



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

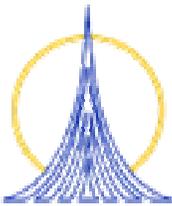
FES ZARAGOZA

**Detección de la proteína tirosina cinasa Syk mediante
inmunohistoquímica en cortes histológicos de diferentes
estadios de carcinoma de cérvix.**

Nombre: Olivia Bertha Hernández Santana.

Director: M en C Arturo Valle Mendiola.

Asesor: Dra. Isabel Soto Cruz



México DF a 24 de octubre del 2005.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC); Laboratorio de Oncología, FES Zaragoza UNAM.

INDICE	Pág.
II. RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	3
III. MARCO TEÓRICO	4
A. Generalidades del cáncer	4
1. Definición del cáncer	4
2. Tipos de cáncer	5
B. Cáncer cervico uterino (CaCU)	6
1. Causas de cáncer cervico uterino (CaCU)	7
2. Estadios clínicos y descripción	8
3. Nomenclatura citológica	9
C. Proteínas Tirosina Cinasa	9
1. La familia de Syk/Zap-70	10
2. Syk	12
3. Syk (L) y Syk (S)	13
4. Vía de señalización y Syk	15
5. Función de Syk en células del sistema inmune	16
6. Función de Syk en células no hematopoyéticas	17
7. Función de Syk como regulador en la transformación de Células de seno	19
8. Efecto de la oncoproteína E6 sobre Syk en células T	21
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	23
V. OBJETIVOS	24
A. Objetivo general	24
B. Objetivos particulares	24
VI. HIPÓTESIS	25

VII. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	26
VIII. METODOLOGÍA	27
IX. RESULTADOS	30
A. Estandarización de la técnica	30
B. Presencia de Syk en líneas de carcinoma de cérvix	30
C. Presencia de Syk en cortes de tejido carcinoma de cérvix	34
X. ANÁLISIS DE RESULTADOS	38
XI. CONCLUSIONES	43
XII. SUGERENCIAS	44
XIII. ANEXO	45
XIV. BIBLIOGRAFÍA	46

I. RESUMEN

El cáncer es una enfermedad caracterizada por el crecimiento anormal y diseminado de células que al desarrollarse en forma incontrolada, avanzan entre los tejidos normales y los destruyen, alterándose así el funcionamiento del organismo. Se inicia casi siempre como una enfermedad localizada.

Se estima que el cáncer cervico uterino causa alrededor de 500,000 muertes al año en el mundo.

La mayor parte de las displasias son diagnosticadas en la mujer después de los 20 años de edad. El cáncer *in situ* se presenta de manera significativa entre los 30 a 39 años de edad y el carcinoma invasor después de los 40 y 50 años.

Syk se expresa en tejido de seno, normal, lesiones benignas y en líneas celulares de cáncer de baja tumorigenicidad, no así en carcinoma maligno.

Se ha reportado que la presencia de la cinasa Syk, una proteína con actividad de tirosina cinasa, en tejido de seno puede estar involucrada en la supresión de tumor, y la pérdida de expresión de Syk está asociada con el desarrollo de un tumor maligno de seno; presumiblemente Syk puede actuar directamente como un supresor de tumor controlando la división celular.

En este estudio se analizaron por medio de inmunohistoquímica las líneas celulares del carcinoma de cérvix: CALO, INBL, Vibo, Caski, HeLa, C33 y biopsias de diferentes estadios de este tipo de cáncer: Infección temprana con HPV, F20 (IIIB HPV18), F21 (IVB HPV16), F19 (HPV16), F32, 57x, 55x y también se analizó tejido normal de cérvix: N8 y N6.

Los resultados obtenidos muestran que sólo en HeLa y Caski (ambas HPV 18) se observó disminuida la presencia de Syk en comparación con las líneas CALO e INBL, las cuales presentaron a Syk de manera similar a las células control, MCF7 (células de carcinoma de seno), en la línea Vibo (HPV negativa) disminuyó aún más la presencia de Syk, en la línea C33 (HPV negativa) no se encontró a Syk.

En la biopsia de infección temprana con HPV, en F20 (IIIB HPV 18), en las muestras de tejido normal N8 y N6 se detectan la presencia de Syk

En las biopsias de carcinoma F21 (IVB HPV 16), F19 (HPV 16), F32, 57X, 55X también se observó la presencia de Syk. De las cuatro últimas muestras no se contó con información de estadio.

Se concluye que Syk probablemente en estas células no presenta la misma función que en las células de seno, ya que se observa la presencia de Syk en carcinoma de cérvix tanto en líneas celulares como en tejido independientemente del grado de malignidad.

II. INTRODUCCIÓN

El cáncer cervicouterino es un problema grave de salud pública, ya que es el segundo más común en las mujeres de todo el mundo, después del cáncer de mama.

De los 500 mil casos que se calcula que surgen mundialmente cada año, 80% corresponde a los países en vías de desarrollo. Se ha encontrado que las tasas de incidencia más elevadas se presentan en los países africanos, latinoamericanos y algunos asiáticos, y las tasas más bajas en las naciones del norte y del sur de Europa, en Norteamérica y en el Medio Oriente.

Syk se expresa en tejido normal de seno, lesiones benignas y en líneas celulares de cáncer de baja tumorigenicidad, no así en carcinoma maligno.

Syk es una proteína tirosina cinasa que está ampliamente expresada en células hematopoyéticas, en líneas celulares de origen epitelial.

El objetivo del trabajo fue determinar la presencia de Syk, en líneas y cortes histológicos de carcinoma de cérvix de diferentes estadios mediante la técnica de tinción inmunoperoxidasa (Técnica indirecta de peroxidasa). Se llevo a cabo el análisis de la presencia de esta proteína en carcinoma de cérvix.

III. MARCO TEORICO

A. Generalidades del cáncer

El cáncer es un término general que abarca una gran variedad de situaciones patológicas distintas, algunas de ellas son de escasa importancia, pero la mayoría son graves y llegan a ocasionar la muerte. Este padecimiento representa un problema de salud pública importante en nuestro país, teniendo el segundo lugar en incidencia y mortalidad de acuerdo al Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas en México (1).

1. Definición de cáncer

El cáncer se caracteriza por la presencia de células que han sufrido cambios en los mecanismos de control que regulan su capacidad de diferenciación y de proliferación, como consecuencia de anomalías genéticas-proteínicas. De tal manera, que se presentan como una masa creciente de células anormales que derivan de una única célula como resultado de una expansión clonal; invade los tejidos normales circundantes y se extiende a través del cuerpo por vía linfática o por la sangre mediante el proceso llamado metástasis (2).

Un tumor se considera canceroso, si sus células tienen la capacidad de invadir tejido circundante y formar tumores secundarios o metástasis en otros lugares del cuerpo, (tumor maligno), hay que tener en cuenta que un cáncer es más difícil de erradicar cuanto mayor sea su formación de metástasis, sin embargo, si las células neoplásicas permanecen agrupadas en una masa única se dice que el tumor es benigno (2).

Es conocido que el factor genético desempeña un papel importante en la aparición de esta enfermedad, además, los agentes externos pueden provocar la mayor parte de los cánceres humanos, principalmente al estar expuestos a algunos tipos de radiación, virus, ciertas infecciones bacterianas y parasitarias o agentes químicos, necesitando solo una breve exposición, de horas o días a la forma activa del carcinógeno (3).

Los agentes exógenos dañan el ADN de los cromosomas causando mutaciones en los genes de algunas células. Se han sugerido varios mecanismos por los cuales dichas mutaciones pueden dar lugar al cáncer, uno de ellos está representado por los denominados protooncogenes, genes normalmente presentes en las células y que son responsables de algunos aspectos del crecimiento y de la división celular, una mutación en alguno de dichos genes puede convertirlo en oncogen, es decir, un gen capaz de inducir una división descontrolada al codificar factores de crecimiento y genes mitogénicos, y por lo tanto, estimular una transformación de las células normales en cancerosas. Otro posible mecanismo está dado por los factores supresores de tumor; se cree que estos factores actúan normalmente inhibiendo la expresión de los oncogenes. En ausencia de un gen supresor, el oncogén no será suprimido y potencialmente podrá causar cáncer (4).

Los procesos proliferativos están generalmente relacionados con los procesos antiproliferativos, lo que da lugar a un equilibrio; de tal manera que la proliferación está controlada por un complejo de genes supresores tumorales, que actúan en el ciclo celular, como son la proteína p53 o la proteína del producto del gen del retinoblastoma Rb. La proteína p53 tiene un papel crucial en la respuesta celular al daño o mutación del ADN, generalmente secuestra células antes del proceso de replicación para permitir que tenga lugar la reparación y también inicia la apoptosis (muerte programada de células viejas o dañadas).

La pérdida de la función normal de p53, provocada por la exposición a diversos agentes causantes de cáncer, permite al ADN defectuoso replicarse y con esto favorecer la supervivencia de las células defectuosas, lo que finalmente lleva a la presencia de cáncer (2).

2. Tipos de cáncer

Existen dos grandes tipos de cánceres: el primero y el más frecuente se denomina carcinoma, este se originan en el epitelio, un tejido que recubre la superficie del cuerpo y las membranas de los órganos huecos. Las localizaciones más frecuentes de aparición de los carcinomas son la piel, el estómago, el intestino grueso, los conductos de las mamas y el cáncer del

cuello uterino. El segundo gran grupo, menos frecuente, se origina en los tejidos sólidos como el músculo, huesos y tejido conectivo, a los cuales se les denomina sarcomas (2).

B. Cáncer cervico uterino

El cáncer cervico uterino (CaCU) es el segundo cáncer más común en la mujer a nivel mundial. Diversos estudios epidemiológicos han mostrado una fuerte asociación entre los virus del papiloma humano (VPH) y neoplasias cervicales, independientemente de los factores de riesgo en diversos países.

Aproximadamente 80% de los 500 mil casos que se calcula se presentan anualmente en el mundo, corresponde a los países en vías de desarrollo.

Se ha encontrado que alrededor de 99.7% de cáncer de cuello uterino puede atribuirse a ciertos tipos de VPH. Así, el VPH 16 presenta la mayor porción (50%), seguido por el VPH 18 (12%), el VPH 45 (8%) y el VPH 31 (5%). No obstante, el VPH no constituye una causa suficiente de esta enfermedad; son necesarios ciertos cofactores para que un porcentaje de infecciones persistentes por VPH logre, en algún momento progresar y dar lugar al cáncer. Entre ellos están los factores del huésped, como los tipos de antígenos de histocompatibilidad y la respuesta inmunológica, las influencias que ejercen las hormonas y otros agentes de transmisión sexual, por ejemplo *Chlamydia trachomatis* (5).

Se señala que existen otros factores o cofactores que incrementan la progresión a cáncer de cérvix además de la presencia del virus de papiloma humano.

