celular	25
13.	Datos curva de calibración para la cuantificación de proteínas	25
14.	Valores de absorbancia de las muestras y su concentración	25
15.	Resultado de los anticuerpos evaluados	27
13.	Porcentaje del gel de acrilamida de acuerdo al peso molecular de la proteína de interés.	27

I.V ABREVIATURAS.

Abs :	Absorbencia.
AP:	Fosfatasa alcalina.
cDNA:	Ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla.
CDKN1C:	Inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 1C.
CT:	Ciclo umbral.
DNA:	Àcido desoxirribonucleico.
FKHR:	Forkhead transcription factor, también llamado FOXO1.
GAPDH:	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa.
HD:	Homeodominio.
HRPO:	Horse radish peroxidase, peroxidasa de rábano.
KRAB:	Krüppel-associated box.
LOH:	Lost of heterocigosity, pérdida de heterocigocidad.
NCBI:	National Center for Biotechnology Information.
PAX3:	Paired box 3.
PAX3-FKHR:	Proteína de fusión paired box3-forkhead.
PB:	Paired box, caja pareada.
qPCR:	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.
RT-PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.
RMS:	Rabdomiosarcoma.
RMSA:	Rabdomiosarcoma alveolar.
RMSE:	Rabdomiosarcoma embrionario.
RMSP:	Rabdomiosarcoma pleomórfico.
rRNA:	Ácido ribonucleico ribosomal.
SDS-PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecilsulfato de sodio.
siRNA:	Small interference RNA.
STAT:	Signal transclucer and activator of transcription.
WB:	Western blot.

1. RESUMEN

Los sarcomas son un tipo de cáncer que se origina en el tejido conectivo, uno de ellos es el rabdomiosarcoma infantil. Principalmente se dividen en: rabdomiosarcoma alveolar (RMSA); asociado a translocaciones cromosómicas recurrentes, y el rabdomiosarcoma embrionario (RMSE); asociados con pérdida de la heterocigidad (LOH) en la región del cromosoma 11p15.5.

El objetivo general de este trabajo es optimizar la técnica de Western Blot (WB) y valorar cada uno de los anticuerpos que reconocen a las proteínas nativas de PAX3 y FKHR, así como a la proteína de fusión PAX3-FKHR para poder emplear esta técnica como método de validación para otros ensayos como por ejemplo el silenciamiento génico. En este trabajo se emplearon líneas celulares humanas de RMSE (RD y SMS) y RMSA (RH18 y RH30) cultivadas en DMEM con 10% de SFB y antibiótico a 37°C y 5% de CO₂. La extracción de proteínas se realizó por métodos químicos y físicos con su posterior cuantificación empleando el kit 2D Quant. Para la detección de la proteína se realizó una electroforesis en condiciones desnaturizantes, transferencia en cámara húmeda y visualización por quimioluminiscencia, evaluando así los anticuerpos de interés.

La expresión de la proteína de fusión PAX3-FKHR en líneas celulares de RMSA y RMSE fue determinada por qPCR, confirmando así que las células de RMSE no expresan el gen de fusión. Una vez realizada la extracción de proteínas totales se procedió a la cuantificación por espectrofotometría basándose en una curva de calibración de albúmina obteniendo concentraciones adecuadas de proteína total de cada línea celular. Posteriormente se realizó la detección de las proteínas nativas, PAX3 y FKHR, y de fusión PAX3-FKHR con los ocho diferentes anticuerpos a evaluar.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que la mayoría de los anticuerpos presentar reacción cruzada con otros polipéptidos, pese a lo anterior se logró identificar dos anticuerpos que lograron detectar a la proteína de fusión PAX3-FKHR y FKHR los cuales pueden ser empleados en otros ensayos. Además se mejoró la técnica de extracción de proteínas, electroforesis y WB las cuales se emplearán por el INMEGEN en futuros proyectos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Los rhabdomiomas y sus características:

Los sarcomas son un tipo de cáncer que se origina en el tejido conectivo como músculo, tejido adiposo, en las membranas que recubren las articulaciones y en vasos sanguíneos. Existen muchos tipos de sarcoma entre ellos el rhabdomioma infantil, que es el tumor de tejidos blandos más frecuente en pediatría, se originan de células que semejan al músculo esquelético y representan aproximadamente el 3.5 % de los casos de cáncer en niños de 0 a 14 años de edad y un 2 % en adolescentes y adultos jóvenes entre 15 a 29 años de edad. La media de edad al diagnóstico son 4 años.(Gurney, Severson et al. 1995; Ries LA 1999)

La mayoría de casos de rhabdomioma se presentan de forma esporádica sin ningún factor de riesgo(Ries LAG 1999). La etiología se desconoce, pero se relacionan los factores ambientales, de herencia y biológicos, un ejemplo de esto es que se ha detectado la asociación del consumo materno y paterno de marihuana y cocaína con el desarrollo de RMS (Grufferman S, Schwartz AG et al. 1993). También, en los pacientes con tumores embrionarios, el peso alto al nacer y una talla grande en relación con la edad gestacional se relacionan con una incidencia de rhabdomioma (Ognjanovic, S.Carozza et al. 2010).

Las afecciones genéticas relacionadas con el RMS incluyen el síndrome de susceptibilidad al cáncer de Li-Fraumeni (con mutaciones de línea germinal en *p53*) (Li 1969; Trahair 2007), la neurofibromatosis tipo I (Ferrari 2007), el síndrome de Costello (con mutaciones de línea germinal en *HRAS*)(Gripp 2005; Gripp, K. W.Lin et al. 2006), el síndrome Beckwith-Wiedemann (con el que se relacionan más comúnmente el tumor de Wilms y el hepatoblastoma) (DeBaun 1998) y el síndrome de Noonan(Moschovi, Touliatou et al. 2007).

Los rhabdomiomas se pueden localizar en diferentes partes del cuerpo como lo son: (Breitfeld 2005)

- cabeza y cuello (37%)
- sistema genito-urinario (29%)
- extremidades (15%)
- tronco (13%)

2.2 Tipos de Rbdomiosarcomas

De acuerdo a su morfología los rbdomiosarcomas se clasifican en los siguientes subtipos histológicos, rbdomiosarcoma alveolar (RMSA) (20 % de incidencia), embrionario (RMSE) (60 %), y pleomórfico (RMSP) (estimado en 1 %), los cuales no solo se diferencian por su morfología, sino que cada uno presenta características clínicas y genéticas particulares.

2.2.1 Rbdomiosarcoma embrionario (RMSE).

Es el tipo más frecuente, constituyendo aproximadamente del 60 a 70% de los RMS infantiles (Parham and Ellison 2006). Las células del RMSE se parecen a las células musculares de un feto de 6 - 8 semanas. Se localiza frecuentemente en cabeza y cuello (36 %), el sistema genitourinario (26 %), del cual el 0.9% corresponde a vagina, y 4.5% a la vejiga y el interior o alrededor de la próstata (Weiss 2009).

La edad de presentación más frecuente es en menores de 10 años. Desde el punto de vista genético se han realizado múltiples investigaciones y se ha identificado que los rbdomiosarcomas embrionarios y sus variantes (RMSE) están asociados con pérdidas de la heterocigocidad (LOH) en la región del cromosoma 11p15.5 (Besnard-Guerin, Newsham et al. 1996). Esta alteración significa la pérdida de la información genética materna, junto con duplicación de la información paterna en ese mismo locus (Scrabble, Cavenee et al. 1989). En pacientes pediátricos la sobrevida es del 70 % cinco años después del diagnóstico (Davis 1997; Álava 2005).

2.2.2 Rbdomiosarcoma alveolar (RMSA).

Aproximadamente el 20 % de los casos presentan este subtipo y afecta típicamente a niños mayores o adolescentes con una incidencia máxima entre los 10 y 25 años presentándose más a menudo en grandes músculos principalmente en extremidades y tronco. La tasa global de sobrevida para este subtipo es del 52%. Las células del RMSA tienden a parecerse a las células normales del músculo fetal de 10 semanas.

Estos pacientes tienen una mayor frecuencia de recaídas y fallas a tratamiento (Parham and Ellison 2006). Genéticamente este subtipo se asocia con alteraciones específicas, entre ellas translocaciones cromosómicas recurrentes como la t(2; 13) (q35; q14) con una prevalencia del 75 %, y una menos habitual que es la t(1; 13) (p36; q14) con el 10 % (Smith, Seibel et al. 2010). El resultado de estas translocaciones es la fusión de los genes PAX (*paired box*), PAX3 (2q35) y PAX7 (1p36) respectivamente, con el gen FKHR o FOXO1 (*forkhead in rhabdomyosarcoma*) situado en 13q14.

Los genes PAX codifican factores de transcripción que participan durante el desarrollo embrionario y que son necesarios para la génesis de ciertos órganos. En particular, PAX3 y PAX7 participan en los procesos de miogénesis y neurogénesis. Se expresan en tubo neural y son clave tanto para la correcta formación de éste como para la migración de los mioblastos a las extremidades superiores e inferiores. PAX3 puede suprimir la diferenciación de los mioblastos, y esto podría contribuir al fenotipo indiferenciado de este tipo tumoral (Raspall 2000).

Existen diferencias en el mecanismo de sobre expresión de PAX3 y PAX7. Los tumores con PAX7-FKHR tienden a surgir en pacientes más jóvenes, a asociarse a una menor tasa de metástasis y a un mayor índice de supervivencia que los que presentan fusiones PAX3- FKHR, a pesar de compartir una morfología similar.

2.2.3 Rbdomiosarcoma anaplásico o pleomórfico

Se presenta en los adultos (1 %), con una edad que oscila entre los 50 y 56 años siendo muy rara en niños (León A.L 2005).

2.2.4 Rbdomiosarcoma botrioide o botrioideo

Llamado así porque expresa muy bien la apariencia microscópica del tumor que es polipoidea o de racimo; se localiza sobre todo en la vejiga y el sistema biliar. Se considera una variedad del RMS embrionario y se presenta en el 5-6% de los casos (León A.L 2005).

2.3 Supervivencia

Se han logrado mejoras sorprendentes en la supervivencia de niños y adolescentes con cáncer (Breneman, Lyden et al. 2003), y una muestra de ello es que la mortalidad infantil por ese padecimiento de 1975 a 2002 disminuyó en más de 50 %. Para rhabdomyosarcoma, la tasa de supervivencia a 5 años durante el mismo período aumentó de 53 % a 65 % para los niños menores de 15 años y de 30 % a 47 % para los adolescentes de 15 a 19 años. (Breneman, Lyden et al. 2003). Los niños y adolescentes con cáncer que sobreviven necesitan un seguimiento minucioso dado que los efectos secundarios del tratamiento oncogénico pueden persistir o presentarse meses o años después del mismo.

Actualmente, la supervivencia a los 5 años se considera la siguiente de acuerdo al Grupo de riesgo:

Tabla 1. Grupos de riesgo y porcentaje de sobrevida (Spunt, Lobe et al. 2000)

Porcentaje de sobrevida	
Grupo I	83%
Grupo II	70 %
Grupo III	52 %
Grupo IV	20 %

2.4 Pronóstico.

Los factores pronósticos de rhabdomyosarcoma son principalmente el sitio donde se localiza la lesión primaria, la presencia, cantidad y subtipo histológico de metástasis (Crist, Gehan et al. 1995). A continuación se describen estos factores:

1. Localización primaria del tumor, siendo los de mejor pronóstico aquellos en el tracto biliar, órbita, cabeza, cuello y vagina (Crist, Anderson et al. 2001).
2. El tamaño del tumor, cuando éste es menor de 5cm el tiempo de supervivencia se prolonga (Lawrence, Anderson et al. 1997; Breneman, Lyden et al. 2003).
3. La presencia de metástasis, están relacionadas con el tipo histológico del tumor y suponen un pronóstico negativo, y sólo es positivo cuando se localiza en zona genitourinaria (excepto en vejiga y próstata).

4. La afección de ganglios linfáticos regionales, lo que se corresponde con un peor pronóstico de la enfermedad.
5. La clasificación histológica del tumor, siendo el subtipo alveolar el que presenta una evolución menos favorable (Breneman, Lyden et al. 2003).
6. La presencia de expresión tumoral de marcadores de resistencia y en especial la detección de glicoproteína-P que genera resistencia cruzada a diferentes tipos de drogas de uso habitual en el tratamiento de los RMS (Kuttesch, Parham et al. 1996).

En los pacientes con RMS de pronóstico favorable el tratamiento debe perseguir tasas de supervivencia altas cerca del 90 % con los menores efectos secundarios posibles. Se incluyen dentro de estos pacientes los RMSE presentados en sitios favorables o con enfermedad microscópica residual en sitios desfavorables (Breneman, Lyden et al. 2003).

Los pacientes con RMS de pronóstico intermedio tienen tasas de supervivencia del 55 % al 70 %, incluyendo casos con RMSE en sitios no favorables con enfermedad residual macroscópica, casos con RMSE metastásico en niños menores de 10 años y RMSA no metastásico en cualquier lugar.

2.5 Estadíos.

Los pacientes de rhabdomyosarcoma pueden clasificarse de acuerdo a su estadio y a su riesgo. El estadio del paciente se determina clínicamente por el lugar y tamaño del tumor primario, por el estatus ganglio regional y por la presencia o ausencia de metástasis. (Lawrence, Anderson et al. 1997)

Tabla 2 Estadíos y fases de la enfermedad (Raney, Anderson et al. 2001).

Estadío	Fases de la Enfermedad.
1	Tumor localizado en la órbita del ojo o cabeza y cuello, o región genitourinaria (excepto vejiga y próstata), o tracto biliar.
2	Tumor localizado en cualquier otro sitio primario que no incluya los nombrados anteriormente. Los tumores primarios deberán medir menos de 5cm en diámetro y no deberá haber complicación ganglionar regional.
3	Localizada en cualquier sitio primario. Los tumores poseen un tamaño mayor a 5 cm o hay complicación ganglio regional.
4	Metástasis en el momento del diagnóstico.

Los pacientes de RMS se clasifican como de bajo riesgo, intermedio o alto de acuerdo al tipo histológico, localización del tumor, resección y metástasis (Raney, Anderson et al. 2001).

Tabla 3. Clasificación de los pacientes con RMS. (Breneman, Lyden et al. 2003)

Riesgo	Clasificación de los pacientes con RMS.
Bajo	Pacientes con RMSE localizado que se presenta en lugares favorables y desfavorables ya sea con enfermedad completamente reseçada, o con enfermedad microscópica residual.
Intermedio	Pacientes con RMSE en sitios desfavorables con enfermedad residual macroscópica así como pacientes menores de 10 años de edad con RMSE metastásico y pacientes con RMSA no metastásico y sarcoma no diferenciado en cualquier lugar.
Alto	Pacientes con RMS metastásico o sarcoma no diferenciado en el momento del diagnóstico, excepto los casos de RMSE en niños menores de 10 años.

2.6 Tratamiento

Usualmente los pacientes con RMS requieren terapia múltiple, lo que implica el uso de cirugía seguida de quimioterapia. Se recomienda una nueva cirugía de segunda inspección para aquellos pacientes con tumores no reseçados inicialmente. La radioterapia es una opción de tratamiento en pacientes con enfermedad residual microscópica y macroscópica (Crist, Anderson et al. 2001). El tratamiento de los RMS depende del agrupamiento quirúrgico patológico definido por su extensión y por la resección quirúrgica (Álava 2005).

Tabla 4. Agrupamiento quirúrgico de RMS para tratamiento (Álava 2005).

Agrupamiento quirúrgico de RMS para tratamiento		
Grupo I	RMS localizado, que ha sido totalmente reseçado y no posee afección ganglionar regional (13 %).	
Grupo II	IIA	RMS localizado y reseçado con enfermedad residual microscópica, pero sin complicación ganglionar regional.
	IIB	RMS con complicación ganglionar tumoral, con resección completa y sin enfermedad residual.
	IIC	RMS con complicación ganglionar, reseçado pero con enfermedad residual microscópica en el lugar primario o presencia de afección de un ganglio regional mas distal del sitio primario.
Grupo III	RMS localizado con enfermedad residual macroscópica que incluye resección incompleta o biopsia solamente del sitio primario (48 %)	
Grupo IV	RMS con enfermedad metastásica en el momento del diagnóstico (18 %).	

