



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

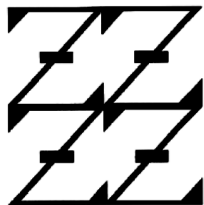
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS
P107, PRB Y P130 DE LA FAMILIA DE GENES RB (RBL1,
RB1, RBL2) EN EXTRACTOS DE CULTIVOS
DE RETINOBLASTOMAS PRIMARIOS”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :
HUMBERTO RENÉ VALENCIA CRUZ

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO HUMANO
EJE
DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTORA DE TESIS
DRA. MARTHA VERÓNICA PONCE CASTAÑEDA

ASESOR INTERNO
M. EN C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

MÉXICO, D.F.

MAYO 2011



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.



El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría CMN SXXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Bajo la dirección de la Dra. En Ciencias Biomédicas Martha Verónica Ponce Castañeda y la asesoría interna del M. en C. Luis Sánchez Sánchez.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este logro especialmente a mis padres

Por ser ustedes el pilar en el cual me apoyo,
por estar cerca de mi compartiendo las
experiencias más importantes de mi carrera.

Porque gracias a su apoyo, he realizado una
de mis mejores metas. Ustedes, que sin
esperar nada, lo dieron todo. Porque nunca
estuve solo. Porque siempre conté con su
confianza. Por todo esto, solo quiero que sientan
que el objetivo logrado, también es suyo y que
la fuerza que me ayudo a conseguirlo, fue su
amor.

Para ti padre, aunque ya no estés conmigo
siéntete orgulloso, y
sólo hoy quiero decirte,
que yo te respeto y admiro,
y que para mí en la vida fuiste,
más que un padre... un amigo.

Con cariño y admiración.

HUMBERTO RENÉ

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a la Dra. M. Verónica Ponce Castañeda que confió en mí y me integró en su grupo de trabajo. Además agradezco todo el esfuerzo que realizó en enseñarme durante los duros momentos al principio del proyecto y por supuesto, por estar siempre ahí cuando la he necesitado.

A la M. en C. Adriana Hernández por su enseñanza en las técnicas y por la paciencia que tuvo conmigo en todo este tiempo.

A mis compañeros de trabajo: a Josefina por ser tan buena amiga y tener siempre una buena tema de conversación; a Jeanette, que me ayudó con todo lo que necesitaba; a Marco, Alejandro, Ximena, Blanca por hacerme más agradable la estancia en el laboratorio

Gaby, Paulina por hacer más divertido este laboratorio, también porque son lo mejor de lo mejor, además de que han sido y son muy especiales para mí.

Al resto de la gente del grupo, que están o que han estado y que me han ayudado en todo lo que he necesitado.

A mi familia en especial a mis padres los que siempre se preocuparon por intentar comprender algo de lo que hacía y nunca perdieron el interés en escucharme, por enseñarme a vivir la vida y que hicieron tanto por mi educación; a mi mami en especial por ser un ejemplo de vida, a la que admiro en todo lo que hace.
¡¡Gracias por luchar por mí en todo momento!!.

A mis hermanas, que siempre me han apoyado y dado muchos consejos, espero sigamos así de unidos.

A mi cuñado Roberto por su apoyo en todo momento y a mi sobrino ahijado Alexander por hacerme pasar muchos ratos agradables.

A mis compañeros de la facultad por todo lo que pasamos en la carrera, por su apoyo y comprensión; en especial a Veverly, por todo su apoyo, por ser una gran persona, por esos momentos que compartías conmigo en especial por los momentos difíciles por los que atravesé, por ser una gran amiga, ayudarme, por ser como eres, nunca cambies niña, gracias por todo, Te quiero mucho niña, nunca lo olvides.

A todos,

¡¡¡Gracias!!!