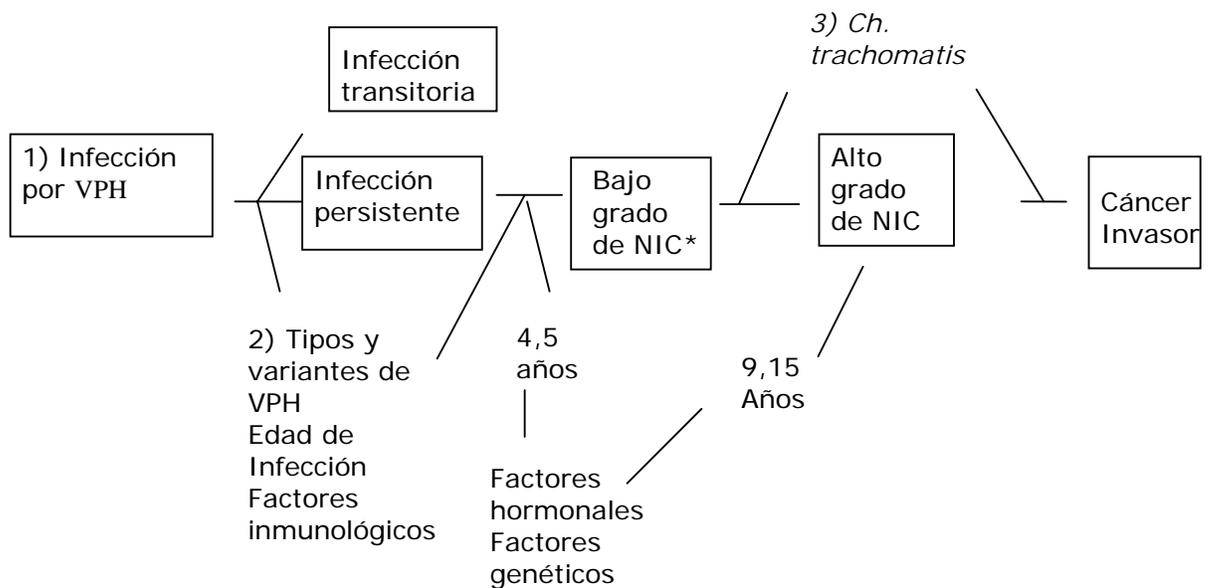
Existen tres tipos de cofactores que pueden ser importantes:

- 1) Tipos vírales y variantes. Algunos estudios indican que el alto riesgo de los tipos oncogénicos de VPH y probablemente algunas variantes de ciertos tipos se asocian con un mayor riesgo de neoplasia cervical.
- 2) Los factores del huésped que podrían modular el efecto del VPH, son entre otros los genéticos (los haplotipos del antígeno mayor de histocompatibilidad), la inmunosupresión genética o inducida; los

factores hormonales endógenos; así como la edad temprana en la que ocurre el primer contacto sexual.

- 3) Factores exógenos, como el consumo de anticonceptivos orales durante largo plazo y la infección por *Chlamydia trachomatis*. Se consideran como cofactores en las mujeres positivas a VPH (fig. 1) (5).

1. Causas de cáncer cervico uterino:



*Neoplasia intraepitelial cervical.

Fig. 1 cofactores que pueden ser importantes para el desarrollo de carcinoma de cèrvix.:

(Modificada de Alonso P, et al. 2000).

2. Estadios clínicos y descripción

La clasificación clínica actual del carcinoma de cáncer uterino fue establecida por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) (5).

Tabla 2. Carcinoma cervicouterino. Estadios clínicos y descripción:

Estadio	Descripción
0	Carcinoma preinvasor (carcinoma intraepitelial <i>in situ</i>)
I	Carcinoma estrictamente confinado al cérvix (si ha existido extensión al cuerpo del útero debe omitirse).
IA	Carcinoma preclínico del cérvix, es decir, sólo diagnosticado por medio del microscopio.
IA1	Evidencia de invasión estromal, mínima y microscópica.
IA2	Lesiones detectadas por medio del microscopio, susceptibles de medición. La máxima profundidad aceptada de la lesión es de 5mm., tomada desde la base del epitelio, sea escamoso o glandular de la que se origina, y una segunda medición la extensión horizontal no debe excederse 7mm. Toda lesión mayor se clasificará como IB.
IB	Lesiones de mayores dimensiones que las de IA2, sean o no visibles clínicamente. Las lesiones voluminosas no alteran el estadio, pero deben señalarse específicamente, pues pueden afectar las decisiones terapéuticas.
II	Carcinoma invasor que se extiende más allá del cuello; afecta a los dos tercios superiores de la vagina o con infiltración parametrial que no ha alcanzado las paredes pélvicas laterales.
IIA	Carcinoma invasor que afecta a los dos tercios superiores de la vagina.
IIB	Carcinoma con infiltración de los parametrios, pero que no han alcanzado la pared pélvica lateral.
III	Carcinoma invasor que se extiende a las paredes laterales de la pelvis, o el tercio inferior de la vagina, o con hidronefrosis o riñón no funcionante debido al tumor.
IIIA	Extensión al tercio inferior de la vagina.
IIIB	Extensión a la pared pélvica con o sin hidronefrosis o riñón no funcional.
IV	Carcinoma invasor que involucra la mucosa de la vejiga urinaria y/o el recto, o se extiende más allá de la verdadera pelvis.
IVA	Invasión a órganos adyacentes.
IVB	Invasión de órganos distantes.

(Modificada de Alonso P et al. 2000)

3. Nomenclatura citológica

En esta nomenclatura se incluyen dos categorías, con la intención de que el diagnóstico no sea subjetivo.

Esta nomenclatura, es en realidad un sistema para evaluar y diagnosticar un estudio citológico ginecológico (5).

Tabla 3. Equivalencias en nomenclatura.

OMS	Richart	Sistema Bethesda
Displasia leve	NIC 1	Lesión intraepitelial de bajo grado
Displasia moderada	NIC 2	Lesión intraepitelial de alto grado
Displasia grave	NIC 3	Lesión intraepitelial de alto grado
Carcinoma <i>in situ</i>	NIC 3	Lesión intraepitelial de alto grado

(Modificada de Alonso P. et al. 2000)

C. Proteínas Tirosina Cinasa (PTK)

Las células cancerosas reciben señales de su ambiente que las estimulan a crecer y proliferar. Para traducir la activación de un receptor unido a membrana en una respuesta biológica, las señales generadas por la activación del receptor necesitan ser llevadas al núcleo para activar la síntesis de proteínas.

Esto se lleva a cabo mediante la activación de una cascada intracelular de reacciones bioquímicas, llamadas vías de transducción de señales.

Las interacciones proteína-proteína y la actividad enzimática a menudo están reguladas mediante la fosforilación de los residuos de tirosina. La fosforilación inducible de las tirosinas es mucho menos frecuente que la fosforilación de

serina o treonina, y suelen reservarse para ciertos pasos reguladores fundamentales. Es sorprendente pues, que las cinasas que catalizan la fosforilación de la tirosina sean componentes esenciales de muchas cascadas de señalización intracelular en los linfocitos y en otros tipos de células. Estas proteínas tirosina cinasa (PTK) median la transferencia del γ -fosfato del trifosfato de adenosina (ATP) al grupo hidróxilo de un residuo de tirosina de una proteína sustrato, una PTK específica fosforila sólo un conjunto limitado de sustratos (6).

Muchas PTK de importancia para el sistema inmunológico son proteínas citoplasmáticas que se unen de forma no covalente a las colas citoplasmáticas de los receptores de la superficie celular de las proteínas adaptadoras (6).

Dos familias de PTK citoplásmicas que destacan en la cascada de señalización del receptor para el antígeno de las células B y T, así como del receptor Fc, son las familias Src y Syk/Zap-70 (6).

1. La familia de Syk/Zap-70

La familia de tirosinas cinasas Syk/Zap-70 son proteínas citoplasmáticas y se caracterizan por la presencia de 2 dominios SH2 en el extremo N-terminal, separados del dominio cinasa C-terminal por un interdominio B (IDB) o región linker (7). La familia de Syk/Zap-70 está funcionalmente acoplada a varios inmunorreceptores y contribuyen principalmente a la señalización y habilidad funcional de receptores Fc (fracción cristalizable), TCR (receptor de linfocitos T), BCR (receptor de linfocitos B), células NK humanas (natural killer, asesinas naturales), células mieloides y plaquetas (8). Syk y Zap-70 son altamente homólogas y juegan un papel importante en acoplamiento de receptores Fc y antígeno para eventos de señalización regulación negativa que median diversas respuestas celulares incluyendo proliferación, diferenciación y fagocitosis (9, 10,11). Syk y Zap-70 son inactivas hasta que se unen, mediante sus dominios SH2, a fosfotirosinas pares dentro de los motivos de activación de inmunorreceptor basado en fosfotirosina (ITAM) de las proteínas del complejo antígeno-receptor, una vez unidos sufren fosforilación sobre múltiples residuos de tirosina; pueden ser activados por una combinación de autofosforilación y

fosforilación por la familia Src. La unión de Zap-70 y Syk a los ITAMs también aumenta su actividad catalítica probablemente como resultado de cambios conformacionales ocasionados por la fosforilación en tirosina (12).

Sin embargo Syk y Zap parecen no desempeñar papeles similares. A través de análisis estructura-función fueron establecidas las diferencias bioquímicas relacionadas a variaciones de secuencia en el dominio catalítico de estas dos enzimas. Mientras el significado fisiológico de estas observaciones establece que Syk es más eficiente en la transducción de señales en células hematopoyéticas, la participación de Zap-70 puede requerir modificaciones postraduccionales adicionales, tales como unión a tirosinas fosforiladas de ITAMs y/o fosforilación por la familia de las cinasa Src (13).

Existen marcadas diferencias entre Syk y Zap-70. Primero, la capacidad de Syk de sufrir autofosforilación (14) y para fosforilar cdb3 es mayor que la de Zap-70. Segundo, el ITAM fosforilado induce la activación de Syk, mientras que Zap-70 requiere estimulación adicional de Lck. Tercero, la precipitación de Syk es 10 veces mayor que la de Zap-70 con el péptido fosforilado Fc ϵ RI γ -ITAM (15).

Evidencias sugieren que Syk y Zap-70 pueden contribuir potencialmente en distintos eventos de transducción de señales en células T y timocitos. Pacientes con mutación en el gen Zap-70 muestran desarrollo anormal de timocitos, llevando a la producción de CD4+ exclusivamente en sangre. Mientras la mutación de Syk en ratón no muestra bloqueo en el desarrollo de la vía de células T (16).

Estudios recientes muestran que la actividad de Syk, pero no la de Zap-70, esta involucrada de manera crucial en la vía de activación inducida por la activación de receptores responsables de la actividad de células NK humanas, aunque el mecanismo regulación positiva de Syk no es todavía claro (17).

Se han presentado evidencias sobre la activación selectiva y rápida de Syk pero no de Zap70 en células NK humanas activadas por IL-2 a través de agrupamiento de CD69 (17).

En estudios previos se observó que la expresión de Zap-70 o Syk reconstituye la señalización antígeno-receptor en células B Syk⁻. Sin embargo, en células T Syk⁻ pero no Zap-70 restaura la vía de señalización mediante el receptor de

células T. En células cebadas (RBL-2H3). Zap-70 pero no Syk, requiere CD45 para señalización inducida por receptor-antígeno (18).