En general, de forma individual o combinada se emplea el siguiente tratamiento:

Tabla 5. Aspectos generales para el tratamiento de cáncer.(www.cancer.gov)

Cirugía
Resección del tumor, de la metástasis o de ambos
Quimioterapia (Vincristina, Actinomicina D, Ciclofosfamida, Ifosfamida, Etoposido, Melfalan, Topotecan o irinotecan)
Radioterapia
Punción lumbar (células cancerosas encontradas en esta zona)
Cuidados de apoyo (por los efectos secundarios causados)
Antibióticos
Trasplantes de medula ósea
Seguimiento continuo (control de la enfermedad y detectar reparaciones del tumor)

2.7 Genes de fusión en RMS.

Los genes localizados en los sitios de ruptura de la translocación 2;13 son PAX3 en el cromosoma 2 y FKHR en el cromosoma 13. PAX3 y FKHR codifican factores transcripcionales, por lo que, el gen de fusión formado como consecuencia de la translocación cromosómica crea un factor de transcripción quimérico el cual se compone del dominio N-terminal de unión a DNA de PAX3 y la región C-terminal de transactivación de FKHR (Barr, Galili et al. 1993; Shapiro, Sublett et al. 1993).

En general, los genes de fusión comparten varias características que se resumen a continuación:

1) La gran mayoría de estas alteraciones son específicas de tumor, 2) solamente uno de los productos quiméricos se expresa consistentemente y a niveles elevados, 3) en algunos tumores existen variantes de las translocaciones, 4) las proteínas quiméricas han demostrado ser eventos oncogénicos iniciadores, sin embargo, el gen de fusión no es suficiente para la tumorigénesis y se requieren eventos genéticos adicionales, 5) El 50% de los genes involucrados son factores de transcripción y tirosina cinasas, los cuales se distribuyen equitativamente entre desórdenes hematológicos y tumores sólidos.

2.7.1 Familia PAX3

Los genes PAX codifican para factores de transcripción los cuales participan durante el desarrollo embrionario, y son necesarios para la génesis de ciertos órganos. Los miembros de esta familia contienen un dominio de unión a DNA común para todos los miembros denominado "*paired box*" (PB). La familia se clasifica en subgrupos (I al IV) de acuerdo a la presencia o ausencia de la región octapeptídica, y la presencia, ausencia o truncamiento del homodominio (HD); PAX3 y PAX7 pertenecen al grupo III.(Goulding, Lumsden et al. 1994).

PAX3 y PAX7 participan en la miogénesis y neurogénesis, se expresan en el tubo neural y son clave para la correcta formación de éste, además de que participan en la migración de los mioblastos a las extremidades superiores e inferiores. Codifican para proteínas muy similares, comprendidas por un dominio N-terminal donde se encuentra el sitio de unión a DNA constituido por un dominio PB, la región octapeptídica y HD; el dominio C-terminal es rico en prolina-serina y treonina (Barr 2001). En particular PAX3 puede suprimir la diferenciación de los mioblastos, y esto podría contribuir al fenotipo indiferenciado de este tipo tumoral (www.ncbi.nlm.nih.gov ; Davis 1997).

2.7.1.1 PAX 3

El gen PAX3 codifica una proteína de 479 aa (52,9 kDa) que participa en la embriogénesis. El locus de PAX3 consiste en 9 exones (99.1 kb) de los cuales los exones 2, 3 y 4 codifican para el dominio PB y los exones 5 y 6 para el dominio HD, mientras que el sitio de transactivación es codificado por los exones 6, 7 y 8. En tanto, el exón 9 codifica para la región C-terminal (Chalepakis, Jones et al. 1994; Apuzzo, Abdelhakim et al. 2004). Las mutaciones en este gen están asociadas con el síndrome de Waardenburg,(Wang, Li et al. 2010) y frecuentemente se expresa en diversos tipos de cáncer como melanomas(Medic and Ziman 2010) así como en el rhabdomyosarcoma alveolar, contribuyendo a la supervivencia de células tumorales (Scholl, Kamarashev et al. 2001).

2.7.2 FKHR o FOXO1.

El gen FKHR o FOXO1 pertenece a las proteínas forkhead que son factores de transcripción (Galili, Davis et al. 1993), entre cuyas funciones se encuentran regulación negativa del ciclo celular, reparación del DNA, detoxificación, inhibición de diferenciación celular en mioblastos y adipositos, apoptosis, atrofia y regulación del metabolismo de la glucosa (Hribal, Nakae et al. 2003; Nakae, Kitamura et al. 2003).

La familia de genes forkhead comprende 39 miembros los cuales están subdivididos en 19 subgrupos. FKHR pertenece al subgrupo FOXO que incluye otros tres miembros (FOXO3/FKHRL1, FOXO4/AFX y FOXO6) (Hillion, Le Coniat et al. 1997).

El gen de FKHR contiene 3 exones (110,92 kb) y codifica una proteína de 655 aa (69,7 kDa), la cual contiene un dominio forkhead N-terminal de unión a DNA, una región de 110 aminoácidos localizada en la parte central de la molécula y un dominio de activación transcripcional C-terminal (Weigelt, Climent et al. 2001).

2.8 Proteína quimérica PAX3- FOXO1.

PAX3-FKHR, usualmente conocido como PAX3-FKHR, fue clonado en 1993 y la translocación es específica para RMSA, lo cual ha facilitado su diagnóstico. Actualmente las técnicas más empleadas para el estudio de este gen de fusión son FISH y PCR (Fredericks, Galili et al. 1995). PAX3/FOXO1 es un factor de transcripción más potente que PAX3 nativo y también se sobre expresa a nivel de RNA en relación con los transcritos PAX3 normales.

Los casos de RMSA positivos para la fusión muestran también diversas ganancias y pérdidas cromosómicas adicionales. Por lo tanto, la translocación $t(2;13)$ sucede entre los exones del 1 al 7 de PAX3, en donde los puntos de quiebre mantienen la integridad del dominio N-terminal de unión al DNA fusionado con la secuencia C-terminal de FKHR comprendida entre los exones 2 y 3 codificando así para una proteína de fusión de 836 a.a y un peso de 96 KD (Fitzgerald, Scherr et al. 2000).

Cabe mencionar que también en los RMS se expresa el gen de fusión PAX7-FKHR formado por la translocación estable entre los cromosomas 1 y 13.

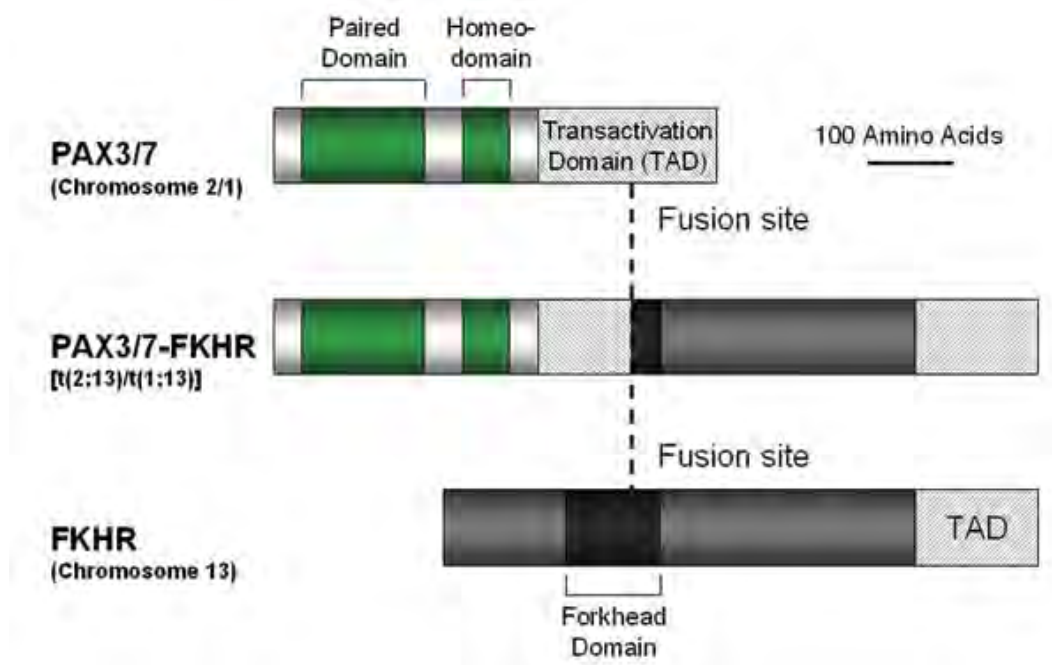


Figura 1. Estructura de las proteínas quiméricas PAX3/PAX7-FKHR. El dominio N-terminal de unión a DNA de PAX3 o PAX7 (verde) está fusionado con el dominio C-terminal de transactivación de FKHR (negro) para generar los factores de transcripción quiméricos PAX3-FKHR o PAX7-FKHR (PB, paired box; HD, homeobox; FD, Forkhead domain)(Galindo, Allport et al. 2006).

Los estudios tempranos acerca del poder oncogénico del gen de fusión PAX3-FKHR fueron realizados en fibroblastos de aves y roedores, en donde se mostró que la expresión de PAX3-FKHR puede causar proliferación en agar blando. Sin embargo, cuando se expresa como un cambio genético único no causa tumorigénesis, ya que para ello requiere de lesiones genéticas adicionales. Estudios previos de PAX3-FKHR son consistentes con la hipótesis de que las translocaciones activan el potencial oncogénico de PAX3 y PAX7 por desregulación de la función normal de la línea miogénica. (Barr 2001).

2.9 Blancos Transcripcionales.

PAX3-FKHR ejerce su efecto tumorigénico alterando la transcripción de los genes blanco. Estudios recientes sobre la habilidad de transcripción han reportado que la fusión del sitio de transactivación de FOXO1 con PAX3 incrementa el poder de transcripción, posiblemente debido a su localización nuclear, por la pérdida del dominio de represión transcripcional de cis-actina y/o a través de la sobre expresión del gen de fusión por medio de mecanismos específicos (Fredericks, Galili et al. 1995).

Se tiene mucho interés por saber qué genes están sobre regulados por PAX3-FKHR, y para ello los análisis se realizan con oligonucleótidos de cDNA en micro arreglos, así como con una serie de análisis de expresión génica (SAGE) que también se llevan a cabo en células humanas y de roedor para identificar cambios génicos específicos, así como en tejidos humanos de RMS. Se han descubierto varios genes blanco, pero en general se agrupan aquellos que forman parte de la diferenciación y señalización miogénica, contracción muscular, genes relacionados con el desarrollo neural, y factores de transcripción relacionados con el desarrollo mesodermal. Estudios acerca de la función de PAX3-FKHR sugiere que la tumorigénesis se da por más de una ruta, incluyendo la estimulación de la proliferación, el apoyo de la supervivencia celular, y/o inhibición de la diferenciación (Hanahan and Weinberg 2000). Un ejemplo de gen blanco de PAX3-FKHR es el receptor de tirosin cinasa MET relacionado con otros tipos de cáncer y que se sabe juega un papel importante en la proliferación, supervivencia e invasión celular. Algunos inhibidores de CDK pueden verse afectados por PAX3-FKHR incluyendo el inhibidor de cinasa dependiente de ciclina1C (CDKN1C) que se encuentra disminuido en mioblastos primarios aislados de ratones transgénicos que expresan PAX3-FKHR (del Peso, Gonzalez et al. 1999). Empleando ensayos de movilidad electroforética junto con otros estudios se identificaron varios sitios de unión a PAX3 en varios genes de mamíferos, estos sitios se encuentran localizados cerca de los promotores 5' de MET, MITF, TYRP1, y BCL.

Se reportó que PAX3 activó las rutas miogénicas en estudios in vitro en donde se emplearon retrovirus que expresaron PAX3, los cuales fueron introducidos en tejidos embrionarios, incluyendo el mesodermo. En este contexto, PAX3 induce la expresión de factores de transcripción miogénica como MyoD, Myf5 y miogenina así como productos de diferenciación miogénica. Algo similar ha sucedido con el gen de fusión PAX3-FKHR, que junto con el gen nativo PAX3, fue insertado en células NIH3T3, y los resultados de los estudios de cDNA revelaron la inducción de una gran cantidad de genes involucrados en el proceso de miogénesis incluyendo los factores de transcripción MyoD, miogenina, Six 1 y Slug pero no Myf5, sin embargo, el gen nativo PAX3 no fue capaz de inducir a estos mismos genes, lo que sugiere que PAX3-FKHR tiene un alto poder de transcripción (del Peso, Gonzalez et al. 1999; Linardic 2008).

2.10 Silenciamiento del gen de fusión, PAX3-FKHR, como posible tratamiento.

Los siRNA son una herramienta molecular para silenciar genes a nivel post-transcripcional proporcionando una estrategia fácil y rápida para degradar al RNAm de interés disminuyendo así la expresión de la proteína para la que codifica, dicha expresión se mide a través de la técnica de Western Blot (WB). (Adjounian 2008). Por ello, es necesario optimizar la técnica de WB, así como valorar cada uno de los anticuerpos que reconocen a la proteína nativa de PAX3, FKHR y a la proteína de fusión PAX3-FKHR.

Los primeros estudios de los siRNA a cerca de la pérdida de función de PAX3-FKHR se basan en el uso de un represor transcripcional eucariótico altamente conservado KRAB (Krüppel-associated box) el cual fue fusionado con PAX3, dando lugar a PAX3-KRAB. PAX3-KRAB compite con PAX3-FKHR por el sitio de unión a DNA silenciado así al gen PAX3. Lo anterior se probó en líneas celulares humanas RH30, que naturalmente expresan PAX3-FKHR, y se encontró que este gen de fusión se pudo reprimir; naturalmente el agente inhibitorio no solo tenía influencia sobre PAX3-FKHR si no también en el gen nativo PAX3, lo que complicaba la interpretación de los experimentos (Fredericks, Ayyanathan et al. 2000).

A pesar del éxito de la tecnología del siRNA en otras secuencias de mamíferos, el silenciamiento de PAX3-FKHR por oligonucleótidos de siRNA o RNA de horquilla corta (shRNA) ha resultado difícil de realizar. Recientemente se ha descubierto un siRNA de 19 nt que silencia la expresión de la proteína de PAX3-FKHR. Estudios de silenciamiento in vitro en células RH30 para PAX3-FKHR con el represor transcripcional PAX3-KRAB derivó en apoptosis, mientras que in vivo causó regresión del tumor al menos en parte debido a la apoptosis celular. Cabe mencionar que en células RH30 el siRNA contra PAX3-FKHR no causa apoptosis, solamente inhibición de la proliferación celular, sugiriendo la baja regulación de PAX3-FKHR independiente de PAX3 (Linardic 2008).

2.11 Generalidades de la técnica de Western blot.

A continuación menciono algunos puntos que considero relevantes para tener éxito en la técnica de WB. Primeramente, la extracción de proteínas depende del lugar en donde se exprese la proteína, tipo, cantidad y calidad de células o tejido de donde se realizó la extracción para posteriormente realizar la cuantificación proteica y continuar con la electroforesis.

Separación de proteínas por SDS-Page.

Básicamente la electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecilsulfato de sodio, SDS-PAGE, consiste en el movimiento de proteínas cargadas negativamente. Por efecto del SDS las proteínas migran de acuerdo a su peso molecular a través de una matriz inerte, poliacrilamida, al aplicar un campo eléctrico (Scofield 2009). Es importante elegir primeramente el tamaño de poro, es decir, el porcentaje de acrilamida que se requiere para el ensayo en donde al aumentar el porcentaje de acrilamida disminuye el tamaño del poro que se empleara para la corrida electroforética y este depende de acuerdo al peso molecular de la proteína de interés. Como ejemplo se enlista la siguiente tabla de porcentaje de acrilamida con respecto a peso de la proteína.