ÍNDICE

Resumen	vii
Índice de tablas	viii
Índice de figuras	ix
1. Introducción	1
1.1. Cáncer	1
1.2. Epidemiología	2
1.3. Retinoblastoma	4
1.4. Manifestaciones clínicas	6
1.5. Diagnóstico y tratamiento	6
1.6. Hipótesis de Knudson	7
1.7. Virus del papiloma humano (VPH) y Retinoblastoma	8
1.8. Proteína RB (pRb)	9
1.9. Familia de retinoblastoma	11
2. Planteamiento del problema	16
3. Justificación	17
4. Hipótesis	18
5. Objetivos	19
5.1. General	19
5.2. Particular	19
6. Material y Métodos	20
6.1. Extracción de proteínas	22
6.2. Extracto nuclear	23
6.3. Cuantificación de proteínas	23
6.4. Electroforesis	24
6.5. Tinción de geles	24
6.6. Western blot	25
7. Resultados	27
7.1. Estandarización de la técnica de western blot para las proteínas pRb, p107 y p130.	27
7.2. Concentraciones de las Muestras	31

7.3. Electroforesis y tinción con azul de Coomassie	33
7.4. Identificación de la proteína pRb por western blot	33
7.5. Identificación de la proteína p107 por western blot	36
7.6. Identificación de la proteína p130 por western blot	38
8. Discusión de resultados	41
9. Conclusiones	43
10. Referencias Bibliográficas	45
11. Glosario	50
12. Anexos	51
Anexo I	51
Anexo II	52
Anexo III	53
Anexo IV	54

RESUMEN

El retinoblastoma (Rb) es un tumor intraocular maligno que se origina en la retina y aparece generalmente durante la infancia temprana, puede ser unilateral o bilateral y se presenta con una frecuencia del 70 y 30% respectivamente. El curso clínico sin tratamiento es invariablemente fatal y la extirpación quirúrgica del ojo afectado es el más común de los tratamientos. La forma bilateral de esta enfermedad constituye un modelo de estudio de predisposición genética a padecer cáncer, ya que los pacientes afectados por la forma bilateral tienen un riesgo aumentado de desarrollar otros tumores malignos. Además si llegan a la vida adulta y procrean, en cada embarazo existe un riesgo de casi el 50% de heredar la enfermedad. En su origen también ha sido implicado el virus del papiloma humano, ya que se ha encontrado DNA de este virus en los tejidos tumorales. La aparición del retinoblastoma está asociada a la ausencia genética o funcional del gen de susceptibilidad al retinoblastoma que se ubica en el brazo largo del cromosoma 13. El producto del gen es la proteína pRb de 110 kD, la cual tiene un papel esencial en el control del ciclo celular. Posteriormente a la identificación del pRb, se encontraron dos proteínas funcional y estructuralmente relacionadas con pRb, las proteínas p107 y p130, formando así la familia del gen de susceptibilidad al retinoblastoma. No se sabe si la inactivación de los otros miembros de esta familia también está involucrada en el desarrollo de este tumor. El presente estudio tiene como objetivo determinar la presencia o ausencia de las proteínas p107, pRb y p130 en retinoblastomas primarios mediante la técnica de Western blot. Las proteínas analizadas provienen de los tejidos tumorales de 23 niños afectados con retinoblastoma diagnosticados y atendidos en el Hospital de Pediatría del CMN-SXXI (IMSS) y en el Hospital Infantil de México (HIM) Federico Gómez.