2. Syk

Syk es una proteína tirosina cinasa miembro de la familia Syk/ZAP-70. La estructura cristalina de los dominios SH2 de Syk sugieren que estos dominios pueden funcionar como unidades independientes. Además, la orientación relativa de los dominios SH2 de Syk muestra, flexibilidad conformacional marcada (15).

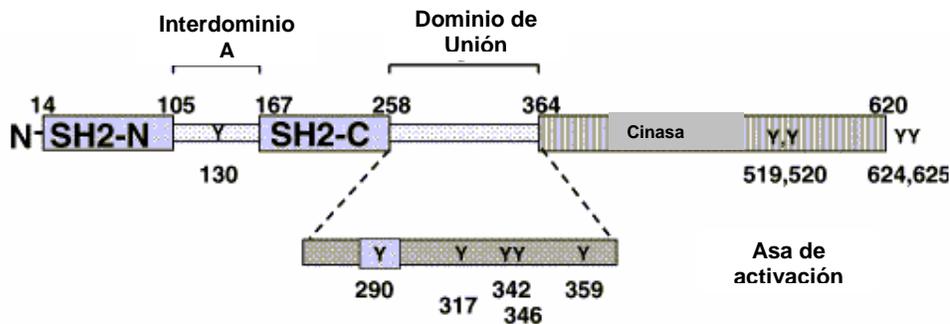


Fig.2 Estructura de Syk. La estructura de esta cinasa consiste en dos dominios SH2 (src homology domain) en la parte N-terminal y un dominio cinasa C-terminal separada de los dominios SH2 por una región linker. Se han identificado por mapeo de fosfopéptidos 10 residuos de tirosina en Syk. Los dominios SH2 en tandem de Syk son importantes para la asociación con receptores Fc fosforilados (15).

Por mapeo de fosfopeptidos se han identificados 10 residuos de tirosina en Syk que son susceptibles de ser autofosforilados. Después de una reacción de cinasa *in vitro*, la fosforilación de estos residuos de tirosina puede proveer de sitios de unión para sustratos o pueden ser importantes para regulación de la actividad catalítica de Syk. Se sugiere que la fosforilación de tirosina es una característica crítica en la regulación enzimática de Syk y para su función. Las tirosinas fosforiladas presentes en los ITAM funcionan como andamios o anclas para unión de moléculas de señalización adicionales tales como moléculas adaptadoras y enzimas (15).

Estudios estructurales sugieren que las tirosinas del asa de activación (activation loop) son importantes para la regulación de la actividad enzimática de muchas cinasas. En el estado no activado estas tirosinas ocupan el centro catalítico e impiden la unión de ATP y/o del sustrato. La fosforilación de una o

ambas de las tirosinas induce un cambio conformacional que mueve el asa fuera del sitio catalítico, permitiendo las uniones de ATP y/o sustrato. Por ejemplo, cuando se mutan las tirosinas de asa de activación de Syk se bloquea la señal de receptores de inmunoglobulina aunque no haya pérdida de actividad enzimática *in vitro* (19, 20,21).

3. Syk (L) y Syk (S)

La proteína tirosina cinasa Syk [Syk (L) o Syk(A)], presenta una isoforma, SykB [Syk(S)] la cual se genera por una variación en el empalme del ARNm (22).

SykB fue identificada en ratón, rata y células humanas. Esto como una consecuencia de un empalme alternativo de un exón de 69 nucleótidos (23). Este empalme alternativo provoca que SykB carezca de 23 aminoácidos (inserto o región DEL) en la región linker (dominio de unión). Es notable que esta secuencia es altamente conservada en ratón, rata, humano y cerdo (23).

Para entender mejor el papel que tiene SykB se comparó la capacidad de SykA y SykB, como participantes en la transducción de señales dada por entrecruzamiento de un inmunorreceptor. Los resultados muestran que en comparación con SykA, SykB fue mucho menos efectiva para la señalización iniciada por inmunorreceptor. Este defecto está relacionado con la menor capacidad de SykB para unirse a las tirosinas fosforiladas de los ITAMs (22).

Utilizando las células RBL-2H3 Syk⁻ se observó que en contraste con SykA, SykB fue muy ineficiente para estimular entrecruzamiento de FcεRI e inducir fosforilación de tirosina y degranulación celular. Se observó que no aumentó la fosforilación en tirosina de Syk al activar al TCR y no se pudo inducir la secreción de linfoquina en células T (BI-141). También se observó que SykB fue insuficiente en recuperar fosforilación de tirosina inducida por BCR en una variante de la línea DT40 Syk⁻ (23).

Sin embargo, existen reportes que demuestran que la actividad catalítica basal de SykB no fue significativamente diferente a la de SykA en reacciones cinasa-complejo inmune (22).

Como SykA, SykB también es eficiente en causar fosforilación de tirosina en la proteína Cbl (23), así como de otros sustratos tales como PLC-γ1 y ζ en células

Cos-1 transfectadas. Estos datos proveen evidencia de que el inserto linker no afecta la actividad PTK intrínseca de Syk (23).

En estos tres diferentes tipos de células hematopoyéticas la ausencia del inserto linker interfiere drásticamente en la habilidad de Syk para acoplar receptores que contienen ITAM para activación celular (23).

Al parecer, el inserto de 23 aminoácidos tiene un papel importante en la determinación de la localización de la proteína, ya que, estudios inmunocitoquímicos indican que SykA se encuentra en núcleo y SykB en citoplasma, además se ha descubierto que para que Syk pueda traslocar a núcleo, necesita presentar un dominio linker completo (23).

Estos resultados implican que los 23 aminoácidos del inserto linker tienen una influencia global en la función de Syk.

Se encontró que SykB fue expresada esencialmente en tumores de seno primario pero no en tejido mamario normal, lo cual sugiere una contribución de SykB a la progresión de tumor mamario ya que SykB no afecta la invasión potencial celular (23).

Se encontró que la sobre expresión de Syk (L) inhibe metástasis e invasión en un modelo experimental de ratón. Para examinar si Syk (L) y Syk (S) exhibían actividad biológica similar en células de cáncer de seno se utilizaron líneas celulares que expresaran a Syk (L) y Syk (S), y se determinó si la expresión de las dos isoformas afectaba la invasión celular, encontraron que la expresión de Syk (L) exhibe un decremento en la capacidad de invasión, pero Syk (S) no afecta la actividad de invasión.

La diferencia de actividad de supresión de invasión entre Syk (L) y Syk (S) puede estar asociada con su diferente localización nuclear. Para examinar si la localización nuclear es requerida para supresión de invasión en células de seno, se realizó un ensayo de quimioinvasión para comparar la capacidad de invasión de células que expresaban Syk (L) o Syk (S) con secuencia de localización nuclear mutada, Syk (L) inhibió la invasión celular, sin embargo, Syk (L) con la NLS mutada no inhibe la invasión, esto indica que el proceso de translocación nuclear de Syk (L) es requerido para actividad de supresión de invasión (22).

4. Vía de señalización y Syk

Una de las vías de señalización en donde más se ha estudiado el papel de Syk, ha sido en la transducción de señales a través de la activación del BCR (24). Después de la activación del BCR (receptor de linfocitos B), la vía de señalización dependiente de Syk regula la expansión clonal, diferenciación y apoptosis de células B. La fosfolipasa C (PLC)- γ 2 y la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3-k) son blancos claves de fosforilación en tirosina de Syk después del entrecruzamiento de BCR; en células B, la fosforilación de PLC- γ 2 por Syk, resulta en activación regulación negativa de las cinasas ERK y JNK (25).

Una importante familia de receptores para la fracción cristalizante de los anticuerpos (receptores Fc) ejerce sus efectos a través de la unión con Syk mediada por los ITAM del Fc. La fosforilación de las siguientes proteínas es independiente de Syk: la subunidades β y γ de Fc ϵ RI, la polifosfato 5-fosfatasa inositol que contiene el dominio SH2, SHIP, y las proteínas tirosina fosfatasa que contienen el dominio SH2, SHP-1 y SHP-2 (26,27,28). Sin embargo, estas moléculas pueden regular señales regulación negativa generadas por la activación de Syk. En contraste, la fosforilación inducida por Fc ϵ RI de un gran número de proteínas es regulación negativa de Syk. Estos resultados no necesariamente implican que estas proteínas sean directamente fosforiladas por Syk, aunque algunas pueden ser sustratos de Syk (26, 27,28).

Syk fosforila preferentemente las subunidades de α -tubulina en microtubulos. La α -tubulina es una de las proteínas identificadas como un sustrato de Syk *in vivo*. Syk juega un papel en la fosforilación de tirosina de tubulina; la fosforilación regula la habilidad de los microtúbulos del citoesqueleto para proveer andamios y ensamblar complejos de señalización (29).

Un inhibidor de Syk (piceatanol) bloquea la fosforilación de la tubulina estimulada por receptor (30). La tubulina no es fosforilada en líneas de células B deficientes de la cinasa Syk (31).

5. Función de Syk en células del sistema inmune

Syk es una proteína que es expresada, como ya se menciono, en la mayoría de las células hematopoyéticas, está presente en células B, células cebadas y en células T inmaduras (32).

Syk es una molécula involucrada en la degranulación de las células cebadas. Las células cebadas deficientes en Syk no presentan degranulación después de la agregación del FcεRI. La expresión de Syk en células cebadas RBL-2H3 reconstituye eventos de señalización y liberación de histamina (33). Estas células juegan un papel importante en la patofisiología de desordenes como el asma y alergias o liberación de mediadores como histamina, proteasas, leucocitos y citocinas. Estos mediadores son muy importantes en la etiología y síntomas de asma y otros trastornos alérgicos (34).

Un evento crucial en la vía de señalización regulación negativa, seguida a la activación de células cebadas es la activación de Syk. Syk actúa como un iniciador central de la vía de señalización mediada por FcεRI y es necesario para liberación de mediadores inducido por antígeno (34,35). Adicionalmente, la inhibición de la fosforilación de Syk con piceatanol inhibe la respuesta funcional en células cebadas, incluyendo liberación de mediadores (36), bajo la hipótesis de que la inhibición de la actividad de Syk puede atenuar la liberación de mediadores pro-inflamatorios y citocinas desde células cebadas mediante FcεRI. Se llevó a cabo un análisis estructura-actividad encontrando al [1.6] naftarina 5-7 disustituido como un potente inhibidor de la tirosina cinasa Syk, que puede bajo evaluación biológica funcionar como agente terapéutico directo del asma y trastornos alérgicos (37).

En células B, Syk es un regulador clave de Akt. Akt es una proteína cinasa de serina/treonina que puede ser activada por unión de diversos ligandos a receptores presentes en la superficie de diversas células, incluyendo BCR. Akt fosforila moléculas blanco involucradas en múltiples procesos biológicos, incluyendo apoptosis (38), ya que Syk induce activación de Akt dependiente de PI-3K y por tanto inhibición de apoptosis (39,40)

6. Función de Syk en células no hematopoyéticas

Trabajos recientes muestran que Syk exhibe un modelo muy amplio de expresión en varias células no hematopoyéticas (41, 42). Así, la función de Syk parece no limitarse a la señalización vía inmunoreceptor. Syk es también expresada en varias células no hematopoyéticas, y parece jugar una función fisiológica general en una amplia variedad de células (41). Por ejemplo Syk es expresada en hepatocitos humanos y existe acumulación de gránulos de glicógeno en células de hígado Syk- (probable desorden metabólico) (41,42).