Tabla 6. Porcentaje del gel de acrilamida de acuerdo al peso molecular de la proteína de interés.

Porcentaje de acrilamida	Peso en KDa de la proteína
4.5	> 250
7.5	250 – 120
10	120 – 40
13	40 – 15
15	< 20

Como se sabe las proteínas son biomoléculas anfotéricas, esto quiere decir, que pueden tener carga de acuerdo al pH de la solución en donde se encuentren, por tal motivo es importante el pH de la solución de electroforesis para mantener la carga y aumentar la movilidad de la proteína a través de la matriz, por tal motivo, puntualizó mucho en tener correctamente elaboradas las soluciones a emplear durante el ensayo.

Transferencia.

El Western Blot es una técnica para identificar proteínas en una mezcla compleja de proteínas, transfiriendo las proteínas separadas mediante el peso molecular, de un medio gelificado a una membrana en la cual queden fuertemente adheridas. La membrana es una copia exacta del patrón del gel, a este paso se le conoce como transferencia. El cual desde mi experiencia práctica es uno de los pasos con mayor importancia para obtener un ensayo adecuado.

La transferencia depende básicamente de:

1. La capacidad de la proteína para migrar del gel: depende tanto del peso molecular de la membrana como de el contacto con el gel, así como de las interacciones covalentes ente ambas. La capacidad de migración de las proteínas a la membrana es inversamente proporcional a su tamaño, por lo que las proteínas pequeñas migrarán más rápido que aquellas de gran peso molecular.

2. El tipo de membrana que se emplee: cabe señalar que todas membranas unen proteínas de forma inespecífica, es decir, se adhieren todas las proteínas con idéntica afinidad a la membrana. Las dos membranas comúnmente empleadas son las de nitrocelulosa, que se une por medio de interacciones no covalentes de naturaleza hidrófoba, y las de PVDF basada en interacciones hidrófobas y de dipolos entre las proteínas y la membrana(de la Fuente González A. 2007).

Las principales diferencias entre las membranas de nitrocelulosa y PVDF son:

Tabla 7. Diferencias entre membranas para transferencia

Nitrocelulosa	PVDF
80 – 100 ug / ul. Menor afinidad a proteínas	80 – 120 ug / ul. Mayor afinidad a proteínas
No es necesario activarla	Activarla con etanol para volverla hidrofílica.
No se puede reusar la membrana	Se puede reusar para otras pruebas ya que resiste tratamientos químicos.

3. Contacto o presencia de detergentes: el contacto entre la membrana y el gel debe de ser estrecho sin presencia de burbujas de aire. Además la presencia de detergentes como SDS disminuye la unión de las proteínas a las membranas, por tal motivo el buffer de transferencia tiene metanol además de que también ayuda a estabilizar las dimensiones del gel debido a lo anterior se estabiliza el gel y membranas con el amortiguador(de la Fuente González A. 2007).

La transferencia se puede realizar por alguno de los siguientes sistemas:

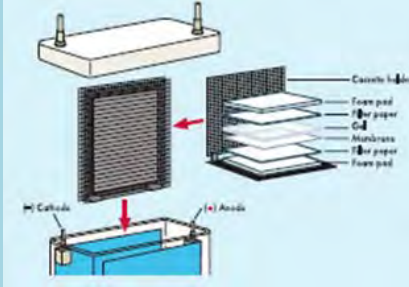
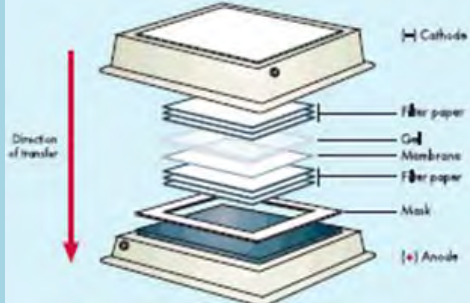
1. Difusión simple: es un montaje que incluye el gel, la membrana y papel filtro, al cual se le coloca el buffer que ascenderá por capilaridad hacia el papel filtro arrastrando consigo las proteínas y al llegar a la membrana, quedarán retenidas en ella. Pocos investigadores emplean este método además de que la transferencia es muy pobre.
2. Al vacío: se añade el poder de succión de una bomba conectada a un sistema de secado de planchas de gel, el cual lleva las proteínas desde el gel hasta la superficie de la membrana. Se emplea tanto para proteínas de alto como de bajo peso molecular.

3. Electrodifusión: Se basa en aplicar una corriente eléctrica y un buffer de transferencia para llevar las proteínas desde el gel hacia la membrana. Las proteínas que están cargadas negativamente y migran desde el cátodo al ánodo.

Existen dos tipos de electrodifusión: en cámara húmeda y en cámara semi-seca; en este trabajo se emplearon ambas técnicas para comparar en cuál de las dos se obtenía una mejor transferencia de las proteínas de interés. La transferencia húmeda es más eficiente para la proteína de interés (Kurien and Scofield 2006).

A continuación enlisto algunas diferencias que observé en cuanto los dos métodos de electrodifusión empleados.

Tabla 8. Diferencias entre la cámara húmeda y semiseca.

	Cámara Húmeda	Cámara Semi-seca
Tipo de cámara:	Se le nombra así porque todo se realiza dentro de un contenedor lleno del buffer de transferencia. La transferencia es en forma vertical 	Emplea muy poca cantidad de buffer, por eso el término semi-seco y el equipo transfiere en forma horizontal. 
Condiciones generales:	V: 100v t: 90 min A: cte	V: 15v máx t: 15 min A: 0.5A
Tiempo de transferencia:	Es muy largo y puede ir desde 1 a 2 horas.	Muy rápido comprende de 15 a 45 minutos como máximo.
Transferencia de las muestras:	La transferencia es de mejor calidad para aquellas proteínas de alto peso molecular mayores a 90 KD, sin embargo proteínas menores a 30 KD salen de la membrana. También se emplea si la proteína de interés es hidrofóbica.	Es buena para proteínas de pesos moleculares medios y bajos menores a 80KD.
Buffer empleado:	Emplea muchos volúmenes de buffer, pero como el tiempo de transferencia es muy largo el sistema tiende a calentarse por lo que el buffer debe de estar lo más frío posible y en movimiento.	Emplea poco volumen de buffer y hay muchos tipos de buffer de transferencia de acuerdo a la proteína que se desee transferir.

Para visualizar si la transferencia se realizó adecuadamente, independientemente si el marcador de peso se visualiza o no en la membrana, se recomienda teñirla de forma reversible con rojo de Ponceau (0,5% Ponceau-S red, 1% ácido acético) para observar el bandeo y después de esto desteñir fácilmente con agua destilada y proseguir con el bloqueo de la membrana.

Bloqueo.

El bloqueo consiste en incubar la membrana con solución de leche baja en grasa al 5 % que se une a los sitios de la membrana donde no hay proteína y con esto ayuda a disminuir la unión inespecífica del anticuerpo en los siguientes ensayos, incrementa la sensibilidad del ensayo y disminuye la interferencia o background. Se realizan una serie de lavados con el fin de eliminar el exceso de los reactivos no unido a la membrana así como para disminuir el ruido de fondo, sin embargo, excederse en los lavados ocasiona una disminución en la sensibilidad por el lavado del antígeno y/o del anticuerpo de la membrana.

Anticuerpo primario.

Las proteínas inmovilizadas en la membrana se incuban con anticuerpos primarios específicos que permiten identificar y cuantificar proteínas concretas de una mezcla compleja de proteínas (de la Fuente González A. 2007). En la actualidad se usan fundamentalmente dos tipos de preparaciones de anticuerpos de detección: anticuerpos policlonales, cuyas preparaciones incluyen múltiples moléculas de anticuerpo que se unen a un antígeno concreto, y anticuerpos monoclonales, que poseen la ventaja de que son específicos en sus interacciones porque únicamente se unen a un epítipo en particular, es decir a una única región del antígeno. El principal problema que plantea su utilización es precisamente el hecho de que reconozcan pequeñas regiones de la secuencia polipeptídica. Esto puede suponer en algunos casos que se produzcan reacciones cruzadas con otros polipéptidos. La temperatura a la que puede tener lugar es igualmente variada; en general, las elevadas temperaturas favorecen las uniones más específicas. (de la Fuente González A. 2007)

Anticuerpo secundario.

Tras lavar la membrana para eliminar el anticuerpo primario que no se ha unido, se expone al anticuerpo secundario. Éste reconoce de forma específica una región concreta del anticuerpo primario. Suelen estar marcados para ser detectables (unión a biotina, a una enzima reportera como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa del rábano). Varios de estos anticuerpos se unirán a cada anticuerpo primario, amplificando la señal.

Los anticuerpos secundarios proceden de animales o de cultivos de hibridomas de origen animal. Por ejemplo, un anticuerpo secundario "anti-ratón" es aquel capaz de reconocer casi todos los anticuerpos primarios obtenidos de ratones. Igualmente hay anticuerpos "anti-cabra", "anti-conejo". Su uso presenta ciertas ventajas: económicas, por permitir a un laboratorio compartir una única fuente de anticuerpos secundarios; y dan resultados mucho más consistentes.

Detección.

La detección se puede realizar por unión directa al del anticuerpo primario marcado a la superficie de la membrana o de forma indirecta en donde se emplea un anticuerpo secundario que se une al primario lo cual ayuda a amplificar la señal. Así también existen diferentes métodos de marcaje, como el marcado radiactivo, que se basan en unión del anticuerpo secundario con I ¹²⁵, cuya radiactividad se imprime en una película autorradiográfica. En este trabajo se empleo un método más práctico y menos «sucio» para detectar las uniones antígeno-anticuerpo en una inmunotransferencia, consistente en el empleo de anticuerpos secundarios con una actividad enzimática.

Las actividades enzimáticas que se suelen utilizar conjugadas con anticuerpos secundarios son la fosfatasa alcalina (AP) y la peroxidasa horseadish (HRPO), que permiten la detección de la unión antígeno-anticuerpo mediante sustratos luminiscentes. También se pueden usar sustratos cromogénicos, pero la detección de los sustratos luminiscentes es mucho más rápida y más sensible (de la Fuente González A. 2007).

3. JUSTIFICACIÓN.

Los RMSA son tumores agresivos, la sobrevida para pacientes es menor del 30% y no ha cambiado en más de dos décadas, por lo tanto, un mejor entendimiento de la biología de este tumor podría llevar al diseño de nuevas terapéuticas específicas para RMSA que pudieran aumentar la sobrevida, como los siRNA.

El 50% de los casos de RMSA presentan la translocación cromosómica t(2;13), que une los genes PAX3 y FKHR. Estudios previos han demostrado que la presencia del gen de fusión PAX3-FKHR es una alteración genética fundamental para el desarrollo de RMSA y está asociada con un comportamiento clínico más agresivo. Este gen de fusión codifica un factor transcripcional quimérico, formado por la región N-terminal de PAX3 que contiene el sitio de unión a DNA, y por la región C-terminal de FKHR el cual contiene el dominio de activación transcripcional.

La optimización de la técnica de WB, así como la valoración de cada uno de los anticuerpos que reconocen a las proteínas nativas de PAX3 y FKHR así como la proteína de fusión PAX3-FKHR permitirá emplear los anticuerpos evaluados como herramienta de confirmación en otros ensayos como el de silenciamiento génico.

4. OBJETIVOS

Objetivo Principal

1. Inmunodetectar a la proteína de fusión PAX3-FKHR y nativa en células de rhabdomyosarcoma alveolar por medio de anticuerpos policlonales y monoclonales para emplearlos como sistema de detección en próximos ensayos en el INMEGEN.

Objetivos Particulares

1. Confirmar la expresión de PAX3-FKHR por medio de RT-PCR para seleccionar líneas celulares controles y experimentales.
2. Optimizar la técnica de extracción de proteínas totales para obtener una buena calidad e integridad proteica.
3. Estandarizar la técnica de electroforesis y Western blot para poder realizar una identificación certera de las proteínas de interés.
4. Evaluar los anticuerpos seleccionados para la identificación de la proteína de interés y así poder elegir los anticuerpos con menor ruido de fondo y por tanto más específicos.

5. METODOLOGÍA GENERAL:

Para aspectos más detallados a cerca de material y métodos empleados consultar el anexo I.

Cultivos Celulares. Se utilizaron líneas celulares de RMSA, que expresan el gen de fusión PAX3-FKHR y líneas celulares de RMSE como controles, ya que no expresan el gen de fusión.

El mantenimiento de las líneas celulares humanas de RMSE (RD y SMS), RMSA (RH28, RH18 y RH30) fueron cultivadas en DMEM (Gibco) adicionado con penicilina, estreptomina y fungizone (Gibco) y suplementado con 10% de suero bovino fetal (Gibco). Las células se mantienen en una incubadora humidificada con 5% de CO₂ y con una temperatura de 37°C. Para la extracción de proteínas se emplearon pellets celulares congelados a – 80 °C y células en cultivo.

Extracción de RNA. La extracción de RNA se llevo a cabo empleando trizol/cloroformo. El RNA precipitado se resuspendió en H₂O y guardado a – 80°C. La calidad de los RNA se evaluó por medio de geles desnaturalizantes de agarosa con formaldehido y la concentración se determino por medio de espectrofotometría UV, empleando el ND-1000 Spectrophotometer; la proporción 260/280 deberá ser mayor a 1.8 en todos los casos.

Análisis de RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR). La expresión de PAX3-FKHR fue evaluada por RT-PCR en las líneas celulares que expresan el gen de fusión (RH30, RH18 y RH28) y las que no lo expresan (RD y SMS). Una vez obtenido el cDNA que se amplifica y cuantifica por PCR en tiempo real (qPCR). La síntesis de cDNA de muestras de RNA total se realizó con la transcriptasa reversa MultiScribe con hexámeros aleatorios (Applied Biosystems). El cDNA será cuantificado por qRT-PCR utilizando el 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) y la mezcla de reacción TaqMan Universal PCR master mix (Applied Biosystems). Como control para cada línea celular se emplea GADPH para demostrar que existe expresión en todas las líneas celulares y que la técnica se realizó adecuadamente. Así como corroborar que las líneas que no amplifican para PAX-FKHR es debido a que no tienen el gen de fusión. Los niveles de expresión se normalizan utilizando como control interno al gen de la unidad 18s del RNA ribosomal (rRNA).

Extracción de Proteínas. Se comenzó por extraer las proteínas totales de pellets celulares almacenadas a - 80 °C, evaluando la integridad proteica por medio de una electroforesis SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. Las bandas obtenidas no se observaron bien definidas, por lo que se decidió extraer proteínas totales por raspado directo en la caja de cultivo, con lo que se mejoró la integridad. Sin embargo, se mejoró aun más la integridad proteica empleando PBS 1x frío para despegar las células de las placas de cultivo.

Los extractos de proteínas totales de las cajas de cultivo se realizaron utilizando buffer Urea/Thiourea (7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS) y 1 ml de inhibidor de proteasas (GE) por cada 1×10^7 células.

Tanto la proteína de fusión como las nativas se expresan en el núcleo por lo que no basta con agitación constante, si no que, es necesario aplicar otra fuerza mecánica como la sonicación por un tiempo breve para asegurar la ruptura de las membranas nucleares. Para mejorar la calidad de la muestra se precipitó la proteína con acetona y se calculó el volumen de buffer de extracción requerido por número de células sabiendo que se necesita 1ml de buffer por cada 1×10^7 células.

Análisis de la Expresión proteica.

a) Cuantificación de proteínas. La cuantificación de proteínas totales se realizó empleando el kit 2D Quant. Tomando en cuenta los siguientes lineamientos $m = 0.009 \pm 1$, $r^2 = +0.98$ y $DEA \pm 15 \%$.

b) Electroforesis SDS-PAGE evaluando integridad. Se eligió el porcentaje adecuado de acrilamida (7.5 %), para realizar la electroforesis, de acuerdo al peso molecular de la proteína de interés. Una vez que en los geles de electroforesis se observaron bandas bien definidas y un corrimiento adecuado se procedió a elegir el mejor método para la transferencia.

c) Wester blot. Electrotransferencia y Detección. Para monitorear el nivel de expresión de la proteína PAX3-FKHR en células de RMS se realizó WB con anticuerpos anti PAX3, anti FKHR y anti PAX3-FKHR.