Las proteínas p130 y p107 se encuentran expresadas en todas las muestras analizadas, y la proteína pRb se encontró expresada solamente en 5 de las muestras analizadas. Es interesante señalar que en 4 de las 5 muestras en las cuales se detectó pRb, se identificó también DNA del Virus de Papiloma Humano.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Localización de los genes de la familia del retinoblastoma.	11
Tabla 2	Datos de pacientes.	21
Tabla 3	Líneas celulares empleadas como controles positivos para los experimentos de Western blot.	22
Tabla 4	Anticuerpos primarios y secundarios empleados para la detección de las proteínas pRb, p107 y p130.	26
Tabla 5	Concentraciones de las muestras analizadas.	32
Tabla 6	Resumen de los resultados obtenidos para la proteína pRb (p110).	35
Tabla 7	Resumen de los resultados obtenidos para la proteína p107.	37
Tabla 8	Resumen de los resultados obtenidos para la proteína p130.	39
Tabla 9	Resumen de las 24 muestras con los parámetros analizados.	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Corte sagital que muestra las estructuras más importantes del ojo humano.	5
Figura 2	El genoma del VPH.	9
Figura 3	Función de pRb en el ciclo celular.	11
Figura 4	Localización de los genes RB1, RBL1 y RBL2 en los cromosomas.	12
Figura 5	Homología entre las proteínas de la familia a del retinoblastoma.	12
Figura 6	Alineación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas p107, pRb y p130 mostrando los dominios conservados entre las proteínas.	13
Figura 7	Gel teñido con azul de Coomassie.	25
Figura 8	Autoradiografía que muestra la identificación de la proteína p110 (pRb) en extractos de controles positivos.	27
Figura 9	Autoradiografía que muestra la identificación de la proteína p107 en extractos de controles positivos.	28
Figura 10	Autoradiografía que muestra la identificación de la proteína p130 en extractos de controles positivos.	29
Figura 11	Cuantificación de proteínas de retinoblastomas. Hoja de resultados representativa arrojada por el Multiskan a partir del ensayo en microplacas.	31
Figura 12	Gel con proteínas de retinoblastomas teñido con azul de Coomassie.	33
Figura 13	Western blot de la proteína pRb en retinoblastomas	34
Figura 14	Dos señales presentes para el F22 y F19 aunque no en el peso esperado.	34
Figura 15	Western blot de la proteína p107 en retinoblastomas.	36
Figura 16	Western blot de la proteína p107 en retinoblastomas.	37
Figura 17	Western blot de la proteína p130 en retinoblastomas.	38
y 18		
Figura 19	Posible asociación con la expresión de la proteína pRb.	42

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer

El cáncer es el crecimiento anormal e incontrolado de células causado por alteraciones genéticas, por lo cual las células pierden el control de su propio desarrollo; pueden invadir y destruir los tejidos sanos. Las células pueden desprenderse del grupo primario de células tumorales y trasladarse a otras partes del cuerpo. Ahí pueden continuar su crecimiento y a este proceso de propagación se le llama **metástasis** [1].

Una célula anormal aislada que no prolifera, no produce ningún daño significativo, pero si su proliferación está fuera de control producirá un tumor o neoplasia que es una masa de células anormales que crece inexorablemente. Si las células neoplásicas permanecen agrupadas en una masa única, se dice que el tumor es **benigno** y generalmente puede conseguirse una curación completa extrayendo la masa quirúrgicamente. Un tumor se considera canceroso solo si es **maligno**, es decir, si sus células tienen la capacidad de invadir el tejido circundante. La capacidad invasora implica, generalmente, la habilidad de dañar tejidos normales, liberarse, entrar en el torrente sanguíneo o linfático y formar tumores secundarios o **metástasis** en otros lugares del cuerpo [1].

Los tumores malignos se clasifican de acuerdo con el tejido y con el tipo celular a partir del cual se originan. Los tumores procedentes de células epiteliales se denominan **carcinomas**; los que proceden de tejido conjuntivo o de células musculares se denominan **sarcomas**. Entre los tumores que no encajan en ninguna de estas dos amplias categorías se encuentran las diversas formas de **leucemia**, derivadas de células hematopoyéticas y los tumores derivados de células del sistema nervioso [1].

Paralelamente a esta clasificación de los tumores malignos, existe una serie de nombres relacionados para tumores benignos: un **adenoma**, por ejemplo, es un tumor epitelial benigno con una organización glandular, siendo el tipo de tumor maligno correspondiente un **adenocarcinoma**; otro ejemplo lo constituye un **condroma** y un **condrosarcoma**, que son respectivamente, tumores de cartílago benigno y maligno [1].

Las células cancerosas pueden ser extirpadas quirúrgicamente o eliminadas con agentes tóxicos o con radiación, pero es difícil erradicarlas todas y cada una de ellas. Los tratamientos que matan a las células cancerosas generalmente también son tóxicos para las células normales. Además, si quedan unas cuantas células malignas, éstas pueden proliferar y producir un resurgimiento de la enfermedad; a diferencia de las células normales, las células malignas pueden desarrollar resistencia a los medicamentos utilizados en su contra [1].