En células de carcinoma de colon humano, la expresión del gen syk es reprimido de manera dependiente de p53, sugiriendo que la pérdida de función de p53 durante la tumorigenesis, puede llevar a desregular la actividad de Syk (42).

Tabla 4. Función de Syk en células no hematopoyéticas

Syk en células no hematopoyéticas	Función
Fibroblastos	Syk es involucrada en la diferenciación de células 3T3-L1 (fibroblastos embrionicos de ratón) hacia adipocitos y adipogénesis.
Células epiteliales	Pérdida de expresión de Syk es asociada con la adquisición de tumor maligno de seno. Syk puede actuar directamente como supresor de tumor.
Hepatocitos	Syk juega un papel importante en eventos de señalización de hepatocitos, así como pasos de señalización que llevan a activación de ERK por receptores acoplados a proteína G. Acumulación anormal de gránulos de glicógeno en hígado en humano y dos líneas celulares derivadas de hígado de rata Syk deficientes (43).
Células Neuronales	Syk está involucrada en la diferenciación celular de células neuronales P19 de carcinoma embrional. Además, la sobre expresión de Syk produce excesiva formación de neuronas.
Células endoteliales	Defectos morfológicos en ratones deficientes de Syk. Migración deteriorada y proliferación de HUVECs (células endoteliales de vena umbilical humana) por sobre expresión de mutantes dominantes negativas Syk.

Modificada de Yanagi S. et al.2001

7. Función de Syk como regulador de la transformación de células de seno

Syk es comúnmente expresada en tejido normal de seno humano, en lesiones benignas de seno y en líneas celulares de cáncer de seno con bajo grado tumorigénico (44).

Esta proteína puede actuar como un supresor de tumor, posiblemente por control de división celular, además es un potente modulador de crecimiento celular epitelial y un supresor de tumor potencial del carcinoma de seno humano (44).

Se reporta que la pérdida de expresión de Syk está asociado con la adquisición de un fenotipo de tumor maligno de seno.

Se propone que la pérdida de expresión de Syk puede funcionar junto con otras alteraciones genéticas, en los procesos múltiples de desarrollo y progresión de tumores de seno (44).

En estudios de animales (murino), la expresión de Syk fue detectada en una variedad de órganos incluyendo glándula mamaria (45).

La función de supresión de invasión fue reportada por estudios que muestran que las células transfectadas con Syk wt (wild type, tipo silvestre) exhiben disminución de la tumorigénesis y de la potencia metastásica (44, 45).

La expresión del ARNm de Syk y de la proteína que codifica, es bajo o no detectable en carcinoma invasivo de tejido de seno y en líneas celulares altamente invasivas. La transfección de Syk wt a una línea celular de cáncer de seno que no la expresa, inhibe el crecimiento de tumor y formación de metástasis en un modelo murino (45). Recíprocamente, la sobre expresión de una proteína Syk catalíticamente inactiva en una línea celular de cáncer de seno que expresa una Syk con actividad normal, incrementa significativamente la incidencia de invasión y crecimiento de éste en el mismo modelo (44).

Existen reportes de que Syk es expresada en células MCF7, pero no en células MDA-MB 231 (líneas de carcinoma de seno). La sobre expresión de Syk wt (tipo silvestre) en células MDA-MB231 suprime la motilidad celular e inhibe la activación de fosfatidilinositol PI-3 cinasa. En contraste, cuando el antisentido s-oligonucleótido específico Syk (ASSyk) fue transfectado a células MCF7, el

nivel de actividad de PI-3 cinasa así como también la motilidad celular fueron incrementados (46).

Al transfectar la línea MDA-MB231 con DNAc Syk wt seguido por tratamiento con picetanol (inhibidor de Syk), aumenta la motilidad celular y la actividad de PI-3 cinasa. Se utilizó el pervanadato (el cual es un inhibidor de proteínas fosfatasa de tirosina), que induce actividad de PI-3cinasa y estimula la interacción entre el inhibidor del factor nuclear $\text{KB } \alpha$ ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$) y el dominio $\text{P85}\alpha$ de la PI-3cinasa, la cual es responsable de la regulación de la PI3-cinasa a través de la fosforilación en tirosina del $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ lo cual finalmente resulta en activación de NF κ B (46).

Syk suprime la activación transcripcional de NF κ B y la interacción entre $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ y PI-3 cinasa inhibiendo la fosforilación en tirosina de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$. Syk inhibe la secreción del péptido activador de plasminógeno tipo uroquinasa (UPA), el cual es un miembro de la familia serina proteasa; su función consiste en convertir el plasminógeno en plasmina, este producto final regula la invasión celular por degradación de proteínas de matriz.

Reportes previos muestran que el UPA tiene un papel significativo en el crecimiento de tumores y metástasis. La vía por la cual Syk controla la secreción de UPA activación dependiente de PI-3cinasa es por inhibición de la interacción entre la subunidad $\text{P85}\alpha$ de PI-3cinasa e $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ fosforilado en tirosina (46).

En un estudio realizado a pacientes con expresión reducida de Syk en tejido de cáncer de seno de alto riesgo y metástasis mostraron significativamente mal pronóstico para cáncer de seno (47).

La hipermetilación representa un mecanismo epigénético para inactivar una variedad de genes supresores de tumor. La hipermetilación del gen syk sugiere que Syk juega un papel importante en malignidad mamaria, ya que Syk puede estar asociada con fenotipo maligno así como incremento en motilidad e invasión. Existen datos que sugieren que la hipermetilación de un promotor llega a silenciar un gen y puede afectar una variedad de vías claves en células germinales. Está hipermetilación en la región promotora ocurre en más del 30% de casos de cáncer de seno primario (47).

La metilación del promotor produce cambios que ocurren en cáncer y están asociados con represión transcripcional y la pérdida de función del gen por interrumpir la unión de proteínas involucradas en el complejo activador de la transcripción. Esta inactivación puede ser por la pérdida en la función, mutación en la región codificadora de genes o por alteración epigénética en la forma de metilación de la región promotora (48,49).

Reportes evidencian que el silenciamiento del gen syk ocurre en neoplasias primarias de seno y tiene significancia biológica en tumorigénesis (47).

En 28% de 90 muestras de cáncer de seno y tejido adyacente no canceroso se examinó la expresión de ARNm de Syk mediante RT PCR (48). 32% de 25 casos que mostraron reducción de expresión de ARNm de Syk, mostraron metástasis, mientras 6% de 65 casos que no mostraron reducción de expresión de ARNm de Syk no presentaron metástasis. Estos datos sugieren que la reducción o pérdida de expresión de Syk está involucrada en la metástasis de cáncer de seno humano, aunque este mecanismo molecular en carcinogénesis aún no es claro (47).

8. Efecto de la oncoproteína E6 sobre Syk en células T:

Los tipos de virus HPV16 Y 18 expresan a las proteínas oncogénicas E6 y E7, que a su vez se asocian con proteínas celulares que regulan el crecimiento. E6 interactúa con el supresor de tumores p53 e induce su degradación por ubiquitinación, siendo este el principal efecto de la proteína E6.

Durante el curso de un experimento examinando la señalización de la proteína tirosina cinasa Syk en uno de los modelos celulares más ampliamente utilizados y estudiados, línea de células T de leucemia, Jurkat (células que expresan a Syk), se encontró que líneas derivadas de Jurkat, las cuales sobre expresan la proteína E6 de HPV16, J. Cam 1 y J45.01, fallan para producir a la proteína Syk, a diferencia de las células Jurkat que no expresan a E6, las cuales si expresan a Syk (50).

La ausencia de Syk en estas células es en parte consecuencia de una inserción de un nucleótido de guanina en la posición 92 en el marco de lectura abierta de Syk, resultando un cambio en la estructura del gen, la cual da origen

al uso alternativo de 2 codones ocasionando la terminación prematura del marco de lectura abierta en la posición 102.

Todos los DNAC de Syk en clones de Jurkat transfectadas con E6 aislados, presentaban la inserción de guanina. La carencia de Syk no parece alterar significativamente la respuesta de las células mediante TCR cuando se compara con clones Jurkat que expresan a Syk y a Zap-70 (50).

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer cervico uterino es un problema de salud pública en México, ya que es la principal causa de muerte en mujeres debido a la tasa de incidencia de este, seguido por el cáncer de mama.

La mayor parte de las displasias son diagnosticadas en la mujer después de los 20 años de edad. El cáncer *in situ* se presenta de manera significativa entre los 30 a 39 años de edad y el carcinoma invasor después de los 40 y 50 años con una incidencia global de 400 casos nuevos diagnosticados cada año (5). Aunque no es claro cuales son los eventos moleculares que llevan a la transformación maligna, se ha reportado que la proteína tirosina cinasa Syk es comúnmente expresada en células epiteliales normales de seno, y que la pérdida de expresión de Syk esta asociada con la adquisición de un tumor con fenotipo maligno de seno y que Syk puede actuar como un supresor de tumor, posiblemente controlando división celular (44). Dado que el carcinoma de cérvix tiene un origen epitelial, es probable que esta cinasa este presente de manera similar que en cáncer de seno.

En base a los antecedentes anteriores, se determinará la presencia o ausencia de Syk en tejidos provenientes de diferentes estadios de carcinoma de cérvix.

V. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL:

Determinar la presencia de la proteína tirosina cinasa Syk en cortes histológicos de diferentes estadios de carcinoma de cérvix.

B. OBJETIVOS PARTICULARES:

Estandarizar la técnica de inmunohistoquímica.

Analizar la presencia de Syk en cortes histológicos obtenidos a partir de biopsias de diferentes estadios de carcinoma de cérvix.

VI. HIPÓTESIS

Syk puede actuar como supresor de tumor posiblemente controlando división celular y la ausencia de Syk está asociada con la adquisición de un fenotipo maligno de seno, por lo que esta podría no estar presente en los diferentes estadios avanzados de cáncer de cérvix.

VII. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Tipo de estudio: Experimental.

Población: Cortes histológicos de cérvix, tejido normal de cérvix (N8 y N6), una muestra de Infección temprana infectada con HPV, F20 muestra de estadio IIIB 8 (HPV18), F21 muestra de estadio IVB (HPV16), F19 muestra de estadio indeterminado (HPV16), F32 muestra de estadio indeterminado, 57x muestra de estadio indeterminado, 55x muestra de estadio indeterminado.

Las laminillas de cortes de diferentes estadios de carcinoma de cérvix fueron proporcionadas por la Dra. Leticia Rocha Zavaleta del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Criterios de inclusión: Cortes de tejido normal, cortes de tejido transformado.

Variable: Presencia de la cinasa Syk.