Una vez extraídas las proteínas totales, de cada línea celular, se fraccionaron 30 μ g de proteína en un gel de agarosa al 7 % y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se incubó por una hora en buffer TBS-Tween con 5% de leche en polvo para bloquear la unión proteica no específica, y posteriormente, son tratadas con el anticuerpo primario por 24 horas, y a continuación con el anticuerpo secundario correspondiente. La visualización se realizó por quimioluminiscencia del Kit ECL Plus Western Blotting Detection System (GE /Amersham).

Para corroborar que la técnica del WB esta realizada adecuadamente se debe de correr siempre un control positivo, que en este caso es actina, que como se sabe es una proteína estructural fibrosa y por lo tanto todas las células lo expresan.

En la tabla de abajo se muestra la lista de anticuerpos evaluados y algunas de sus características como el sitio de unión a la proteína, la dilución empleada y hospedero del cual proviene.

Tabla 9. Lista de anticuerpos evaluados

Anticuerpo evaluado	Compañía	# Cat	Sitio de unión	Dilución empleada	Hospedero
PAX3					
Pax3 Policlonal	Abcam	ab15717	Extremo N terminal de PAX3 (residuos 2-12)	1:500	cabra
Pax3 N-terminal Polyclonal	Novus Biologicals	NB100-1420	Extremo N terminal de PAX3 (residuos 2-12)	1:500	cabra
PAX3-FKHR policlonal	ProteinTech Group, Inc	51036-2-AP	Reconoce PAX3 (residuos 11- 333 a.a)	1: 400	conejo
Pax3 (C-20) C-terminal policlonal	Santa Cruz Biotechnology Inc	sc-34916	Extremo C-terminal de PAX-3.	1: 500	cabra
Pax3 (L-14) policlonal	Santa Cruz Biotechnology Inc	sc-34918	Reconoce región interna de PAX-3.	1: 500	cabra
FKHR					
FKHR (N-18) policlonal	Santa Cruz Biotechnology Inc	sc-9809	Extremo N-terminal of FKHR .	1: 500	cabra
FKHR (C-20) policlonal	Santa Cruz Biotechnology Inc	sc-9808	Extremo C-terminal de FKHR.	1: 500	cabra
FKHR H128	Santa Cruz Biotechnology Inc	sc-11350	Reconoce de 471-598 a.a de FKHR	1: 500	cabra

6. RESULTADOS

6.1 Expresión de gen de fusión en líneas celulares de rhabdomyosarcoma.

Una vez obtenido el RNA se realizó la cuantificación, por espectrofotometría, obteniéndose los resultados de la tabla 10.

Tabla 10 .Concentración de RNA total en líneas celulares

Línea celular	260/280	260/230	ng/ ul
RH30	2.06	2.29	1606.9
RH18	1.97	1.28	428.86
RH28	1.96	1.23	915.39
RD	2.06	2.28	1000
SMS	1.95	1.01	1000

La integridad del RNA se comprobó con un gel de agarosa al 1.5% en condiciones desnaturizantes, observándose las 2 subunidades ribosomales 28S (4.8 kb) y 18S (1.8kb). Se visualizan estas bandas debido a que el RNA ribosomal constituye la mayor parte del RNA celular cerca del 85 al 90%.

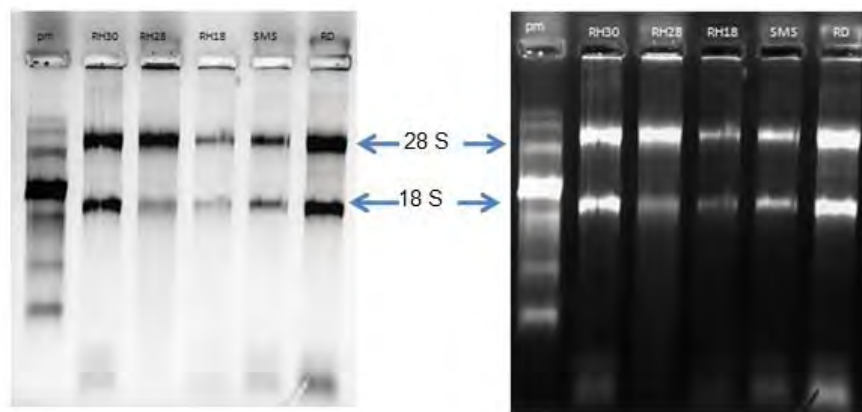


Figura 2. Geles desnaturizantes de RNA. Se muestra tanto el gel normal como el invertido de la integridad del RNA de las líneas evaluadas, en donde, podemos observar las bandas bien definidas de las subunidades ribosomales 28S y 18S.

La expresión de PAX3-FKHR fue evaluada por RT- PCR en las líneas celulares que expresan el gen de fusión (RH30, RH18 y RH28) y las que no lo expresan (RD y SMS).

El parámetro fundamental de una qPCR es el denominado ciclo umbral o CT, que se define como el ciclo a partir del cual la fluorescencia es estadísticamente significativa por encima del ruido de fondo y es inversamente proporcional al número de copias inicial del templado.(Elizabeth Van Pelt-Verkuil 2008).

Las principales propiedades de este parámetro son: separar los datos del ruido de fondo y determinar el ciclo inicial de amplificación.

Los resultados obtenidos para cada línea celular son los siguientes:

Tabla 11. Valores de expresión de PAX3-FKHR y GADPH en líneas celulares.

Línea celular	GADPH CT	PAX3-FKR CT
RH30	16.4253	24.4196
RH18	15.9317	24.6208
RH28	16.2345	25.0874
RD	16.0983	Indeterminado
SMS	15.9867	Indeterminado

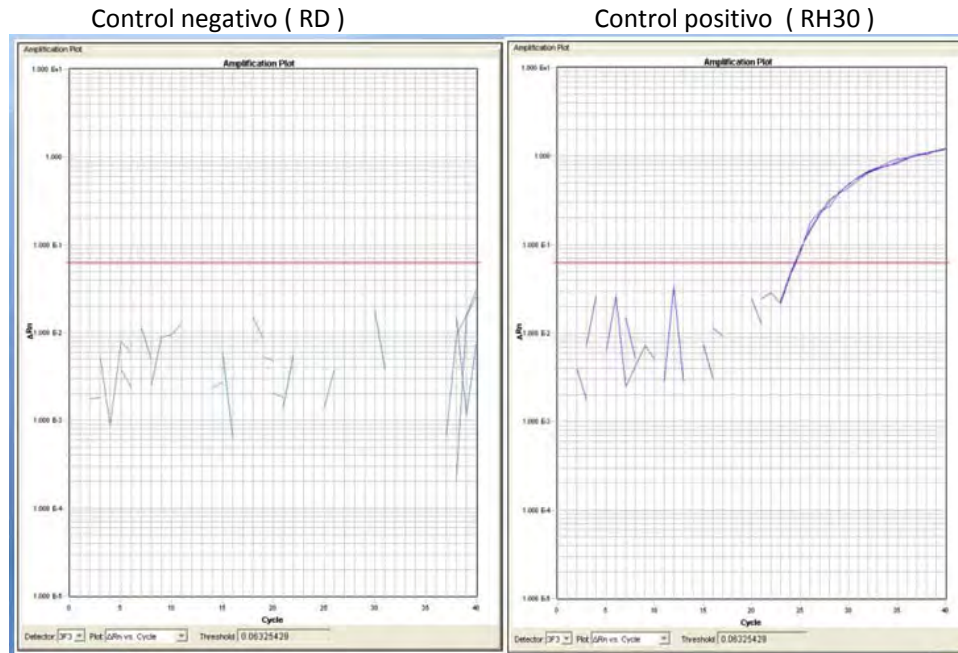


Figura 3. Gráficas de amplificación para PAX3-FKHR de las líneas celulares RD y RH30.

Se muestran dos gráficas en fase logarítmica de CT para la línea celular que expresa el gen de fusión (RH30) y otra que no expresa el gen de fusión (RD).

6.2 Expresión proteica de PAX3-FKHR por medio de WB.

6.2.1. Extracción de proteínas

En la tabla 13 se muestran los datos de la curva de calibración de albúmina, BSA, para la cuantificación de proteínas totales. Con los datos anteriores se obtuvo el gráfico 1 el cual se empleo para conocer la concentración proteica en $\mu\text{g} / \text{ul}$ de cada línea celular indicada en la tabla 12. La tabla 14 indica los valores de absorbencia por duplicado de cada una de las líneas celulares.

Tabla 12. Concentración empleada de cada línea celular

Muestra	Control positivo		Control negativo	
	RH30	RH18	RD	SMS
Concentración [ug / ul]	0.51	1.45	2.03	1.9

Tabla13. Datos curva de calibración para la cuantificación de proteínas

[]	Abs	[]real std	%DEA
0,000	0,760	0,000	0,000
20,000	0,610	19,250	3,750
30,000	0,539	28,125	6,250
40,000	0,462	37,750	5,625
50,000	0,368	49,500	100,000

Gráfico 1. Curva de calibración de BSA

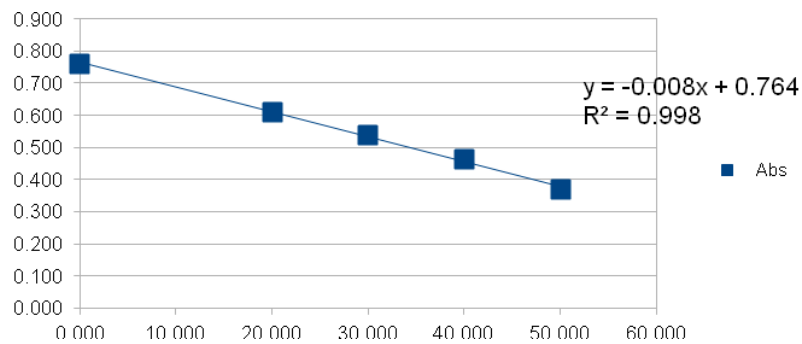


Tabla 14. Valores de absorbencia de las muestras y su concentración

Muestras	RH30	RH18	RD	SMS
ABS	0,733	0,707	0,681	0,683
	0,754	0,705	0,693	0,698
Promedio	0,7435	0,706	0,675	0,683
ABS	0,74	0,71	0,68	0,69
[]	2,56	7,25	10,13	9,50
[real por ul]	0,51	1,45	2,03	1,90

6.2.2. Separación de proteínas por SDS-Page.

Para corroborar que las proteínas empleadas no se encuentran degradadas se realizó un gel en SDS-PAGE, mostrado en la figura 4, en el cual se comparan extractos proteicos de líneas celulares congeladas (4A) y líneas cultivadas (4B). Observe el bandeo integró en el gel de la derecha.

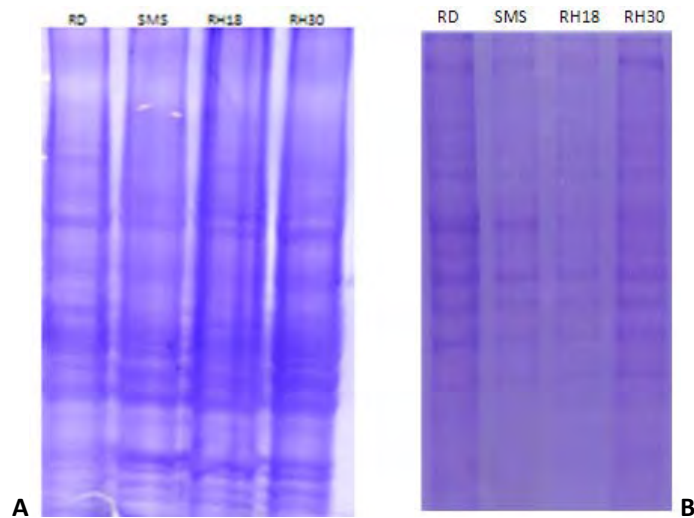


Figura 4. Geles SDS-PAGE de integridad proteica. El gel de la izquierda indica una baja integridad proteica, notándose el corrimiento de las muestras en todos los carriles lo cual indica degradación de las mismas; mientras que el gel de la derecha es un bandeo integro de proteínas. Ambos teñidos con azul de Coomasie.

6.2.3. Transferencia

La transferencia en cámara semi-seca es la mejor opción para proteínas de bajo peso molecular, sin embargo como el peso de la proteína quimérica es de 96 KDa se opto por la transferencia en cámara húmeda. Cabe destacar que el proceso de transferencia es un punto crucial para la técnica por lo que se debe de tener algunas precauciones importantes como: equilibrar tanto los geles, membranas y papel filtro adecuados con el buffer de transferencia debidamente preparado, sin ajustar pH; así como las condiciones (amperaje, voltaje, y resistencia) a las cuales se realiza la transferencia.

6.2.4 Detección

Para detectar la proteína de fusión es necesario evaluar los anticuerpos primarios con los que contamos en el laboratorio y así elegir cuál anticuerpo primario genera menor reacción cruzada y reconoce a la proteína quimérica y a las proteínas nativas o a ambas.

A continuación se muestra una tabla con todos los anticuerpos evaluados, así como sus sitios de unión y los resultados obtenidos. Después se colocó un esquema representativo de la proteína nativa y la de fusión para ubicar aproximadamente donde se une el anticuerpo. Posteriormente se observa las imágenes escaneadas de los anticuerpos evaluados.

Tabla 15. Resultado de los anticuerpos evaluados.

Anticuerpo evaluado	Sitio de unión	Lo observado en los escaneos.
PAX3		
1.Pax3	Extremo N terminal de PAX3 (residuos 2-12)	Reconoce PAX3 nativo, sin embargo, se obtuvieron numerosas bandas lo que significa que la reacción cruzada es alta.
2.Pax3 (N-terminus)	Extremo N terminal de PAX3 (residuos 2-12)	Reconoce PAX3 nativo pero se obtuvieron numerosas bandas.
3.PAX3-FKHR	Reconoce PB de PAX3 (residuos 11-333)	Reconoce PAX3-FKHR y Pax3 nativo.
4.Pax3 (C-20)	Extremo C-terminal de Pax-3.	Reconoce PAX3 nativo, observándose bandas en la zona donde se ubica esta proteína cuyo peso es de 56 KDa, tanto en las líneas con RMSA (RH30 y RH18) como en las de RMSE (RD y SMS). Aunque existe reacción cruzada.
5.Pax3 (L-14)	Reconoce región interna de Pax-3.	Reconoce la parte interna del gen nativo PAX3 por lo que en todas las líneas se visualiza la banda. Existe bandeo múltiple.
FKHR		
6.FKHR (N-18)	Extremo N-terminal of FKHR .	Reconoce FKHR nativo, sin embargo, se observa reacción inespecífica.
7.FKHR (C-20)	Extremo C-terminal de FKHR.	Reconoce PAX3-FKHR y FKHR nativo pero se observa reacción cruzada.
8.FKHR (H128)	Reconoce de 471-598 a.a de FKHR	Reconoce FKHR nativo y PAX3-FKHR.