Material:

- Micropipetas de 1000 μ L, 200 μ L, 100 μ L, 20 μ L, 2 μ L
- Equipo de Doble tinción Doblestain system. Dako corporation C.A USA.
- Cajas de petri.
- Cubreobjetos.
- Portaobjetos.
- Pinzas.
- Parrilla de calentamiento.
- Balanza analítica.
- Vasos de precipitado de 50 mL

Equipo:

- Microscopio óptico (cámara Leica DC100).
- Estufa (Felisa).
- Horno de Microondas.
- Cámara de humedad.
- Refrigerador.

VIII. METODOLOGÍA

INMUNOHISTOQUÍMICA

TÉCNICA DE PEROXIDASA

Técnica indirecta para líneas de carcinoma de cérvix:

Las líneas celulares CALO, INBL, HeLa, Caski, Vibo, C33 y MCF7 fueron cultivadas en cajas Petri de vidrio, en las cuales se colocaron cubreobjetos con la finalidad de que se adhirieran a los mismos. Se sembraron con medio RPMI enriquecido con 10% de suero fetal de bovino por 24hs, después de pasado este tiempo, se retiró el medio y se adicionó RPMI solo por 24hs. Una vez transcurrido este tiempo, las células se fijaron con acetona-metanol (1:1) y se procedió a realizar la siguiente técnica:

1. Se adicionó H₂O₂ Al 0.3% por 5 min.
2. Se enjuagó con PBS 1x enseguida.
3. Se adicionó unas gotas de Suero Normal Diluido del sistema de detección ABC-Vectastain durante 5 min.
4. Se decantó el exceso de Suero Normal Diluido.
5. Se adicionó el anticuerpo primario anti-Syk (5µg) a temperatura ambiente en cámara húmeda por 70 min.
6. Se lavaron las células con PBS 1x durante 5 min.
7. Se agregó el anticuerpo secundario anti-conejo (1:100) a temperatura ambiente en cámara húmeda por 70 min.
8. Se lavó con PBS 1x (tres veces).
9. Se agregó diaminobencidina (0.5mg/mL) (9min.)
10. Se lavó con PBS 1x (tres veces).
11. Se agregó OPD (0.5mg/ml) (9min)
12. Se lavó con PBS 1x (tres veces)
13. Se agregó cromógeno DAB (diaminobencidina) (se deja 20 min., se enjuaga con PBS)
14. Se tñó con hematoxilina por 60 segundos.
15. Se enjuagó con agua corriente y enseguida con agua a 40°C.

16. Se Capturaron imágenes de las células teñidas al observar al microscopio óptico (cámara Leica DC100).

Técnica de doble tinción para cortes histológicos de cérvix:

Se analizaron las siguientes muestras:

- N8 y N6 tejido normal de cérvix.
- 1 muestra de Infección temprana infectada con HPV.
- F20 muestra de estadio IIIB 8 (HPV18).
- F21 muestra de estadio IVB (HPV16).
- F19 muestra de estadio indeterminado (HPV16).
- F32 muestra de estadio indeterminado.
- 57x muestra de estadio indeterminado.
- 55x muestra de estadio indeterminado.

Las laminillas de cortes de diferentes estadios de carcinoma de cérvix fueron proporcionadas por la Dra. Leticia Rocha Zavaleta del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Se realizó lo siguiente:

1. Se desparafinaron las laminillas con los cortes en la estufa por espacio de 10 min. aproximadamente a 60° C.
2. Se pasaron por el tren de xilol y alcohol, al 100%, 96% y 75% y finalmente agua destilada; en cada uno de éstos por espacio de 5 min.
3. Se colocaron las placas en un molde con el recuperador de antígenos, se dejó actuar 5 min. en el microondas, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se eliminó el recuperador de antígenos.
4. Se agregó el buffer salino por espacio de 5min.
5. A partir de este punto se comenzó a utilizar el Equipo de doble tinción, Doblestain System. Dako corporation C.A USA, todo se hizo en cámara de humedad.

6. Se procedió a bloquear la peroxidasa (1 gota o de manera que cubra por completo la muestra), con H_2O_2 0.3%.
7. Se adicionó a cada uno de los cortes el anticuerpo primario antiSyk (N-19, Santa Cruz Biotechnology), dilución 1:6. El tiempo de incubación fue dejarlo toda la noche a 4°C.
8. Se utilizó el Equipo, frasco que contiene una polimérica con varios anticuerpos secundarios y varias peroxidases, se cubrió la muestra.
9. Se utilizó el Equipo de doble tinción. Solución cromógeno, dos contenedores, uno de buffer y otro del cromógeno (DAB) , del primero se tomaron 100 μ L con 3 μ L del segundo, se mezclaron y se espero un lapso de 10min antes de usarse; esta solución también se preparo en el instante de uso. Se agrego la solución necesaria para cubrir la muestra. La solución del cromógeno se dejo por espacio de 3min, y se observó.
10. Posteriormente se contratiñó con hematoxilina se dejo actuar 1 min. se enjuago con agua corriente y enseguida con agua a 40° C.
11. Finalmente se observaron las placas al microscopio óptico (cámara Leica DC100) y se montaron adicionando una gota de resina, y se coloco un cubreobjetos evitando la formación de burbujas.

Se agradece por su asistencia técnica a la adecuación de la técnica de doble tinción a las alumnas: Itzel del Río Ortiz, Evelín Escamilla Bello y Reina Roldan Pérez y a la maestra Rosalva Rangel Corona.

IX. RESULTADOS

A. Estandarización de la técnica: Técnica indirecta:

En esta técnica indirecta, la peroxidasa conjugada con un anticuerpo de una especie es dirigida contra los componentes de la inmunoglobulina del anticuerpo primario.

Para comprobar la presencia de Syk en líneas celulares, tejido normal y transformado de carcinoma de cérvix se procedió a realizar la inmunohistoquímica (técnica de anticuerpos conjugados con la peroxidasa).

Se llevo a cabo primeramente la estandarización de la técnica de inmunohistoquímica, técnica indirecta para las líneas celulares de carcinoma de cérvix: CALO, INBL, Caski, Vibo, HeLa y C33.

La concentración óptima de anticuerpo primario (anti Syk, Santa Cruz Biotechnology) en la técnica indirecta fue finalmente de 5 μ g y para el secundario (anti conejo, Zymed Laboratories) 1:100, el tiempo de incubación de los anticuerpos (anti-Syk y anti-conejo) fue de 70 min. (Tabla 1), además de uso de mayor cantidad de cromógeno (diaminobencidina). Estas condiciones fueron adecuadas para las líneas.

Para los cortes histológicos de cérvix se utilizó una modificación de la técnica indirecta (Equipo de doble tinción), en la que se determinó que la dilución óptima para el anticuerpo primario fue de 1:6. El tiempo de incubación de 70min no fue el óptimo para este tipo de muestras, por lo que después de una serie de pruebas se determinó que el tiempo adecuado de incubación era de toda la noche a 4⁰C en cámara húmeda (Tabla 2); en el caso del anticuerpo secundario se mantuvo la dilución determinada en la técnica indirecta (1:100). El anticuerpo secundario se incubó el tiempo indicado por el Equipo (20 min.).

Tabla 1. Condiciones probadas, para las líneas de carcinoma de cérvix:

Panel de concentración de anticuerpo primario	Tiempo de incubación
AntiSyk (μg)	Minutos.
0.1	70
1.0	70
2.0	70
4.0	70
*5.0	*70

*Condiciones óptimas.

Tabla 1. Estandarización de la técnica, las condiciones fueron a temperatura ambiente, en cámara húmeda, la cantidad de cromógeno (diaminobencidina) adicional fue de 40 μL . Dilución del Anticuerpo secundario (anti-conejo): 1:100, el tiempo de incubación fue de 70 min.

Tabla 2. Condiciones probadas para los cortes de carcinoma de cérvix:

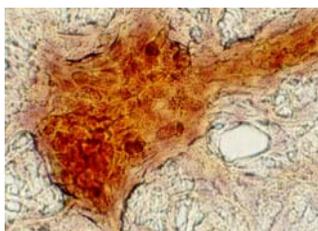
Panel de diluciones de anticuerpo primario	Tiempo de incubación
AntiSyk (Diluciones)	Minutos
1:1000	70
1:500	120
1:200	300
1:100	300
*1:6	*Toda la noche.

*Condiciones óptimas.

Tabla 2. Estandarización de la técnica, las condiciones de temperatura fueron a 4°C, en cámara húmeda. Dilución del Anticuerpo secundario (anti-conejo): 1:100, el tiempo de incubación fue de 20 min.

B. Presencia de Syk en líneas de carcinoma de cérvix

Una vez estandarizada la técnica Inmunohistoquímica, se procedió a analizar las líneas. La línea de carcinoma de seno MCF7 fue utilizada como control positivo para la presencia de Syk (45, 22). En la figura 1 se puede observar la expresión de la cinasa Syk en la región citoplásmica de las células.



MCF7 400X

Figura 1. La línea MCF7 de carcinoma de seno, control positivo de Syk. Se observa tinción positiva para Syk, tinción marrón. La inmunohistoquímica de Syk se realizó con anticuerpo anti Syk (LR) (Santa Cruz Biotechnology). Contratinción con hematoxilina.

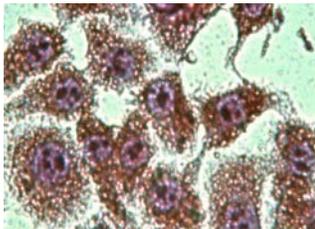
Para comprobar la presencia de esta cinasa en cáncer de cérvix se utilizaron las líneas CALO, INBL, Caski, Vibo, HeLa, C33.

Al utilizar la línea CALO, (HPV18 IIIB) (Fig. 2A) se puede observar la presencia de coloración marrón (tinción positiva para Syk) en la región citoplásmica de las células de esta línea, observándose la coloración de contraste (morado) en el núcleo de las células, se utilizó como colorante de contraste hematoxilina.

En el caso de la línea INBL (HPV18 IVB) (Fig. 2B) se observa la presencia de Syk, también presentando tinción marrón en la misma forma que en la línea CALO.

En la línea Caski, (HPV18) (Fig. 2C) se observó la presencia de Syk aunque la intensidad de tinción es menor en esta línea que en el caso de las líneas CALO e INBL.

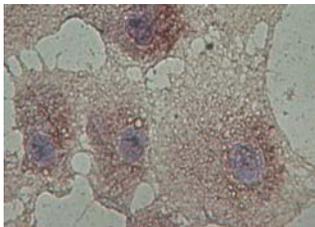
En el caso de las células HeLa, (HPV18) (Fig. 2D) se presentan zonas aisladas y pequeñas con la presencia de Syk, sin embargo la mayor área es tinción negativa para Syk.



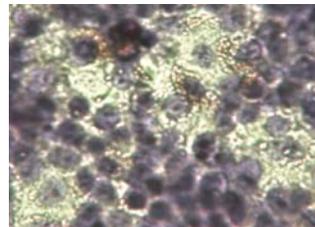
(A) **CALO 400X**



(B) **INBL 400X**



(C) **CASKI 400X**

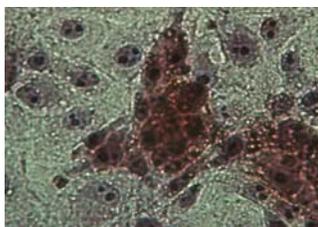


(D) **HeLa 400X**

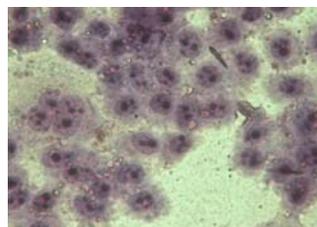
Figura 2. Cuatro líneas de carcinoma de cérvix, HPV18, CALO (A), INBL (B), Caski (C) y HeLa (D). Se observa tinción positiva en las cuatro líneas (tinción marrón). La Inmunohistoquímica de Syk se realizó con anticuerpo anti Syk (LR) (Santa Cruz Biotechnology). Contratinción con hematoxilina.

También se analizaron las líneas celulares Vibo y C33 que son negativas para HPV. En el caso de Vibo (HPV-) (Fig. 3A), se observa claramente la presencia de Syk en un grupo de células aglomeradas, presentado una tinción marrón intensa, también se observan espacios con ausencia de Syk.

En C33 (HPV-) (Fig. 3B) se presenta tinción negativa para Syk, observándose sólo el color morado (tinción negativa para Syk) en las células (Tabla 3).



(A) **Vibo 400X**



(B) **C33 400X**

Figura 3. Dos líneas de carcinoma de cérvix: Vibo (A) y C33 (B) (ambas negativas para HPV). Se observa tinción positiva en la línea Vibo. En la línea C33 se observa tinción negativa para Syk, tinción morado.

La Inmunohistoquímica de Syk se realizó con anticuerpo anti Syk (LR) (Santa Cruz Biotechnology). Contratinción con hematoxilina.

Tabla 3. Presencia de Syk en líneas de carcinoma:

Líneas	Presencia de la cinasa Syk (+)
MCF7 (control)	+++
CALO (HPV18)	+++
INBL (HPV18)	+++
Caski (HPV18)	++
HeLa (HPV18)	+/-
Vibo (HPV-) *	+/-
C33 (HPV-)*	-

* Negativa para HPV

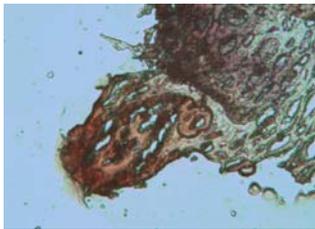
C. Presencia de Syk en cortes de tejido de carcinoma de cérvix

Una vez estandarizada la técnica Inmunohistoquímica con las líneas celulares (Técnica de doble tinción), se procedió a analizar los cortes de tejido de carcinoma de cérvix.

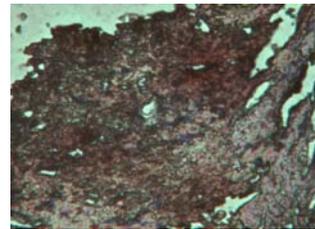
Con la finalidad de comparar la presencia de Syk en cortes de tejido de diferentes estadios de carcinoma de cérvix se procedió a realizar la Inmunohistoquímica a diferentes cortes de tejido.

Se analizaron dos muestras de tejido normal N8 y N6. En N8 (tejido normal de cérvix) (Fig. 4A) se observa la presencia de Syk presentando una clara y fuerte tinción, se observa un área pequeña de tinción negativa para Syk.

En N6 (tejido normal de cérvix) (Fig. 4B) también se observan zonas con la presencia de Syk, las células se encuentran aglomeradas por lo que se observa la figura completamente teñida de marrón (tinción positiva para Syk).



(A) N8 400X



(B) N6 400X

Figura 4. Dos cortes de tejido normal de cérvix N8 (A) y N6 (B). En ambas se observa tinción positiva para Syk. La inmunohistoquímica de Syk se realizó con anticuerpo anti Syk (LR) (Santa Cruz Biotechnology). Contratinción con hematoxilina.

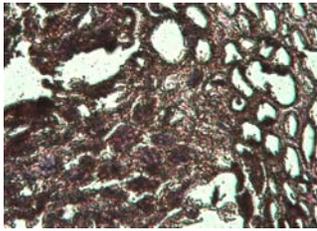
También se analizó una muestra de infección temprana infectada con HPV (Fig. 5A) se observó una pronunciada tinción positiva para Syk.

Se analizaron muestras de las cuales se conocía el estadio de la biopsia, además se analizaron muestras de las cuales no se pudo obtener información sobre el estadio.

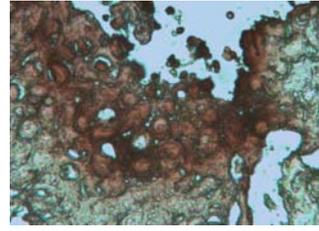
En la Inmunohistoquímica realizada a la muestra F20 (IIIB HPV 18) (Fig. 5B) se observa la presencia de Syk en algunas células presentes en el tejido, encontrando zonas no teñidas que indican ausencia de Syk.

En la muestra F21 (IVB HPV16) (Fig. 5C), se observa tinción positiva para Syk alrededor de lo que parece la luz de un vaso sanguíneo, en el resto del tejido no se distingue la presencia de Syk.

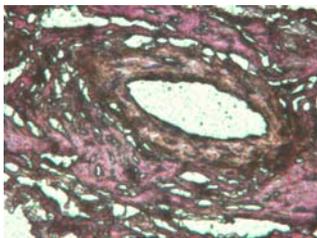
En la muestra F19 (HPV16) (Fig. 5D) se observan zonas aisladas de coloración marrón intensa (presencia de Syk) a lo largo del corte del tejido, aunque este se encuentra ligeramente teñido de marrón en su totalidad; al parecer Syk está presente en todo el tejido.



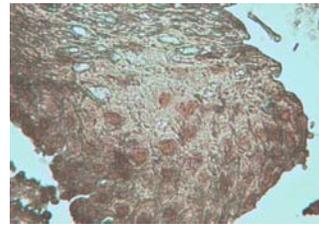
(A) IHPV 400X



(B) F20 (IIIB HPV 18) 400X



(C) F21 (IVB HPV16) 400X



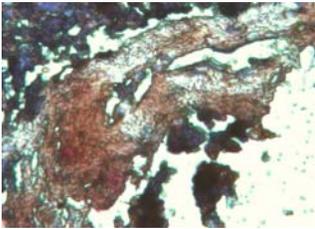
(D) F19 (HPV16) 400X

Figura 5. Cuatro cortes de tejido: infección temprana con HPV (A), F20 (IIIB HPV 18) (B), F21 (IVB HPV16) (C), F19 (HPV16) (D) de esta última biopsia no se contó con información de estadio. Se observa tinción positiva para Syk en todas las muestras, con diferente grado de presencia. La inmunohistoquímica de Syk se realizó con anticuerpo anti Syk (LR) (Santa Cruz Biotechnology). Contratinción con hematoxilina.

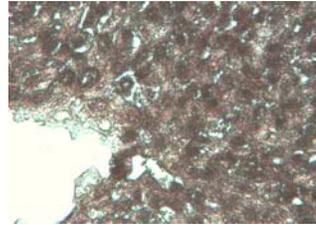
En F32 (Fig. 6A) es clara la presencia de Syk, también con zonas de ausencia, se puede observar cierta aglomeración de las células ya que la tinción positiva para Syk es pronunciada lo mismo se observa en la tinción negativa en la periferia de la figura.

En cuanto al corte 57x (Fig. 6B), se lograron distinguir zonas positivas de Syk, que predominan. Se logra distinguir la tinción marrón aún cuando las células se encuentran aglomeradas.

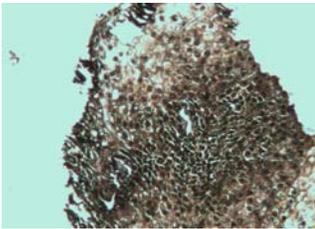
En la muestra 55x (Fig. 6C) se observa mayor tinción negativa para Syk aunque en algunas zonas se observa coloración marrón.



(A) F32 400X



(B) 57x 400X



(C) 55x 400X

Figura 6. Tres cortes de tejido de carcinoma de cérvix de los cuales no se contó con información de estadio, F32 (A), 57x (B), 55x (C), Sin embargo en todos los cortes se observó tinción positiva para Syk. La inmunohistoquímica de Syk se realizó con anticuerpo anti Syk (LR) (Santa Cruz Biotechnology). Contratinción con hematoxilina.

Tabla 4. Presencia de Syk en cortes de tejido de cérvix normal y transformado:

Cortes de tejido (Muestras)	Presencia (+)
*N8	+++
*N6	+++
IHPV**	+++
F20 (IIIB HPV18)	++
F21 (IVB HPV16)	+
F19 (HPV16)	++
F32	++
57x	+++
55x	+++

*Tejido normal

**Infección temprana de HPV

X. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Existen reportes de la expresión de Syk en líneas celulares de origen epitelial aunque su función en estas células aún es desconocido (46).

Syk es expresada en tejido normal de seno humano, en lesiones benignas y en líneas de baja tumorigenicidad. Esta proteína es considerada un potente modulador de crecimiento celular y supresor de tumor en carcinoma de seno humano (45).

En este trabajo se determinó la presencia de Syk en líneas celulares de carcinoma de cérvix y en tejido normal y transformado proveniente de biopsias de diferentes estadios de carcinoma de cérvix, y se realizó la inmunohistoquímica (técnica de peroxidasa) a estas muestras.

Para llevar a cabo la estandarización de la técnica inmunohistoquímica se determinó la cantidad adecuada de anticuerpo primario antiSyk (Santa Cruz Biotechnology) utilizando la técnica indirecta para las líneas celulares. Se utilizaron diferentes concentraciones de anticuerpo: 0.1 μ g, 1 μ g, 2 μ g, 4 μ g, 5 μ g siendo esta última la adecuada para las líneas; en el caso del anticuerpo secundario, anti-conejo conjugado con peroxidasa, se utilizó el sugerido por la técnica original, 1:100. Además, se utilizó mayor cantidad de cromógeno, (40 μ L más de diaminobencidina debido a que este se considera un cromógeno muy estable y contrasta bien con el colorante nuclear hematoxilina) para aumentar el precipitado granular colorido y ya que no resultó sencillo localizar a la proteína Syk con la cantidad de cromógeno propuesta por la técnica. Este aumento nos permitió identificar más fácilmente a la proteína debido al aumento del precipitado. se utilizó una modificación de la técnica indirecta (técnica de doble tinción), además de que no se utilizaron las mismas condiciones para los cortes de cérvix, debido a las diferentes características de los cortes con respecto a las líneas, ya que estos pueden expresar otras proteínas, además de que los cortes de tejido pasan por un proceso de fijado con formalina e inclusión en parafina lo que puede dañar en un momento dado al antígeno.