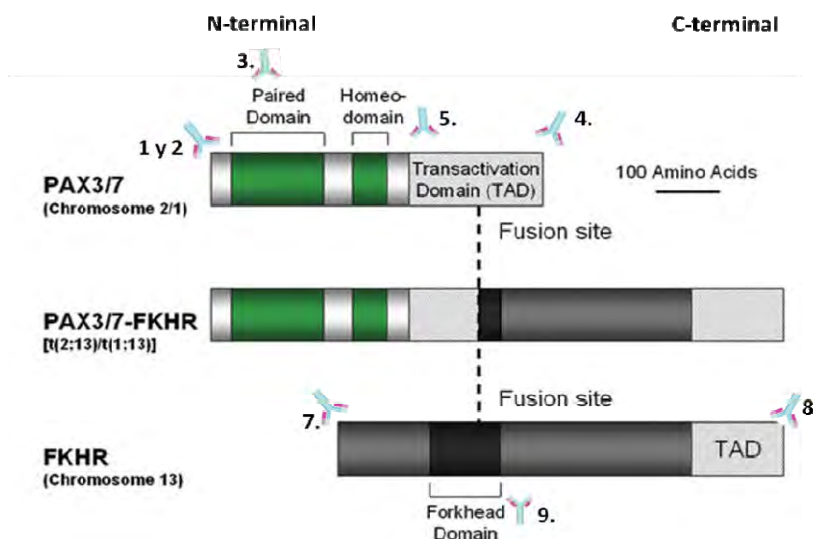
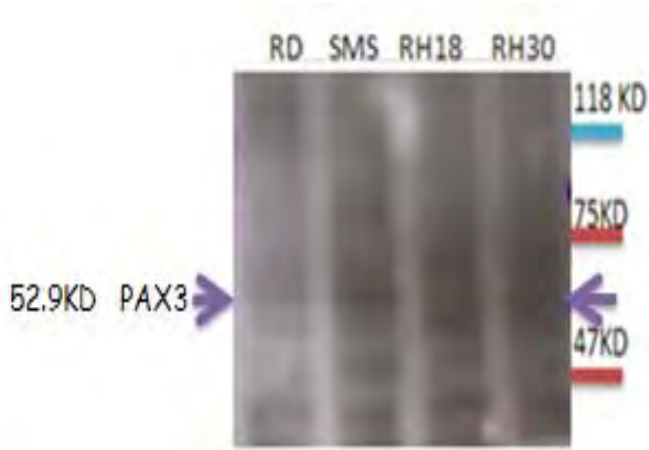


Figura 5. Esquema de las proteínas nativas y la de fusión representando los sitios de unión de los anticuerpos evaluados

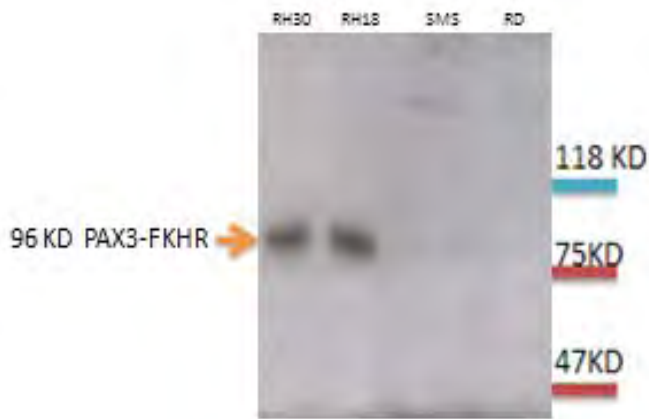
1.Pax3



2.Pax3 (N-t)



3.PAX3-FKHR



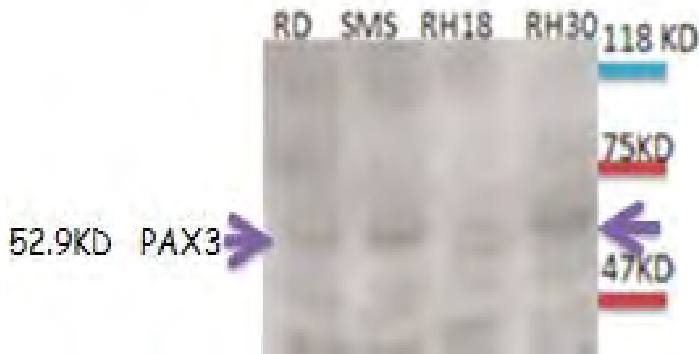
4.Pax3 (C-20)



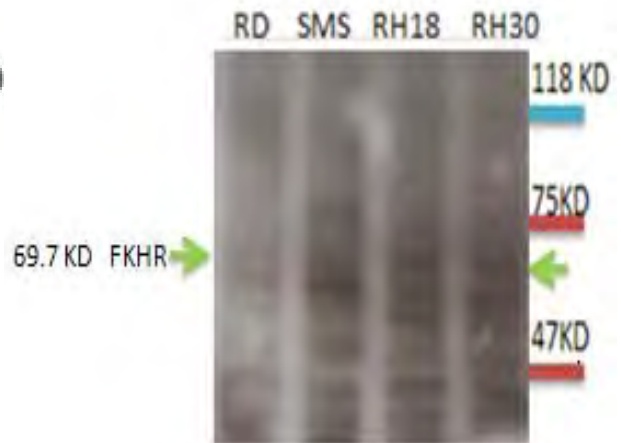
Control de actina



5.Pax3 (L-14)



6.FKHR (N-18)



7.FKHR (C-20)



8.FKHR (H128)

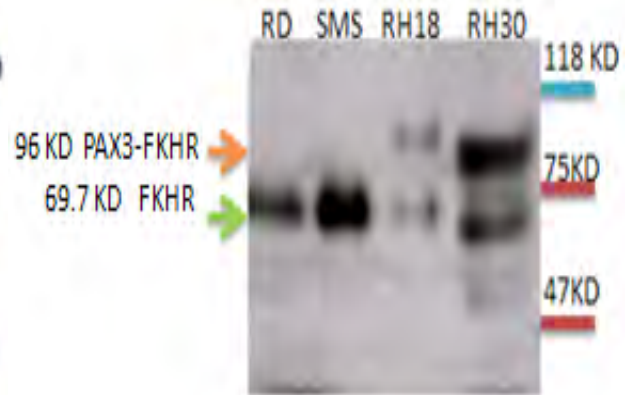


Figura 6. Imágenes escaneadas de los films de los diferentes anticuerpos evaluados. De arriba abajo 1.Pax3, 2.Pax3 (N-t), 3.PAX3-FKHR, 4.Pax3 (C-20), 5.Pax3 (L-14), 6.FKHR (N-18),7. FKHR (C-20), 8.FKHR (H128) y el control positivo actina.

7. DISCUSIÓN.

7.1 Expresión del gen de fusión en rhabdomiomas.

Para conocer la expresión de un gen se evalúa el RNA, la técnica de extracción de material genético comúnmente empleada es la trizol/cloroformo debido a su facilidad de manipulación (Tan 2009). Para extraer el material genético se debe de facilitar la ruptura de las membranas celulares y nucleares por métodos físicos, una vez liberado el material genético se realiza la separación con trizol/cloroformo la cual permite la disgregación de restos celulares y proteínas del material genético. El trizol desnatura y solubiliza las proteínas y componentes celulares, mientras que el cloroformo permite la separación de las fases durante la centrifugación, además de también ser desnaturante RNA; para precipitar el material genético se emplea isopropanol el cual compite con el RNA para la formación de puentes de hidrógeno con el agua haciendo que se desestabilice la molécula perdiendo solubilidad en el medio (Tan 2009).

Una vez obtenido el RNA se realizó la cuantificación para cada muestra, por espectrometría. Se debe tomar en cuenta la relación 260/280 la cual indica la pureza del material genético. Si el ratio es menor a estos valores indica la presencia de proteínas, solventes orgánicos y otros contaminantes que absorben cerca de 280 nm. La relación 260 / 230 es un segundo indicador de la pureza, ya que nos muestra la presencia de contaminantes que absorben a esa longitud de onda como proteínas (Scientific 2008).

Analizando las muestras obtenidas, de acuerdo a los rangos antes mencionados, observamos que todas las muestras cumplen las condiciones de 260/ 280 mayor a 1.8, mientras que, el rango de 260/230 se encuentra debajo de 2.0 en las muestras RH18, RH28 y SMS lo cual nos indica la presencia de contaminantes como proteínas las cuales absorben a 230 nm. Para realizar los ensayos de RT-PCR es necesario verificar que el RNA esté integro y para hacerlo se evalúan las bandas ribosomales 28S y 18S (Tan 2009). En la figura 2 se pueden observar las bandas ribosomales de las diferentes muestras, en donde se cumple la relación $28s/18s \geq 1.2$, es decir, la banda 28s se observa más intensa que la banda 18s.

La qPCR está basada en la actividad de exonucleasa de la Taq Polimerasa, en este ensayo se emplean oligonucleótidos y una sonda marcada con un fluorocromo en su región 3' y un quencher en la región 5'. Los oligos y la sonda se unen a la secuencia específica y la Taq polimerasa con su actividad exonucleasa libera el quencher, permitiendo la medición de la emisión del fluorocromo y en base a esta emisión se calcula la tasa de generación del amplicon en cada ciclo (Elizabeth Van Pelt-Verkuil 2008).

Queríamos que identificar qué línea celular expresa el gen de fusión PAX3-FKHR por lo que se realizó una RT-PCR para amplificar el cDNA. Aquellas líneas que expresan el gen de fusión PAX3-FKHR son: RH30, RH18, RH28 y las que no lo expresan RD y SMS.

En la figura 3 se muestran dos curvas de amplificación en fase logarítmica. La imagen de la derecha es la curva de amplificación para RH30, mientras que, la del lado izquierdo, perteneciente a RD, no tiene el gen de fusión y por lo tanto no se observa amplificación. La tabla 11 muestra los diferentes CT de cada línea celular, el cual representa el primer ciclo de la PCR donde se detecta el producto amplificado y entre más pequeño sea su valor se cuenta con mayor material genético(Elizabeth Van Pelt-Verkuil 2008). Por lo tanto las líneas control positivo para el gen de fusión son RH30, RH18 y RH28, mientras que los controles negativos son SMS y RD. En este trabajo se emplearon como líneas positivas para el gen de fusión PAX3-FKHR las células RH30 y RH18 y como control negativo las líneas SMS y RD.

7.2 Expresión proteica de PAX3-FKHR por medio de WB.

7.2.1. Extracción de proteínas.

Una vez identificadas las muestras de trabajo se procedió a optimizar la técnica de extracción de proteínas ya que se tenían muchas dificultades para lograr obtener proteínas no degradadas. Se comenzó a extraer proteínas totales de pellets congelados, en donde aunque se obtenía buena cantidad de proteínas, éstas estaban degradadas tal como se observa en el gel teñido con azul de Comassie de la figura 4A. Las proteínas totales obtenidas estaban degradadas debido a que al pellet congelado no se le adicionaba ningún inhibidor de proteasas antes de su congelación y además no se agregaba ningún agente crioconservante al paquete celular por lo que, la diferencia de temperaturas seguramente ocasionó un choque térmico y la liberación del contenido celular incluidas las proteasas justificando así la degradación proteica.

Debido a lo anterior se decidió extraer directamente, por raspado, de la caja de cultivo las células pero la concentración variaba en cada ensayo y la integridad proteica no mejoraba por lo que se procedió a modificar la técnica de extracción. Se agregó directamente sobre las células adherentes PBS 1x frío, favoreciendo el desprendimiento celular, con posterior recolección del medio para obtener el pellet por centrifugación, en lugar de realizarlo por raspado ya que se observó que debido a que se agregaba poca cantidad de buffer de extracción quedaban remanentes celulares en la caja. Se prefirió extraer el pellet con PBS en lugar de tripsina, al ser una proteasa, podría interferir en la degradación de algunas proteínas. Una vez obtenido el pellet se procedió a contabilizar las células y a adicionar 1 ml de buffer de extracción por cada 1×10^7 células y por cada 1 ml de buffer 10 ul de inhibidor de proteasas. El inhibidor de proteasas contiene inhibidores reversibles como: leupeptinin (inhibe serin y cistein cinasas), pesptatin (inhibidor de aspartil proteasas) y aprotinin (inhibe serin proteasas) y pequeños péptidos los cuales pueden interferir en la cuantificación de la proteína incrementándola.

Como la proteína de interés se localiza mayoritariamente a nivel nuclear, debido a ser un factor de transcripción, (Fredericks, Galili et al. 1995) es necesario lisar el agregado celular a través de sonicación, lo cual asegura la ruptura de las membranas celulares y nucleares. Cabe mencionar que la recolección de proteínas fue de la fase soluble, la cual se precipitó con acetona para concentrar la proteína total y el pellet obtenido se hidrata con buffer y se procede a su cuantificación. Antes de cuantificar es recomendable realizar una electroforesis para observar la integridad de las proteínas, tal como se muestra en la figura 4B, donde se compara una corrida de proteínas degradadas con otra en correcto estado, observándose las bandas bien definidas.

El kit empleado para cuantificar proteínas totales fue el 2D-Quant de Amersham el cual se basa en la precipitación semicuantitativa de proteínas dejando de lado las sustancias que interfieren en la solución como: detergentes, agentes caotrópicos y anfolitos por unión específica de los iones Cu^{2+} a la proteína por lo que la absorbencia del ensayo disminuye con el incremento de la concentración de proteína. Para realizar la cuantificación no se tuvieron problemas ya que la metodología estaba correctamente establecida. En la gráfica 1 se muestra la curva de calibración que cumple con los requisitos del laboratorio para una recta, teniendo una $r^2 = 0.99 \pm 0.01$ y una $m = 0.008 \pm 0.001$. Para cada extracción se realizó la cuantificación correspondiente, sin embargo, en la tabla 12 sólo se muestra la cuantificación de las concentraciones empleadas para el Western blot.

7.2.2 Separación de proteínas por SDS-PAGE

La electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecilsulfato de sodio, SDS-PAGE, consiste en el movimiento de proteínas cargadas negativamente a través de una matriz inerte al aplicar un campo eléctrico (Scofield 2009). Se debe elegir el porcentaje de acrilamida de acuerdo a la proteína de interés. Se realizaron geles de acrilamida al 10 % y 7.5 % hallándose en este último una mejor separación y empleando esta concentración de acrilamida en todos los geles.

7.2.3. Transferencia

El Western Blot es una técnica para identificar proteínas en una mezcla compleja de proteínas, transfiriendo las proteínas de un medio gelificado a una membrana en la cual queden fuertemente adheridas. La membrana es una copia exacta del patrón del gel, a este paso se le conoce como transferencia, y desde mi experiencia práctica es uno de los pasos con mayor importancia para obtener un ensayo adecuado.

Para realizar la transferencia empleé los dos tipos de electro difusión, uno en cámara húmeda y otro en cámara semi-seca, para observar cuál de las dos técnicas obtenía un mejor resultado. La transferencia húmeda es más eficiente para la proteína de fusión (Kurien and Scofield 2006), ya que se recomienda emplearla para proteínas de peso molecular mayor a 90 KDa e hidrofóbicas.

La membrana se debe de bloquear con leche con el fin de incrementa la sensibilidad del ensayo y disminuir la interferencia. Posteriormente se realizan ensayos con las diluciones de los anticuerpos primarios evaluados de la tabla 6. Tras lavar la membrana para eliminar el anticuerpo primario que no se ha unido, se expone al anticuerpo secundario que reconoce de forma específica al anticuerpo primario. En este caso los anticuerpos secundarios están marcados con una enzima reportera como la peroxidasa del rábano (HRPO).

7.2.4 Detección.

La detección se puede realizar por unión directa al del anticuerpo primario marcado a la superficie de la membrana o de forma indirecta en donde se emplea un anticuerpo secundario que se une al primario lo cual ayuda a amplificar la señal. En este ensayo se empleó el kit comercial ECL Western Blotting, basado en la generación enzimática de un éster de acridina que procede de la actividad peroxidasa de la HRPO dando una mayor intensidad y duración de la emisión de luz. Este método es muy útil, porque permite conseguir una mayor sensibilidad variando el tiempo de exposición de la película autorradiográfica además de que el resultado obtenido puede ser fácilmente fotografiado o digitalizado como los obtenidos en este trabajo.