También la deparafinación es una característica única de los cortes, y es muy importante eliminar completamente la parafina para evitar la coloración de fondo que pueda interferir en la interpretación de los resultados y si esta no se

elimina correctamente, incluso puede evitar que el anticuerpo se una a su proteína blanco. En algunas ocasiones las muestra de tejido no eran del tamaño adecuado o el tejido se encontraba aglomerado haciendo difícil la observación de la proteína. Encontramos que el grosor adecuado de los cortes para realizar la inmunohistoquímica es de 2-3 μm ; sin embargo, esta técnica presenta ciertas ventajas ya que pese a que necesita dos incubaciones y es en consecuencia más larga, es sensible y muy versátil. Con esta técnica se puede identificar cualquier número de antígenos diferentes, teniendo los anticuerpos conjugados con peroxidasa. Una de las ventajas de las modificaciones de la técnica indirecta (de doble tinción) es el uso de un recuperador de antígenos que lleva a cabo la concentración de estos, lo que facilitó la observación de la proteína Syk que la técnica indirecta no permitió.

Al determinar la cantidad adecuada de anticuerpo primario (antiSyk) se comenzó utilizando primeramente la dilución 1:1000 y se fue concentrando paulatinamente 1:500, 1:200, 1:100 y 1:6 esta última resultó la óptima para obtener una coloración adecuada. El tiempo de incubación fue de 70min, que es el adecuado para las líneas pero no fue el óptimo para los cortes histológicos. Probablemente el tratamiento de las muestras provocó una desnaturalización de la proteína de interés, por lo que se hizo necesario, además del uso de un recuperador de antígeno, incubar el anticuerpo primario toda la noche, dando así oportunidad para que el anticuerpo pudiera unirse a Syk de manera óptima. Se utilizaron tiempos de incubación de 70 min., 120min. 300min, hasta que se optó por dejarlo toda la noche. El anticuerpo secundario se incubó por un tiempo de 20 min. propuesto por el Equipo resultando adecuado.

Otras ventajas de la técnica de doble tinción es que se pueden identificar dos antígenos a la vez, el tiempo de incubación es corto aunque en este caso particular se aplicó sólo el tiempo de incubación sugerido por el Equipo para el anticuerpo secundario, la técnica es de uso sencillo, en general el sistema es más específico que la técnica indirecta, lo que permitió la identificación de la proteína Syk.

Una vez estandarizadas las técnicas se procedió a comprobar la presencia de Syk en líneas, tejido normal y biopsias con carcinoma de cérvix.

CALO e INBL son las líneas que presentan mayor presencia de Syk, por el contrario en las líneas Caski y HeLa la presencia de Syk es baja y apenas detectable, y no detectable en la línea C33 (HPV-).

En este caso, CALO, INBL, Caski y HeLa, son líneas con presencia de virus HPV18 considerado un virus de alto riesgo. e Al insertar el gen de E6 en células Jurkat, (una línea de células T, que expresan Syk), se obtuvieron diversas clonas entre ellas las J.CaM1 y J45.01, en las cuales Syk no fue detectada, mientras que si fue detectada en células Jurkat sin el insertó E6. Al analizar el gen de syk en estas líneas, se encontró que una inserción de guanina en la posición 92, ocasiona que el marco de lectura abierta de Syk cambie y sufra una terminación prematura, por lo que se trunca la transcripción y por tanto la proteína no es detectada (38). Esto podría explicar por que en las líneas Caski y HeLa se encuentra disminuida la presencia de la proteína; también podría deberse a una alteración epigénética como la hipermetilación del gen syk.

Estos datos, aunados a lo descubierto en cáncer de seno, nos hicieron pensar que Syk estaría ausente o en un nivel muy bajo en carcinoma de cérvix, sin embargo, no fue así. Al parecer la inserción de E6 genera diferentes fenómenos, dependiendo del contexto celular que se tenga. En líneas celulares derivadas de células T, uno de sus efectos fue que provocó una inserción de guanina en el gen syk, el cual tuvo como consecuencia la pérdida de la expresión de Syk; al parecer este fenómeno no ocurre en las células epiteliales, ya que Syk pudo detectarse en la mayoría de ellas; estas células presentan un contexto celular diferente (además de ser el blanco natural para E6) y funciones diferentes en comparación con células T, aunque finalmente podríamos suponer que la presencia de E6 podría estar determinando la presencia o ausencia de Syk en las líneas Caski y HeLa.

Se observa disminuida la presencia en las muestras que son positivas para HPV16 en comparación con el corte que es positivo para HPV18: F20 IIIB HPV18. El HPV16 es considerado un tipo de virus más agresivo y probablemente por la expresión de la proteína E6 sea más efectivo para contribuir a la eliminación de la proteína Syk.

Por otro lado, se observa que las líneas negativas para HPV, C33 Y Vibo, en Vibo disminuye drásticamente su presencia y en C33 no se observa por lo que

se deduce que puede ser otro factor el que este eliminando la expresión de Syk en estas líneas.

Un mecanismo que puede estar afectando o eliminando la presencia del gen syk es una alteración epigenética: la metilación aberrante o hipermetilación de islas CpG en promotores; esta modificación se asocia con inactivación transcripcional o silenciamiento de genes supresores de tumor y ya que Syk es considerado un posible supresor de tumor, la metilación aberrante puede llevar a desregulación de la expresión del gen (49).

La ausencia de la proteína Syk es reflejada por la pérdida de la expresión del ARNm, lo cual sugiere que la pérdida de expresión de Syk ocurre a nivel transcripcional como resultado de metilación del DNA; la inhibición química de la hipermetilación de DNA, parcialmente restaura la expresión de Syk en cáncer de seno (46,49).

Aunque el mecanismo responsable de la pérdida de expresión aún no es claro, algunos estudios indican que hipermetilación es el principal mecanismo para el silenciamiento de genes supresores de tumor.

Existen datos donde se relaciona la hipermetilación del DNA con el silenciamiento del gen syk; por ejemplo se encontró en cáncer de seno que la hipermetilación en DNA de syk en 7 de 43 casos, produjeron pérdida de expresión de Syk (45).

También se encontró que en cáncer de ovario de 7 pacientes que muestran hipermetilación en el promotor del gen syk, 3 presentaron pérdida de expresión de Syk (50).

La información anterior puede llevarnos a suponer que por medio de este mecanismo se produzca la pérdida parcial de expresión de Syk en Caski y HeLa (ambas HPV18) y perdida total de expresión de Syk en la línea C33 (negativa para HPV).

Cabe mencionar que por RT-PCR en la línea C33 se encontró a SykA y en Vibo a SykB, ambas líneas negativas para HPV (datos no mostrados); y por Western Blot se encontró a Syk en las líneas CALO, INBL y HeLa (las tres HPV18) (datos no mostrados). Se considera que se detecto SykA en estas líneas debido a la diferencia en abundancia, ya que la de SykB se reporta baja en comparación con SykA. En linfocitos se reporta un 1% de presencia, sólo en

médula ósea de ratón se reporta en un 50% aunque la significancia de su expresión permanece no clara (22).

En los cortes F32, 57x y 55x no se cuenta con información sobre el estadio y la infección con HPV sin embargo se detectó la presencia de Syk aunque no se pudo llevar a cabo un análisis para determinar si existe relación entre el estadio y la presencia de Syk.

En las muestras de tejido de cérvix normal (N6 y N8) SykA está presente, confirmando lo que se esperaba para estas muestras.

Los resultados obtenidos muestran que a diferencia del carcinoma de seno donde Syk está presente sólo en líneas celulares de carcinoma no invasivo y en tejido normal mamario, en carcinoma de cérvix, Syk está presente en todas las líneas celulares probadas independientemente de su grado de malignidad; así mismo Syk está presente en tejido de estadios avanzados, en tejidos infectados con HPV 18 ó 16 y también en tejido normal está presente.

Sólo se observa en algunos casos disminuida la presencia de Syk y en una sola línea (C33) no se observa lo cual nos lleva a concluir que Syk parece tener una función diferente con respecto a la que presenta en carcinoma de seno.

XI. CONCLUSIONES

- Se establecieron modificaciones y condiciones óptimas de la técnica inmunohistoquímica para las líneas celulares y tejidos de carcinoma de cérvix.
- Se logró observar la presencia de Syk en las líneas celulares, en tejido normal y transformado de cérvix, aunque no se contó con información de algunos estadios.
- Se llevo a cabo el análisis en cuanto a la presencia, disminución y pérdida de Syk en las muestras analizadas y finalmente comparando esto con lo reportado en carcinoma de seno.
- Posiblemente por alteración epigenética hipermetilación, se produce la disminución de Syk en las líneas HeLa, Caski y pérdida de Syk en células C33.
- Syk probablemente no desempeña un papel en carcinoma de cérvix semejante al de carcinoma de seno ya que en el primero Syk está presente independiente del grado de malignidad lo que no ocurre en carcinoma de seno.

XII. PERSPECTIVAS

- Utilizar la técnica modificada, técnica de doble tinción para líneas y tejidos ya que es más específica.
- Contar con información de los estadios de todas las muestras de tejido a probar y poder realizar la relación entre la presencia de Syk y el estadio.
- Determinar si efectivamente por medio de hipermetilación se esta regulando la expresión de Syk en las líneas HeLa y Caski (ambas HPV18) y eliminación de Syk en C33 HPV- y si el virus influye en este proceso. Utilizar PCR para detectar metilación y no metilación del DNA para realizar una relación entre la metilación y la expresión de Syk.
- Utilizar un inhibidor de metilación y detectar con RT-PCR si Syk es expresada.
- Finalmente investigar la función de Syk en las células de carcinoma de cérvix.

XII. ANEXO

Técnica indirecta:

1. Suero Normal Diluido del sistema de detección ABC-Vectastain: Se toman 50 μ L de suero de caballo y se diluyen en 10 mL de PBS.
2. anticuerpos anti-Syk (5 μ g) dilución (1:62.5).
3. Anticuerpo Secundario 100 μ g (1:5000).
4. Diaminobencidina (0.5mg/mL): Se peso 1mg de Diaminobencidina (Sigma) se disuelve en 2 mL de PBS se adicionó 1.3 μ L de peróxido al 0.3%.
5. Ortofenilendiamina: Se peso 1 mg de Ortofenilendiamina (Sigma) y se disuelve en 2 mL de PBS, se adicionó 0.54 μ L de peróxido al 0.3%.
6. Cromógeno adicional Diaminobencidina: A 1 mL de agua destilada se le agregó 20 μ L de buffer, 40 μ L de DAB más 20 μ L de peróxido al 30%.

Técnica de Doble Tinción: (Equipo de doble tinción, Doblestain System. Dako Corporation C.A USA):

1. El recuperador se preparó en cada ocasión que fue utilizado, tomándose 10ml del recuperador concentrado 10x y se afora a 100ml.
2. Buffer salino: Se tomaron 50ml del concentrado y se aforó a 500ml, este servirá para enjuagar en cada ocasión las laminillas después de cada tratamiento.
3. Rojo Rápido: Se utilizó $\frac{1}{4}$ de pastilla en 750 μ L.

XIII BIBLIOGRAFIA

- 1) Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud México. Reg. Histopatológico de Neoplasia, Compendio Mortalidad y Movilidad 1998.
- 2) Page CP, Curtis MJ, Sutter MC, Walker MJ, Hoffman BB. Farmacología Integrada. Madrid: Harcourt Brace, 1997;501:502.
- 3) Alberts B, Bray D, Lewia J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molecular Biology of the cell. Third edition. Mew York: Garland, 1992: 1345-1387.
- 4) Berrocal A, Noguerón E, Campos C. Principio de carcinogénesis. Oncología clínica. 2a. ed. España: Editorial interamericana, 1998: 11.
- 5) Alonso P, Lozano E, Hernández M. Cáncer cervico uterino Diagnóstico, prevención y control. Editorial panamericana, México 2000, 254pp.
- 6) Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Inmunología Celular y Molecular, 4a edición, editorial Mc graw Hill Interamericana. España, 2002. 577pp.
- 7) Turner ME, Schweighoffe F, Colucci J and Tybulewicz VLJ. Tyrosine kinase Syk: essential function for immunoreceptor signalling. *Immunol Today* 2000; **21**:148-154.
- 8) Latour S, and Veillette. Proximal protein tyrosine in immureceptor signaling. *Curr Opin Immunol.* 2001; **13**:299-306
- 9) Cheng AM, Neguishi I, Anderson SJ, Chan AC, Bolen J, Loh DY, and Pawson T. The Syk and ZAP-70 SH2-containing tyrosine kinases are implicated in pre-T cell receptor signaling. *Proc. Natl acad Sci.* 1997; **94**: 9797-9801.
- 10) Indik ZK, Park JG, Pan XQ, and Schreiber AD. Induction of phagocytosis by a protein tyrosine kinase. *Blood* 1995; **85**:1175-1180.
- 11) Chu DH, Morita CT, Weiss A. The Syk family of protein tyrosine Kinase in T-cell activation and development, *Immunol Rev.* 1998; **165**:167-80.
- 12) Rowley RB, Bolen JB, Fargnoli J. Molecular cloning of rodent p72Syk. Evidence of alternative mRNA splicing. *J Biol Chem.* 1995; **271**:12659-64.
- 13) Latour S, Chow LML, Veillette A. Differential Intrinsic Enzimatic Activity of Syk and Zap-70. *J Biol Chem* 1996; **271**:22782-22790.
- 14) Furlong MT, Mahrenholz AM, Kim KH, Ashendel C, Harrison ML, Geahlen RL. Identification of major sites of autophosphorylation of the murine protein-tyrosine kinase Syk. *Biochim Biophys* 1997; **1355**(2): 177-90.

- 15) Siraganian RP, Zhang J, Suzuki K, Sada K. Protein tyrosine kinase Syk in mast cell signaling., *Mol Immunol* 2001; **18**:1229-1233
- 16) Cheng AM, Rowley B, Pao W, Hayday A, Bolen JB Pawson T. Syk Tyrosine kinase required for mouse viability and B cell development. *Nature*. 1995; **378**: 3003-306.
- 17) Pisegna S, Zingoni A, Pirozzi G, Cinque B, Cifone MG, Morrone S, Piccoli M, Frati L, Palmieri G, and Santoni A. Src-Dependent Syk Activation Controls CD69-Mediated Signaling and Function on Human NK Cell. *J Immunol*. 2002;**169**:68-74.
- 18) Zhang J, Siraganian RP. CD45 is essential for Fc epsilon RI signaling by ZAP-70, but not Syk, in Syk-negative mast cells. *J Immunol*. 1999; **5**:2508-2516.
- 19) Kurosaki T, Pao SA, Sada K, Yamamura H and Cambier JC. Role of the Syk autophosphorylation site and SH2 domains in B cell antigen receptor signaling. *J. Exp. Med*. 1995;**182**:1815,-1823.
- 20) Zhang J, Kimura T, Siraganian RP. Mutations in the activation loop tyrosines of protein tyrosine kinase Syk abrogate intracellular signaling but not kinase activity. *J Immunol*, 1998; **8**:4366-4374.
- 21) Zhang J, Billingsley ML, Kincaid RL, and Siraganian RP. Phosphorylation of Syk Activation Loop Tyrosines Is Essential for Syk Function. *J Biol Chem*. 2000; **275**:35442-35447.
- 22) Wang L, Duke L, Zhang P.S, Arlinghaus R.B, Symmans W.F, Sahin A., Mendez R and Le DJ. Alternative splicing Disrupts a Nuclear Localization Signal in Spleen Tyrosine Kinase That is Required for invasion Suppression in Breast Cancer. *Can Res* 2003; **63**:4724-4730.
- 23) Latour S, Zhang J, Siraganian RP and Veillette A. A unique insert in the linker domain of Syk is necessary for its function in immunoreceptor signaling. *EMBO J* 1998; **17**:2584-2595.
- 24) Kurosaki T. Molecular mechanisms in B cell antigen receptor signaling. *Curr Opin Immunol*. 1997. **9**(3):309-18.

- 25) Jiang A, Craxton A, Kurosaki T, Clark EA. Different protein tyrosine kinase are required for B cell antigen receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase, C-jun NH2 terminal kinase 1 and p38 mitogen-activated protein kinase. *J exp Med.* 1998; **188** (7): 1297-306.
- 26) Kimura T, Sakamoto H, Appella E, Siraganian RP. The negative signaling molecule SH2 domain-containing inositol-polyphosphate 5-phosphatase (SHIP) binds to the tyrosine-phosphorylated beta subunit of the high affinity IgE receptor. *J Immunol.* 1997; **17**: 4426-4434
- 27) Kimura T, Zhang J, Sagawa K, Sakaguchi K, Appella E, Siraganian RP. Syk-independent tyrosine phosphorylation and association of the protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 with the high affinity IgE receptor. *J Immunol.* 1997; **9**:4426-4434.
- 28) Kolanus W, Romeo C and Seed B T. Cell activation by clustered tyrosine kinase. *Cell.* 1993;**74**:171-183.
- 29) Furoki S, Geahlen RL, Asa DJ. Syk dependent phosphorylation of microtubules in activated B-lymphocytes. *J Cell Sci.* 2000; **113** : 2557-65
- 30) Peters JD, furlong MT, Asai DJ, Harrison ML, and Geahlen RL. Syk activated by cross-linking of the B-cell antigen receptor, localizes to the cytosol where it interacts with and phosphorylates α -tubulina on tyrosine. *Biol chem.*1996; **271**: 4755-4762.
- 31) Fernandez JA, Keshvara LM, Peters JD, furlong MT, Harrison ML, and Geahlen RL. Phosphorylation and activation independent association of the tyrosine kinase Syk and the substrates cbl and vav with tubulin in B cell. *J Biol Chem.*1994; **274**: 1402-1406.
- 32) Weiss A, Littman DR. Signal Transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell.*1994; **76** (2):263-74.
- 33) Zhang J, Berenstein EH, Evans RL, Siraganian RP. Transfection of Syk protein tyrosine kinase reconstitutes high affinity IgE receptor-mediated degranulation in a Syk-negative variant of rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells. *J exp. Med.*1996; **184**(1): 71-9.
- 34) Tylor JA, Karas JL, Ram MK, Green O M, Seidel-Dugan C. Activation of the high-affinity immunoglobulin E receptor fc epsilon RI in RBL 2H3 cells is inhibited by Syk SH2 domains. *Mol Cell. Biol.*1995; **15**:4149-53

- 35) Rivera VM, Bruje JS. Clustering of Syk is sufficient to induce Tyrosine phosphorylation and release of allergic mediators from rat basophilic leukemia cell. *Mol. Cell. Biol.* 1995; **15**:1582-90.
- 36) Oliver JM, Burg DL, Wilson BS, Mc Laughlin JL, Geahlen RL. Inhibition of mast cell Fc epsilon R2-mediated signaling *J. Biol. Chem.* 1994; **269** (847): 29697-703.
- 37) Cywin CL, Zhao BP, McNeil DW, Hrapchak M, Prokopowicz AS, Goldberg DR, Morwick TM, Scott AG, Kashem JM, Magolda RL, Soll RM, Player MR, Bobko MA, Rinker J, Desjarlais RL and Winters MP. Discovery and SAR of novel [1,6] naphthyridines as potent inhibitors of spleen Tyrosine kinase (Syk). *Biorganic Medicinal Chemistry Letters*. 2003; **13**: 1415-1418.
- 38) Downward J. Mechanisms and consequence of activation of protein kinase B-Akt. *Curr. Opin. Cell.Biol.* 1998; **10**:262-267
- 39) Craxton A, Jiang A, Kurosaki T, Clark EA. Syk and Bruton's tyrosine kinase are required for B cell antigen receptor-mediated activation of the kinase Akt. *J Biol Chem.* 1999; **274** (43) :30644-50.
- 40) Page C, Huang M, Jin X, Chok, Lilja J, Reynolds RK, Lin J. Elevated phosphorylation of Akt and STAT3 in prostate, breast, and cervical cancer. *Cell Int J Oncol.* 2000; **17**(1): 23-8.
- 41) Yangi S, Inatome R, Takano T, Yamura H. Syk expression and novel function in a wide variety of tissues. *Bio Biophys Res Com*, 2001; **288**:495-498.
- 42) Yanagi S, Inatome R, Ding J, Kitaguchi H, Tybulewicz VL, Yamamura H. Syk expression in endothelial cells and their morphologic defects in embryonic Syk-deficient mice. *Blood.* 2001; **9**:2869-71.
- 43) Tsuchida S, Yanagi S, Inatome R, Ding J, Hermann P, Tsujimura T, Matsui N, Yamamura H. Purification of a 72 kDa protein-tyrosine kinase from rat liver and its Identification as Syk: Involvement of Syk in signaling events of hepatocytes. *J. Biochem.* 2000; **127**:321-27.
- 44) Coopman PJP, T H Do M, Bowden ET, Hayes AJ, Baskuy E, Blancato JK, Vezza PR, McLeskey SW, Mangeat PH, Mueller SC. The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells. *Nature* 2000; **406**:742-747.

- 45) Fluck M, Zurcher G, Andres AC, Ziemiecki A. Molecular characterization of the murine Syk protein tyrosine kinase DNA transcripts. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; **213** (1): 273-81.
- 46) Ganapati H, Mahabeleshwar and Gopal C, Kundu. Syk a protein-Tyrosine kinase, suppresses the cell motility and Nuclear Factor κ B-mediated secretion of urokinase type plasminogen Activator by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase activity in breast cancer cell. *J Biol Chem.* 2002; **278**: 6209-6221.
- 47) Tomaya T, Iwase H, Yamashita H, Hara Y, Omoto Y, Sugiera H, Zhang Z y Fuji. Reduced expression of the Syk gene is correlated with poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Lett.* 2003; **184** (1):97-102.
- 48) Yuan Y, Mendez R, Sahin A, Dai JL. Hypermethylation leads to silencing of the Syk gene in human breast cancer. *Cancer Res.* 2001; **61** (14): 5558-61
- 49) Dilon Vs , Young AR , Husain SA and Aslam M. Promoter hypermethylation of MGMT, CDHI, RAR-BETA and Syk tumour suppressor genes in granulosa cell tumour (GCTs) of ovarian origin. *British Journal of cancer.* 2004; **90**: 874-881.
- 50) Fagnoli J, Burkhardt AL, Lavery M, Kurt SA, Van Oers NSC, Weiss A and Bolen JB. Syk Mutation in Jurkat E6-1 derived clones Results in lack of P72 Syk expression. *J. Biol. Chem.* 1995; **270**: 26533-26537.