En la tabla 6 se muestran los anticuerpos empleados y más detalles acerca del sitio de unión al polipéptido así como la dilución y hospedero de cada uno. Para fines prácticos se realizó un esquema que muestra los sitios de unión de los anticuerpos primarios a la proteína de fusión y nativas en la figura 5. Recordemos que si el anticuerpo primario es de cabra el anticuerpo secundario debe de ser de anti-cabra, partiendo de ese hecho y analizando el conjunto de las imágenes de los films por escaneo encontramos que en la mayoría de los films se observan múltiples bandas, lo cual se le denomina reacción cruzada, y es debido a la unión inespecífica del anticuerpo primario. En este caso los anticuerpos evaluados reconocen secuencias polipeptídicas que pueden ser semejantes en alguna otra proteína dando como resultado un bandeo múltiple. Para corroborar lo anterior se realizó un blast de proteínas en NCBI. El enlace del programa bioinformático es el siguiente:

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome, el cual permite realizar la búsqueda de secuencias de aminoácidos similares a la de interés en una misma especie. Solo se debe de introducir la secuencia de a.a de interés, antecedido por un símbolo mayor que >, y seleccionar la base de datos de elección así como el organismo de interés u organismo de exclusión.

En esta búsqueda se encontró que la secuencia de aminoácidos es compartida por varias proteínas que pueden ser reconocidas por el anticuerpo primario. Los anticuerpos 1 y 2 (Pax3 y Pax3 N-t) reconocen una secuencia de 10 a.a, de los residuos 2 al 12 de PAX3 que es la siguiente: ttagavprmm. Esta secuencia es muy reducida en la cantidad a.a por lo que la probabilidad de homología con otras proteínas es alta.

De acuerdo al resultado obtenido esta secuencia es homóloga en otras proteínas como: metiltransferasas, proteínas de transporte nuclear, proteína inhibitoria de STAT, huntingtina, cadena B del receptor de células T, calpastatina, topoisomerasa entre otras.

Los anticuerpos 5, 6 y 7 (Pax3 L-14, FKHR N- 18 y FKHR C-20) no indican la secuencias específica de aminoácidos a la cual se unen, sólo hacen mención que reconocen la parte interna L-14 de PAX3, y las regiones terminales, N-terminal y C-terminal, de FKHR respectivamente. Así que no se puede realizar un estudio más detallado. Además en la hoja técnica se menciona que no son específicos para la proteína de humano si no también se puede emplear para la detección de la proteína en otras especies; como la canina, equina, porcina, bovina y aviar, disminuyendo así su especificidad. Los ejemplos anteriores muestran que estos anticuerpos si reconocen las regiones de la proteína PAX3, FKHR o de fusión pero también otras secuencias de a.a de diversas proteínas observándose así múltiples bandeos, como lo muestra la figura 6.

Una forma de solucionar este bandedo puede ser diluir aun más el anticuerpo primario para evitar que se una a regiones no requeridas o bloquear por más tiempo la membrana para disminuir el ruido de fondo. También se puede extraer únicamente proteínas nucleares, ya estos factores de transcripción se expresan mayoritariamente en el núcleo, y con lo anterior disminuir las posibles uniones de los anticuerpos a otras proteínas. Así en la tabla 12 describo los resultados que obtuve de cada anticuerpo evaluado y debajo se muestra una imagen de la zona de unión de los anticuerpos a la proteína.

Cabe señalar que no todos lo anticuerpos evaluados tuvieron reacción cruzada. El anticuerpo específico para el gen de fusión PAX3-FKHR que reconoce la PB de PAX3 develó en el film sólo 2 bandas que corresponden a las líneas que portan el gen de fusión que son positivas para RMSA, RH18 y RH30, esto concuerda con el ensayo de RT-PCR para el gen de fusión. Las líneas de RMSE no expresan esta proteína quimérica y por lo tanto no se observa banda alguna en el film.

Este anticuerpo reconoce los residuos 11-333 de PAX3 que es la siguiente secuencia de a.a.:

```
11 mmpgpgqny prsgfplevs tplgqgrvnq lggvfingrp lpnhirhkiv
61 emahhgirpc visrqlrvsh gcvskilcry qetgsirpga iggskpkqvt tpdvekkiee
121 ykrenpgmfs weirdkllkd avcdrntvps vssisrilrs kfgkgeeeea dlerkeaees
181 ekkakhsidg ilserasapq sdegdsidse pdlplkrkqr rsrtftaeq leelerafe
241 thypdiytre elaqraklte arvqvwfsnr rarwrkqaga nqlmafnhli pggfpptamp
301 tlptyqlset syqptsipqa vsdpsstvh r pqp
```

A esta secuencia también se le realizó un blast de proteínas y sólo se encontró homología para la PB de PAX3. Tanto de manera virtual como experimental se demuestra que este anticuerpo no genera reacción cruzada, nótese que el anticuerpo reconoce 322 a.a y no sólo 10 a.a como los ejemplos anteriores.

Otro anticuerpo que detecta tanto el gen de fusión PAX3-FKHR como el gen nativo para FKHR es FKHR H128 que se une al extremo C-terminal de los a.a. 471 a 598 que son:

471 pphndimtpv

481 dpgvaqpnsr vlgqnvmmgp nsvmstygsg ashnkmmnps shthpghaqq tsavngrlp

541 htvstmphts gmnrltqvkt pvqvplphpm qmsalggysv vsscngygrm gllhqekl

De acuerdo al resultado en NCBI esta secuencia tiene un 100 % de identidad con el dominio forkhead de FKHR y con la proteína de fusión PAX3-FKHR. En la parte experimental se observa que reconoce a ambas proteínas y como es de notarse tanto en las líneas de RMSE (SMS y RD) y RMSA (RH18, RH 30) detecta el gen nativo para FKHR y en las últimas el gen de fusión.

Por lo que los anticuerpos elegidos para emplearse en próximos ensayos de investigación dentro del INMEGEN son PAX3-FKHR y FKHRH128.

8. CONCLUSIÓN

- Se logró identificar por medio de RT-PCR a las líneas celulares que expresan el gen de fusión PAX3-FKHR que fueron: RH30, RH18 y RH28; mientras que las que no lo expresan son RD y SMS.
- Se consiguió optimizar la técnica de extracción de proteínas totales logrando alcanzar una buena cantidad y calidad de la mismas
- De manera exitosa se estandarizó la técnica de Western Blot utilizándose una amplia gama de anticuerpos.
- Aunque la mayoría de los anticuerpos evaluados presentaron reacción cruzada, se identificaron dos anticuerpos que generaron bandas claras, estos fueron: el anticuerpo número 3 PAX3-FKHR y el número 8 FKHR128 ambos reconocen a la proteína de fusión y solo FKHR128 reconoce a la proteína nativa de FKHR, por lo que pueden ser empleados para futuros ensayos.

Sugerencias y Perspectivas

La técnica de Western Blot, el cual es un ensayo muy empleado actualmente para la identificación de una proteína en una mezcla de proteínas pero no deja de ser en cierta forma, artesanal, laboriosa, repetitiva pero aun así es una técnica divertida y que cuando se logra el resultado esperado es muy satisfactoria.

La mayoría de los anticuerpos evaluados presentaron reacción cruzada con otros polipéptidos por lo que propongo fraccionar el lisado celular para recupera solo las proteínas nucleares, incrementar el tiempo de bloqueo o disminuir la dilución del anticuerpo primario. También se podría generar en el laboratorio un anticuerpo específico para las proteínas nativas, PAX3 y FKHR, y para la proteína de fusión PAX3-FKHR.

ANEXO I

Material y Metodología:

Metodología para la extracción de RNA de líneas celulares.

Homogenización

1. Lavar las células con PBS
2. Agregar la cantidad adecuada de Trizol de acuerdo al volumen del pellet. Relación 1:1
3. Homogenizar y pasar a un tubo de 1.5ml.
4. Dar vortex ligero.
5. Usar una jeringa para lisis de las células de forma lenta.
6. NO agregar agua al homogenizado
7. Opcional, se puede guardar a -70°C .

Separación de fases.

1. Incubar el homogeneizado por 5min, de $15-30^{\circ}\text{C}$ (temperatura ambiente para permitir la completa disociación del complejo nucleoprotéico).
2. Agregar 0.2ml de cloroformo por cada 0.75 ml de trizol.
3. Tapar adecuadamente los tubos.
4. Vortexear, hasta obtener una coloración rosa pastel, e incubar a Temperatura ambiente por 15 minutos.
5. Centrifugar la muestra a máximas rpm (14,000) por 15 minutos a 4°C .
6. Después de la centrifugación la mezcla se separa en dos fases:
 - a. Fase de abajo: fenol-cloroformo
 - b. Interfase
 - c. Fase superior: fase acuosa
7. El RNA se encuentra exclusivamente en la parte ACUOSA.

Precipitación del RNA.

1. Transferir la fase acuosa a un tubo limpio, recolectar la fase orgánica si el DNA es deseado (evitar tomar algún fragmento de otra fase).
2. Precipitar el RNA con alcohol isopropílico (0.5ml de alcohol isopropílico por cada 0.75 ml de trizol).
3. Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
4. Centrifugar a 14 000 rpm por 10 min a 4°C

Lavado de RNA

1. Remover el sobrenadante
2. Lavar el pellet con etanol 75%, agregar al menos 1ml de etanol 75 % por cada 0.75ml de trizol.
3. Mezclar la muestra y centrifugar a 14 000 rpm por 5 minutos a 4°C .
4. Vaciar el sobrenadante y dejar secar 10 minutos.
5. Agregar 30 ul de agua.

Determinar la concentración de RNA en Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer.

Preparación de ensayo de retrotranscripción (RT-PCR). Empleando el kit high capacity.

1. Realizar un master mix de acuerdo a lo siguiente:

Reactivo	Cantidad (1x)	Concentración final
10x reverse transcription buffer	2.0 uL	2x
25x dNTP's 100 mM	0.8 uL	8 mM
10 x Random Primers (50 uM, 5nmoles)	2.0 uL	10 uM
MultiScribe RT (50U/uL)	1 uL	5 U/uL
RNA inhibitor	0.5 uL	1 U/uL
Agua libre de RNAsas	3.7 uL	
Total	10.0 uL	

2. Colocar el mix para cada reacción adicionando 10 uL de RNA previamente extraído y continuar con las condiciones de la técnica de retrotranscripción.

- Colocar los tubos en un termociclador bajo las siguientes condiciones.

Temperatura	Tiempo
25 °C	10 min
37 °C	120 min
4 °C	infinito

Nota: Las muestras se almacenan en congelador a -20 °C.

Ensayo de PCR tiempo real (qPCR) estándar.

- Realizar una mezcla con los siguientes reactivos y cantidades

Reactivos	Cantidad (μl) 1X	Concentración final
2X TaqMan Universal Master Mix (4304437, AB)	12.5	1x
PAX3/7-3 Forward (10μM)	1.5	600nM
FKHR-rev (10μM)	1.5	600nM
3F3 Probe (10μM)	0.25	100nM
7F Probe (10uM)	0.25	100nM
Muestra de cDNA	2	
Agua	8	
Total	25	

- Colocar cada reacción en un pozo de una placa de 96 pozos
- La placa se corre en el equipo ABI PRISM 7900HT Real Time PCR Instrument (Applied Biosystem) con las siguientes condiciones:

Temperatura	Tiempo
50°C	2min
95°C	10 min
95°C	15seg
65°C	1min
40 Ciclos	

Técnica de extracción de proteínas totales:

- Quitar el medio de las cajas de cultivo celular.
- Lavar con PBS 1x a temperatura ambiente.
- Agregar 3ml de PBS 1x frío, tapar la caja y dejar por 15 min en hielo.
- Recolectar las células, (despegar cuidadosamente con ayuda de la pipeta la monocapa celular) , en un tubo falcon de 15 ml.
- Centrifugar 1000 rpm por 3 min a temperatura ambiente.
- Realizar conteo celular. Mantener las células en hielo.
- Retirar el sobrenadante.
- Adicionar por cada 1×10^7 células 1 ml de Buffer de extracción, y por cada 1 ml de buffer de extracción agregar 10 ul de inhibidor de proteasas. (realiza tus cálculos de acuerdo al número de células que contaste).
- Homogeneizar y vortexear cada 5 min incubando por 15 min en hielo.
- Incubar por 30 minutos dando vortex cada 5 minutos.
- Sonicar: Condiciones generales: Amplitud: 30% Tiempo: 40 seg .
- Recolectar el sobrenadante en tubos ependorff de 1ml.
- Centrifugar a máxima velocidad 14.000 rpm por 10 min a 4°C.
- Recolectar el sobrenadante y realizar alícuotas de 60 ul y almacenar a -80 °C.
- Tomar una alícuota de cada línea para su cuantificación.

Nota: Las condiciones de amplitud y tiempo varían de acuerdo al tipo de proteínas de interés.

Metodología para la cuantificación de proteínas con el Kit 2D Quant.

Curva Standard							
No. Tubo		1	2	3	4	5	6
Vol. Sol BSA	ul	0	5	10	15	20	25
[] teórica BSA	ug	0	10	20	30	40	50

NOTA: Se puede adicionar de 1 a 50 ul de muestra.

1. Adicionar 500 ul precipitante, dar vortex por 12 seg y esperar por 3 min.
2. Agregar 500 ul de co-precipitante.
3. Dejar reposar a -20 °C por 30 min.
4. Centrifugar a 15 000 rpm por 16 min a 4 °C.
5. Remover los tubos de la centrifuga y retirar el sobrenadante aproximadamente 950 ul.
6. Centrifugar 15 00 rpm por 6 min a 4 °C. Retirar todo el sobrenadante y si aún queda húmedo poner en el concentrador de 5 a 10 min.
7. Adicionar 100 ul de solución de cobre y 400 ul de H2O Milliqli.
8. Dar vortex hasta que se haya resuspendido el sobrenadante
9. Adicionar 1 ml de la solución de trabajo. Mezclar por inversión.
10. Incubar a temperatura ambiente de 15 a 20 min.
11. Leer a 480 nm.

NOTA:

- a. Debe leerse dentro de los primeros 40 minutos a partir de adicionar la solución de trabajo.
- b. La absorbancia de ensayo disminuye con el incremento de la concentración de proteína.
- c. La solución de trabajo se prepara 100 partes del reactivo A por 1 parte del reactivo B.

- Criterios de aceptación.

M= 0.009 +- 1	%DEA= $\frac{(ct-cr)}{Ct} 100$
Coeficiente= r 2 = + 0.98	Ct= [] teórica std
% DEA = +- 15 %	Cr= [] real std

Para calcular [] proteína por ul.

Una vez obtenida la [] por la fórmula debe dividirse entre el volumen que se tomó la muestra y así tener los ug / ul de muestra. En este caso se adicionaron 2 ul por muestra

Método para realizar WB

1. Electroforesis

1. Lavar los cristales con agua y etanol y secar con kimwipes. Se pueden emplear cristales de 1 mm y 0.75 mm. Montar los cristales.
2. Preparar el gel separador de acuerdo al peso de la proteína de trabajo, vaciarlo y adicionar etanol al 70 % para eliminar la tensión superficial.

Porcentaje de gel	Peso en KD
4.5 %	> 250
7.5 %	250 – 120
10 %	120 – 40
13 %	40 – 15
15 %	< 20

3. Vaciar el etanol y secar el exceso con papel filtro.
4. Preparar gel concentrador al 4%, vaciarlo y poner peine de acuerdo a los cristales empleados (de lado para que no forme burbujas), esperar a que polimerice (20 min).
5. Preparar las muestras.
6. Quitar el peine, limpiar los pozos con agua desionizada.
7. Colocar los geles en la cámara de electroforesis y agregar buffer de corrida 1X llenando completamente la cámara interna permitiendo que se derrame un poco del buffer al exterior. (en la parte interior de la cámara tiene que ser nuevo, en la parte exterior puede ser reusado, hasta una vez).

Preparación de Geles de acrilamida:

	Separador (abajo)				Concentrador (arriba)
	5 %	7.5%	10 %	15 %	4.00%
Tris 8.8 c/SDS	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	
Tris 6.8 c/SDS	-	-	-	-	750 ul
Bis-acrilamida 30 %	1.69 ml	2.5 ml	3.3 ml	4.9 ml	500 ul
H2O	5.81 ml	5 ml	4.2 ml	2.6 ml	1 750 ul
PSA 10 %	100 ul	100 ul	100 ul	100 ul	40 ul
Temed	5 ul	5 ul	5 ul	5 ul	2 ul

Nota: El Tris 6.8 u 8.8 se puede preparar con SDS o sin SDS. Si se preparan sin SDS se agrega al gel 200 ul de SDS al 10 %.

Nota:

Si no se hace la máxima capacidad de geles por cámara, en lugar de vidrios poner el simulador de plástico. Los geles se pueden preparar un día antes y se mantenerlos ya montados en la cámara electroforética llenando la cámara interna con buffer de corrida 1x y dejar a 4°C.

5. Preparación de las muestras

5a1. Calcular el volumen necesario para 30ug de proteína por muestra de acuerdo a la concentración obtenida en la cuantificación.

5a2. Agregar el volumen restante de buffer de carga 2x hasta completar un volumen total de 25ul.

5a3. Incubar la proteína en el termoblock por 5 min a 90 °C.

5a4. Poner en hielo, y posteriormente cargar el gel con las muestras.

5a5. En el pozo uno se ponen 4 ul del marcador de peso molecular y enseguida las muestras. Si algún pocillo no se emplea adicionar 15 ul de buffer de corrida 2x.

Condiciones para la electroforesis

Correr primero a 70 V por 30 min permitiendo que se alineen las muestras, subir voltaje a 110 V y dejar correr por 2:00 hrs – 2:30 hrs. Debe correr todo, hasta que el buffer de carga este en el límite inferior del gel.

TRANSFERENCIA.

Preparación antes de la Transferencia:

- Una vez que el gel haya corrido lo suficiente, desmontar los vidrios, poner el vidrio chico hacia arriba, separar los vidrios con la ayuda de la espátula verde, haciendo que el gel quede en el vidrio grande y por lo tanto el carril #1, donde está el marcador de peso, queda del lado derecho y hacer una muesca en el lado inferior derecho.
- Cortar el gel concentrador y los carriles no utilizados.
- Se pueden emplear membranas de PVDF o de nitrocelulosa, (cortarlas de acuerdo al tamaño del gel). Si se usan membranas PVDF se deben activar con metanol por 20 seg y después en agua desionizada por 5 minutos para hacerlas hidrofílicas.

Sumergir por 20 minutos en buffer de transferencia frío los geles, las membranas y los filtros incubándolos a 4°C.

Preparación del Buffer de transferencia para transferencia semi-húmeda.

Preparar el buffer de transferencia de acuerdo al número de membranas.

Buffer de Transferencia 1X- con metanol al 20%

	ml (# de membranas)					
	125 (1)	250 (2)	375 (3)	500 (4)	625 (5)	750 (6)
Metanol	25	50	75	100	125	150
Buffer de transferencia 1X (hacer la dilución previa 1:5 del 5X)	100	200	300	400	500	600
AFORAR con agua desionizada al volumen deseado según el número de membranas que se van a transferir.						
OJO: como el metanol es miscible, hay que aforar ya que si no el volumen final es incorrecto.						
Nota:	Prepararlo el día que se va a utilizar. En lo que se utiliza mantenerlo a -20°C.					

Mezclarlos ese día mientras corre el gel y dejarlo enfriar a – 4 °C, no reusar.

Transferencia en cámara semi-húmeda.

- Limpiar con etanol y kimwipes el aparato de transferencia y transferir de la siguiente manera: Filtro o esponja → membrana PVDF → gel → Filtro o esponja
- Alisar entre cada uno para quitar todas las burbujas pasando un tubo a manera de rodillo.
- Agregar encima de cada sándwich 3 ml de buffer de transferencia

- **Condiciones transferencia semi-húmeda.**

Calcular el límite de corriente (amperaje): Σ área de las membranas x 5.5= límite de mA

Sumar el área de todas las membranas que se van a transferir por transblot y multiplicar por 5.5. El resultado dividirlo entre 1,000 para obtener el límite de Amperes.

Programar la fuente de poder: Volts: máximo 15 V
 Amperes: de acuerdo a la fórmula obtenida
 Tiempo: 20 min

Nota: Los amperajes dependen de las membranas a transferir y el tiempo varía conforme a la proteína de estudio, pero se puede comenzar con el tiempo recomendado.

En caso que se vayan a conectar dos transblots a una misma fuente de poder, y no tengan el mismo número de membranas, el límite de la corriente que se debe de utilizar es la de menor número de membranas.

Al término, desmontar el sándwich y cortar una muesca en la esquina inferior derecha de la membrana, para siempre usarla de ese lado. Escurrir y limpiar los equipos.

Transferencia en cámara Húmeda

Realizar el buffer de transferencia para cámara húmeda con tiempo anticipado y mantenerlo a - 20 °C.

Los geles, los papeles filtro, las esponjas y la membrana se deben de equilibrar con el buffer de transferencia por lo menos 15 min a 4 °C .

Armar el cartucho de transferencia de la siguiente manera:

1. Abrir el cartucho de transferencia y de la parte de color negro colocar primero:
La esponja – 2 papel filtro – el gel – la membrana – 2 papel filtro – esponja.

Nota: Realizar todo en un recipiente lleno de buffer de transferencia frío. TODO tiene que estar húmedo.

2. Cerrar el cartucho y realizar lo mismo con el siguiente cartucho. Colocar los cartuchos dentro del casete y meterlos del lado negro con el negro y del lado rojo con lo blanco.

Condiciones para la transferencia: Transferir a 100 V , 0.3 A por 1:30 hrs.

Después de la transferencia se tratan de forma diferente el gel y la membrana.

1. Gel (Opcional)

- 1a. Se retira el gel y se pone en solución de Comassie (por 1 día)
- 1b. Adicionar solución desteñidora por 2 días.
- 1c. Cambiar la solución por ácido acético al 5%.
- 1d. Llevar a secar los geles.

2. Membrana

(Teñir con rojo de Ponceau para checar que la transferencia se realizó adecuadamente).

Tinción con Rojo de Ponceau.

En caso que se desee corroborar la transferencia realizar la tinción con rojo de Ponceau; sumergir las membranas 20 seg en metanol e incubar la membrana con un poco de rojo de Ponceau hasta visualizar las bandas. Retirar la mayor parte de la solución (ponerla en el frasco y reusar). Lavar con agua desionizada poco a poco, hasta que desaparezca el bandeó. Posteriormente lavar la membrana lo más posible con TBS-tween.(TBST)

La tinción también es útil para cortar las membranas por carriles en caso de requerirlo.

(Las membranas se pueden guardar a 4°C y continuar después con el proceso. Envolverlas en cleanpack y que queden mojadas con agua desionizada. Para continuar, si las membranas están secas y por lo tanto hidrofóbicas, sumergirlas 20 seg en metanol y enjuagar en agua destilada).

DetECCIÓN DE LA PROTEÍNA DE INTERÉS.

❖ Bloqueo

Se bloquea la membrana con solución bloqueadora por 1 hora. (Leche al 5 % en TBST).

- Agitar suavemente por 1 hora a temperatura ambiente.
- Lavar las membranas por 5 min en solución de lavado 3 veces.

❖ Incubación de la membrana con los Anticuerpos.

Ac 1º

- Realizar cálculos de acuerdo a la dilución que se requiera. Diluir los anticuerpos en TBST.
- Incubar por una noche el **Ac 1º a 4 °C**.
Por ejemplo: Ms-X. Actina dilución 1: 1 000 o sea, adicionar 1 ul de Ac1º por cada 1000 ul de TBST.
- Al día siguiente dejar 1 hora agitando a Temperatura ambiente.
- Retirar el Ac 1º y guardarlo a -20°C. Se puede reusar hasta 3 veces.
- Realizar 3 lavados de 10 min cada uno con PBS (1x) o TBST.

Ac 2º

f. Adicionar el Ac2º de acuerdo al hospedero empleado en el anticuerpo primario, es decir, si el Ac1º es IgG de ratón el Ac 2º debe de ser un IgG anti-ratón y la dilución empleada depende del anticuerpo. En la mayoría de los casos una dilución 1: 10 000 es adecuada.

Por ejemplo: ECL. Anti-mouse HRP 1: 10 000

e. Agitar suavemente por 1 o 2 horas a temperatura ambiente. En este caso se incubar 1 hora a temperatura ambiente.

A mayor temperatura más unión.

f. Realizar 3 lavados de 10 min cada uno con PBS (1x) o TBST.

Nota: A los anticuerpos primarios y secundarios se les puede agregar leche al 5 % para disminuir la unión inespecífica y el background.

❖ Revelado

g. La dilución empleada es 40: 1, se prepara 1 ml de la solución por membrana por lo que la relación entre la solución A y B es la siguiente: 975 ul de A con 25 ul de B del Kit ECL Plus Western Blotting Detection System (GE)

Retirar el buffer y en una esquina mezclar los reactivos por pipeteo y posteriormente adicionar a la membrana, la cual se va a mover con delicadeza para que toda la solución la cubra durante el tiempo de incubación.

h. Incubar por 3 min. Bañar las membranas durante estos 3 min con la solución ECL (no es necesario protegerla de la luz). Verificar que durante los 3 min siempre estén totalmente en contacto con el reactivo (con una punta de 1 ml se puede distribuir, tratando de tocar lo menos posible la membrana).

i. Escurrir el exceso de reactivo de las membranas y ponerlas en el plástico dentro del cassette, poner la estampa de referencia. Colocar en la cámara para revelado (Hypercassette) las membranas, que están dentro de un acetato en forma de libro.

j. Colocar un hiperfilm, del tamaño de la membrana, para revelado por quimioluminiscencia, sobre el acetato (evitar moverla una vez que haya tenido contacto. Realizar la muesca del mismo lado que la tiene la membrana). El tiempo de exposición varía según la proteína (desde 15 seg –30 min). De preferencia exponer 1 min, y a partir de ese resultado jugar con el tiempo. En teoría la luminiscencia dura una hora, sin embargo los primeros 30 min son los más intensos y por lo general la primera placa no es tan intensa como el resto.

k. Sacar el film después del tiempo indicado y realizar lo siguiente:

- Sumergir la placa en el revelador, sacar la placa continuamente y ponerla bajo la luz roja para monitorear en qué momento empiezan a aparecer las bandas (el tiempo es muy variable).
- Posteriormente lavar con agua por 2 minutos.
- Sumergir de 3 a 5 min en la solución fijadora.
- Lavar con agua y escurrir hasta que se seque el film.

- Una vez seca, marcar la placa con los detalles (fecha, tiempo de exposición, diluciones de anticuerpos, muestras etc).

❖ **Re-usar la membrana**

Si se quiere re-usar la membrana, una vez que se ha revelado, lavarla 3 veces con solución de lavado por 5 min. Se puede guardar a 4°C en cleanpack mojada (si se seca sumergirla 20 seg en metanol y 5 min en agua destilada) o continuar.

Si la proteína es otra a la identificada previamente, de diferente peso, lavar la membrana con solución de lavado (3 lavados de 10min) y posteriormente poner el anticuerpo de interés. Si por el contrario se quiere identificar una proteína del mismo peso molecular o la misma proteína pero en condiciones fosforiladas, hacer stripping.

Incubar en stripping buffer a 50°C por 30 min (en tubos falcon de 50' o bolsas selladas)

Lavar las membranas por 10 min en solución de lavado 2 veces. Bloquear y continuar con el proceso de anticuerpos.

❖ **Tinción de membranas con azul de coomasie (irreversible)**

Si la membrana ya no se va a utilizar y se quiere corroborar si la transferencia fue homogénea, se puede teñir con azul de Coomassie, ya que en esto siempre queda un poco de proteína. Sumergir el gel por 30 segundos en la solución de teñido (para membranas) de azul de Coomassie, agitando. Transcurrido el tiempo, retirar la solución (devolverla al frasco para rehuso) y enjuagar un par de veces con solución desteñidora (metanol al 50 hasta que aparezca el bandeo de proteínas).

Material y reactivos para la extracción de RNA de líneas celulares.

Material: Vortex Jeringa 1.5 ml Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer.	Reactivos: Líneas celulares RD, SMS, RH30 y RH18. Ice cold PBS. Trizol Cloroformo Alcohol isopropilico Etanol 75 % Agua grado molecular
---	---

Reactivos y material para el ensayo de retrotranscripción para la obtención de cDNA usando kit high capacity.

High Capacity CDNA Archive kit (catálogo 4322171, Applied Biosystem)

Reactivo	Material:
10x reverse transcription buffer	Tubos de PCR de 0.2 mL,
25x dNTP's 100 mM	Termociclador
10 x Random Primers (50 uM, 5nmoles)	Vortex
MultiScribe RT (50U/uL)	
RNA inhibitor	
Agua libre de RNAsas (catálogo 15230-147, GIBCO)	

Material y reactivos para PCR en tiempo Real estándar (qPCR)

Reactivos	Material :
2X TaqMan Universal Master Mix (4304437, AB)	Placa óptica de 96 pozos
PAX3/7-3 Forward (10µM)	(Catálogo 4306737, AB)
FKHR-rev (10µM)	Cubiertas ópticas adhesivas
3F3 Probe (10µM)	(Catálogo 4311971, AB)
7F Probe (10uM)	Equipo de tiempo real 7900HT
Muestra de cDNA	
Agua grado biología molecular.	

Material y reactivos para la extracción de proteínas totales:

Reactivos: Células en cultivo PBS 1x Hielo Azul de tripán Buffer Urea/Thiourea (7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS Mix de inhibidor de proteasas (GE/ Amersham)	Material: Tubo falcon 15 ml Centrifuga Cámara de Newbawer Microscopio invertido Sonicador Tubos ependorff de 1ml Tubos ependorff de 100ul
---	---

Material y reactivos para la cuantificación de proteínas:

Reactivos: Proteínas totales extraídas 2-D Quant Kit. GE-healthcare . No Cat.80-6483-56 Agua desionizada	Material: 12 tubos eppendorff de 1.5 ml Centrifuga Espectrofotómetro
---	---

Material y reactivos para Western blot.

Material: Cámara de electroforesis Cristales de 0.75 mm Peine de 0.75 mm Tubos eppendorff de 1ml Termoblock Tupper para colocar las membranas	Cartuchos para transferencia en cámara húmeda 4 papel filtro 2 esponjas Membranas de nitrocelulosa o PVDF. Agitador.	Kit ECL Plus Western Blothing Detection System (GE) Hypercassete (Amersham)
---	--	--

Reactivos para Western Blot.

NOTA: Usar para todas las soluciones agua desionizada o miliQieiu.

Preparación de Geles de acrilamida.

	Separador (abajo)				Concentrador (arriba)
	5 %	7.5%	10 %	15 %	4.00%
Tris 8.8 c/SDS	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	
Tris 6.8 c/SDS	-	-	-	-	750 ul
Bis-acrilamida 30 %	1.69 ml	2.5 ml	3.3 ml	4.9 ml	500 ul
H2O	5.81 ml	5 ml	4.2 ml	2.6 ml	1 750 ul
PSA 10 %	100 ul	100 ul	100 ul	100 ul	40 ul
Temed	5 ul	5 ul	5 ul	5 ul	2 ul

Nota: El Tris 6.8 u 8.8 se puede preparar con SDS o sin SDS. Si se preparan sin SDS se agrega al gel 200 ul de SDS al 10 %.

Acrilamida 30% Bis 0.8% en H2O

Acrilamida 29.2g
 Bis-acrilamida 0.8g

Ojo: Usar guante y cubrebocas ya que son neurotóxicos.
 Filtrar y proteger de la luz. Almacenar a 4°C.

Buffer de Transferencia Cámara Semi-húmeda	(5x) 1L
Tris base 60 mM Fw: 121.14	36.375g
Glicina 40 mM Fw: 75.07	18.3125 g
SDS 0.04 %	0.23
Aforar a 1 L	1 000 ml H2O

Nota: Mezclar primero tris y glicina y aforar. No ajustar pH. Tiempo de almacenaje aproximadamente 2 meses. Almacenar a 4º C.
Nota: Como al buffer ya diluido (1X) se le agrega el 20% de metanol. Los solutos se preparan mas concentrados.

Sulfato duodecil de sodio (SDS) 10%

Para 100ml de solución pesar 10 g de SDS. Mantener a temperatura ambiente.

Buffer de Transferencia (1X) para Cámara Semi-húmeda con metanol al 20%

	ml (numero de membranas)					
	125 (1)	250(2)	375 (3)	500 (4)	625 (5)	750 (6)
Metanol	25	50	75	100	125	150
Buffer de Transferencia 1X (hacer dilucion previa 1:5 del 5x)	100	200	300	400	500	600

Aforar con agua desionizada al volumen deseado, según el numero de membranas a transferir. OJO: como el metanol es miscible, hay que aforar ya que si no el volumen final es incorrecto.

Nota: Preparar el día que se vaya a usar. En lo que se emplea almacenarlo a -20 °C.

Buffer de Transferencia para Cámara Húmeda (1x) 1L

Tris base 25 mM	Fw: 121.14	3.03 g
Glicina 192 mM	Fw: 75.07	14.4 g
Metanol 20 %		200 ml
Aforar a 1 L.		1 000 ml H2O

Nota: Mezclar primero tris y glicina con 300ml de agua, después el metanol y ajustar a 1 L. No ajustar pH.

Nota: Tiempo de almacenaje aproximadamente 2 meses. Mantenerlo a -20 °C.

Buffer de Corrida con SDS (Laemli) pH = 8.3

	1L (1X)	1L (10X)
Tris HCL 25 mM Fw: 121.14	3.028g	30.3 g
Glicina 190 mM Fw: 75.07	14.413g	142 g
SDS 0.1%	1g	10 g

Aforar a 1L con H2O.

Nota: Se ajusta el pH al Tris y después se agrega la glicina y el SDS, ajustar pH. Dejar a temperatura ambiente.

Persulfato de Amonio (PSA) 10% Fw: 228.2

En un tubo ependorff pesar los gramos requeridos para 1ml de PSA que son: 0.1 g para 1ml.

Nota: Almacenar a -20º C y emplear hasta 4 veces.

Buffer de Carga 2x (para 10 ml)

Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 _ SDS 0.4%	2.5ml
SDS 10%	4 ml
Glicerol	2 ml
Mercaptoetanol	1 ml
H2O	0.5 ml

Nota: Mezclar suavemente para no hacer espuma y agregar una pizca de azul de bromofenol
 Emplear la campana por el 2-mercaptoetanol, ya que es volatil.
 Hacer alicuotas de 300 ul y almacenar a -20 °C

Solución de Bloqueo

Leche desgrasada 5%	2 g
TBST	40 ml

Nota: Por cada membrana preparar 10 ml de solución de bloqueo.

Soluciones para el Revelado con Quimioluminiscencia**Solución Reveladora**

100 ml Sol. Revelado STOCK
 200 ml H2O
 A esta solución 1:3 se le nombra Sol de Trabajo.
 De esta hacer una dilución 1: 7.Para 300ml.
 Tomar 30 ml de la sol de Trabajo y 262 ml de agua.
 Para 300ml de dilución 1:11.Tomar 25 ml y 275 de agua

Solución Fijadora

250 ml H2O
 124.4 ml sol A. y Agitar.
 Adicionar 13.6 ml sol B y Agitar rápido para que no precipite.
 Aforar a 500 ml

Nota: Cubrir de la luz las soluciones y almacenar en el cuarto de revelado a temperatura ambiente.

Solución Azul de Coomassie

H2O	400 ml
Metanol	500 ml
Ácido acético	100 ml
Azul brillante-R	2g por cada 1L de solución

Nota: Almacenar a temperatura ambiente.

Tris pH 8.8 con SDS

Tris 1.5 M
 SDS 0.4 %

Tris pH 6.8 con SDS

Tris 0.5 M
 SDS 0.4 %

Nota: Se puede emplear Tris base o Tris HCl para realizar los buffers con los cálculos adecuados.

Prepara aproximadamente 100 ml de cada buffer, mezclar primero el Tris y después ajustar el pH añadiendo al final el SDS. Almacenar a -4° C.

TBST pH: 7.6

1 L (10x)

Tris HCl	24.23g
NaCl	80.06 g
H ₂ O	1000 ml

Nota: Agregar primero el Tris, ajustar el pH, agregar el NaCl y aforar a 1L. Preparar TBST(1x)(1L) mezclando 100 ml de TBST(10x), 900 ml de H₂O y 1 ml de Tween 20.
Almacenar a - 4º C.

Buffer de fosfatos (PBS) pH: 7.4 **1L (10x)**

NaCl 1.37 M	80 g
KCl 0.27 M	2 g
Na ₂ HPO ₄ 0.1 M	14.4 g
KH ₂ PO ₄ 20 mM	2.4 g
H ₂ O	1000 ml

Nota: Ajustar pH y aforar a 1L. Conservar a - 4º C.

Stripping buffer pH: 6.7 **0.5 L**

Tris base (g) 60 mM	3.76 g
β-Mercaptoetanol (ml)	3.9 g
SDS (g) 2%	10 g

Nota: Aforar. Ajustar pH a 6.7. Guardar a temperatura ambiente, cubierto con aluminio y en un lugar oscuro

10. Bibliografía:

- Adjounian, M. F. C. d., Ed. (2008). Silenciamiento de genes mediante ARNi, Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica.
- Álava, E. d. (2005). "Patología Molecular de los sarcomas. Revision." Oncología **28**(9): 426-442.
- Apuzzo, S., A. Abdelhakim, et al. (2004). "Cross-talk between the paired domain and the homeodomain of Pax3: DNA binding by each domain causes a structural change in the other domain, supporting interdependence for DNA Binding." J Biol Chem **279**(32): 33601-33612.
- Barr, F. G. (2001). "Gene fusions involving PAX and FOX family members in alveolar rhabdomyosarcoma." Oncogene **20**(40): 5736-5746.
- Barr, F. G., N. Galili, et al. (1993). "Rearrangement of the PAX3 paired box gene in the paediatric solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma." Nat Genet **3**(2): 113-117.
- Besnard-Guerin, C., I. Newsham, et al. (1996). "A common region of loss of heterozygosity in Wilms' tumor and embryonal rhabdomyosarcoma distal to the D11S988 locus on chromosome 11p15.5." Hum Genet **97**(2): 163-170.
- Breitfeld, P. P. M., W. H. et al (2005). "Rhabdomyosarcoma: new windows of opportunity." Oncologist **10**(7): 518-527.
- Breneman, J. C., E. Lyden, et al. (2003). "Prognostic factors and clinical outcomes in children and adolescents with metastatic rhabdomyosarcoma--a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study IV." J Clin Oncol **21**(1): 78-84.
- Crist, W., E. A. Gehan, et al. (1995). "The Third Intergroup Rhabdomyosarcoma Study." J Clin Oncol **13**(3): 610-630.
- Crist, W. M., J. R. Anderson, et al. (2001). "Intergroup rhabdomyosarcoma study-IV: results for patients with nonmetastatic disease." J Clin Oncol **19**(12): 3091-3102.
- Chalepakis, G., F. S. Jones, et al. (1994). "Pax-3 contains domains for transcription activation and transcription inhibition." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(26): 12745-12749.
- Davis, R. J. B., F. G. et al (1997). "Fusion genes resulting from alternative chromosomal translocations are overexpressed by gene-specific mechanisms in alveolar rhabdomyosarcoma." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(15): 8047-8051.
- de la Fuente González A., J. R. L. y. E. F. C. (2007). "Análisis de proteínas mediante electroforesis e inmunotransferencia (Western blot)." Servicio de Dermatología. Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo. A Coruña.España **55**(5): 252-258.
- DeBaun, M. R., Tucker, M. A,et al (1998). "Risk of cancer during the first four years of life in children from The Beckwith-Wiedemann Syndrome Registry." J Pediatr **132**(3 Pt 1): 398-400.
- del Peso, L., V. M. Gonzalez, et al. (1999). "Regulation of the forkhead transcription factor FKHR, but not the PAX3-FKHR fusion protein, by the serine/threonine kinase Akt." Oncogene **18**(51): 7328-7333.
- Elizabeth Van Pelt-Verkuil, A. a. B. a. J. P. H., Ed. (2008). Principles and Thechnical Aspects of PCR Amplification, Springer.
- Ferrari, A. B., G.Macaluso, A.Casanova, M.D'Angelo, P.Pierani, P.Zanetti, I.Alaggio, R.Cecchetto, G.Carli, M. (2007). "Soft-tissue sarcomas in children and adolescents with neurofibromatosis type 1." Cancer **109**(7): 1406-1412.
- Fitzgerald, J. C., A. M. Scherr, et al. (2000). "Structural analysis of PAX7 rearrangements in alveolar rhabdomyosarcoma." Cancer Genet Cytogenet **117**(1): 37-40.
- Fredericks, W. J., K. Ayyanathan, et al. (2000). "An engineered PAX3-KRAB transcriptional repressor inhibits the malignant phenotype of alveolar rhabdomyosarcoma cells harboring the endogenous PAX3-FKHR oncogene." Mol Cell Biol **20**(14): 5019-5031.
- Fredericks, W. J., N. Galili, et al. (1995). "The PAX3-FKHR fusion protein created by the t(2;13) translocation in alveolar rhabdomyosarcomas is a more potent transcriptional activator than PAX3." Mol Cell Biol **15**(3): 1522-1535.

- Galili, N., R. J. Davis, et al. (1993). "Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma." Nat Genet **5**(3): 230-235.
- Galindo, R. L., J. A. Allport, et al. (2006). "A Drosophila model of the rhabdomyosarcoma initiator PAX7-FKHR." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(36): 13439-13444.
- Goulding, M., A. Lumsden, et al. (1994). "Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development." Development **120**(4): 957-971.
- Gripp, K. W., Lin, et al. (2006). "HRAS mutation analysis in Costello syndrome: genotype and phenotype correlation." Am J Med Genet A **140**(1): 1-7.
- Gripp, K. W. (2005). "Tumor predisposition in Costello syndrome." Am J Med Genet C Semin Med Genet **137C**(1): 72-77.
- Grufferman S, Schwartz AG, et al. (1993). "Parents' use of cocaine and marijuana and increased risk of rhabdomyosarcoma in their children." Cancer Causes Control **4**: 217-224.
- Gurney, J. G., R. K. Severson, et al. (1995). "Incidence of cancer in children in the United States. Sex-, race-, and 1-year age-specific rates by histologic type." Cancer **75**(8): 2186-2195.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hillion, J., M. Le Coniat, et al. (1997). "AF6q21, a novel partner of the MLL gene in t(6;11)(q21;q23), defines a forkhead transcriptional factor subfamily." Blood **90**(9): 3714-3719.
- Hribal, M. L., J. Nakae, et al. (2003). "Regulation of insulin-like growth factor-dependent myoblast differentiation by Foxo forkhead transcription factors." J Cell Biol **162**(4): 535-541.
- Kurien, B. T. and R. H. Scofield (2006). "Western blotting." Methods **38**(4): 283-293.
- Kuttesch, J. F., D. M. Parham, et al. (1996). "P-glycoprotein expression at diagnosis may not be a primary mechanism of therapeutic failure in childhood rhabdomyosarcoma." J Clin Oncol **14**(3): 886-900.
- Lawrence, W., Jr., J. R. Anderson, et al. (1997). "Pretreatment TNM staging of childhood rhabdomyosarcoma: a report of the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group. Children's Cancer Study Group. Pediatric Oncology Group." Cancer **80**(6): 1165-1170.
- León A.L, E. C. G., José Manuel Cotrina C, et al. (2005). "Soft tissue sarcomas in children: Our experience at the Especialized Institute of Neoplastic illnesses . ." Diagnostic Review
- Li, F. P. F., J. F., Jr. (1969). "Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome." J Natl Cancer Inst **43**(6): 1365-1373.
- Linardic, C. M. (2008). "PAX3-FOXO1 fusion gene in rhabdomyosarcoma." Cancer Lett **270**(1): 10-18.
- Medic, S. and M. Ziman (2010). "PAX3 expression in normal skin melanocytes and melanocytic lesions (naevi and melanomas)." PLoS One **5**(4): e9977.
- Moschovi, M., V. Touliatou, et al. (2007). "Rhabdomyosarcoma in a patient with Noonan syndrome phenotype and review of the literature." J Pediatr Hematol Oncol **29**(5): 341-344.
- Nakae, J., T. Kitamura, et al. (2003). "The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation." Dev Cell **4**(1): 119-129.
- Ognjanovic, S., Carozza, et al. (2010). "Birth characteristics and the risk of childhood rhabdomyosarcoma based on histological subtype." Br J Cancer **102**(1): 227-231.
- Parham, D. M. and D. A. Ellison (2006). "Rhabdomyosarcomas in adults and children: an update." Arch Pathol Lab Med **130**(10): 1454-1465.
- Raney, R. B., J. R. Anderson, et al. (2001). "Rhabdomyosarcoma and undifferentiated sarcoma in the first two decades of life: a selective review of intergroup rhabdomyosarcoma study group experience and rationale for Intergroup Rhabdomyosarcoma Study V." J Pediatr Hematol Oncol **23**(4): 215-220.
- Raspall, G., Ed. (2000). Tumores de Cara , cabeza y cuello. Atlas clínico. Barcelona, España.
- Ries LA, K. C., Hankey BF, et al (1999). "SEER Cancer Statistics Review, 1973-1996. Bethesda, Md." National Cancer Institute.

- Ries LAG, S. M., Gurney JG, Linet M, Tamra T, Young JL, Bunin GR (1999). "Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995, National Cancer Institute, SEER Program." NIH Pub.: No. 99-4649.
- Scientific, T., Ed. (2008). Nano Drop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual.
- Scofield, B. T. K. a. R. H., Ed. (2009). Introduction to Protein Blotting. Methods in Molecular Biology, Humana Press.
- Scrabble, H., W. Cavenee, et al. (1989). "A model for embryonal rhabdomyosarcoma tumorigenesis that involves genome imprinting." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(19): 7480-7484.
- Scholl, F. A., J. Kamarashev, et al. (2001). "PAX3 is expressed in human melanomas and contributes to tumor cell survival." Cancer Res **61**(3): 823-826.
- Shapiro, D. N., J. E. Sublett, et al. (1993). "The gene for PAX7, a member of the paired-box-containing genes, is localized on human chromosome arm 1p36." Genomics **17**(3): 767-769.
- Smith, M. A., N. L. Seibel, et al. (2010). "Outcomes for children and adolescents with cancer: challenges for the twenty-first century." J Clin Oncol **28**(15): 2625-2634.
- Spunt, S. L., T. E. Lobe, et al. (2000). "Aggressive surgery is unwarranted for biliary tract rhabdomyosarcoma." J Pediatr Surg **35**(2): 309-316.
- Tan, S. C., Yiap, B. C. et al (2009). "DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present." J Biomed Biotechnol **2009**: 574398.
- Trahair, T. A., L.Cohn, R. J. (2007). "Recognition of Li Fraumeni syndrome at diagnosis of a locally advanced extremity rhabdomyosarcoma." Pediatr Blood Cancer **48**(3): 345-348.
- Wang, J., S. Li, et al. (2010). "PAX3 mutations and clinical characteristics in Chinese patients with Waardenburg syndrome type 1." Mol Vis **16**: 1146-1153.
- Weigelt, J., I. Climent, et al. (2001). "Solution structure of the DNA binding domain of the human forkhead transcription factor AFX (FOXO4)." Biochemistry **40**(20): 5861-5869.
- Weiss, S. W. G., Jhon R, Ed. (2009). Tumores de partes blandas.
- www.cancer.gov., from
<http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/primariodesconocido/Patient/page3>.
www.ncbi.nlm.nih.gov. " paired box 3 [Homo sapiens]". " from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=5077>.