1.2. Epidemiología

El estudio de las neoplasias en niños comprende los casos de cáncer que se presentan en el grupo de menores de 15 años, estas representan entre 1 y 5% del total de las neoplasias en la población con cáncer [2].

Las neoplasias malignas en los adultos son diferentes de las de los niños. Entre los adultos predominan las neoplasias de tipo epitelial es decir los carcinomas y alcanzan una frecuencia de 80%. En contraste en los menores de 15 años, predominan los de tipo no epitelial alcanzando una frecuencia del 92% y solo con un 8% los tumores de tipo epitelial y entre los 15 y 19 años ocurre una transición. Debido a estas diferencias y para facilitar el registro y la comunicación entre especialidades médicas, en 1987 se estableció una clasificación para las diferentes neoplasias en los niños. esta clasificación se basa en el aspecto histológico y no en la

región topográfica donde se desarrolla la neoplasia, que es el criterio utilizado para clasificar las neoplasias de los adultos [2].

Las neoplasias en niños se dividen en 12 grandes grupos:

- I. Leucemias
- II. Linfomas y otras neoplasias retículo endoteliales
- III. Tumores del sistema nervioso central
- IV. Tumores del sistema nervioso simpático
- V. Retinoblastoma
- VI. Tumores renales
- VII. Tumores hepáticos
- VIII. Tumores óseos
- IX. Tumores de los tejidos blandos
- X. Tumores de células germinales, trofoblásticas y otras células gonadales
- XI. Carcinomas y otras neoplasias epiteliales malignas
- XII. Otras neoplasias malignas inespecíficas

Las neoplasias pediátricas también difieren según la edad en la que tienden a presentarse. En los menores de un año predominan los tumores embrionarios como el meduloblastoma, retinoblastoma, neuroblastoma, rabdomiosarcoma, tumor de Wilms y hepatoblastoma, principalmente. En el grupo de 1 a 4 años predominan las leucemias, sobre todo la linfoblástica aguda; también son frecuentes los tumores renales, los tumores del sistema nervioso central y algunos linfomas. En el grupo de 5 a 9 años, nuevamente predominan las leucemias, aumentan los linfomas (entre los cuales predomina la enfermedad de Hodgkin) y se inicia la presentación de los tumores óseos. En el grupo de 10 a 14 años continúa el predominio de las leucemias, pero aumenta la frecuencia de los linfomas y los tumores óseos [2].

1.3. Retinoblastoma

El trabajo de esta tesis se centra en el estudio del Retinoblastoma. Este es un tumor intraocular maligno que se produce durante la infancia temprana y se origina en la retina. Para comprender donde se origina este tumor a continuación se describe de manera general la estructura del ojo[3]. El globo ocular se compone de tres membranas:

- 1- Esclerótica - la capa protectora externa del ojo (de color blanco).
- 2- Coroides - la membrana media que contiene los vasos sanguíneos para irrigar el ojo.
- 3- Retina - la membrana interna compuesta de diversas estirpes celulares del sistema nervioso especializadas en convertir los estímulos luminosos en impulsos nerviosos responsables de la experiencia visual en el cerebro.

Además se distinguen las siguientes estructuras. La córnea es la lámina clara en la parte anterior del ojo que permite el paso de la luz. La conjuntiva es un tejido delgado que reviste los párpados y el globo del ojo hasta el borde de la córnea. El iris es la parte del ojo que le da su color distintivo, está compuesta por un tejido esponjoso y es una extensión de la coroides. La pupila es la abertura en el iris que permite y regula la entrada de luz al ojo [4]. El ojo está lleno de un fluido complejo sin células llamado vítreo que contribuyen a mantener la presión dentro del ojo. El aparato o glándulas lagrimales son las encargadas de la producción de las lágrimas las cuales son un líquido producido por el proceso corporal de la lagrimación para limpiar y lubricar el ojo. Intervienen fundamentalmente en la óptica ocular y en el normal funcionamiento del globo ocular y de sus estructuras [5]. Figura 1.

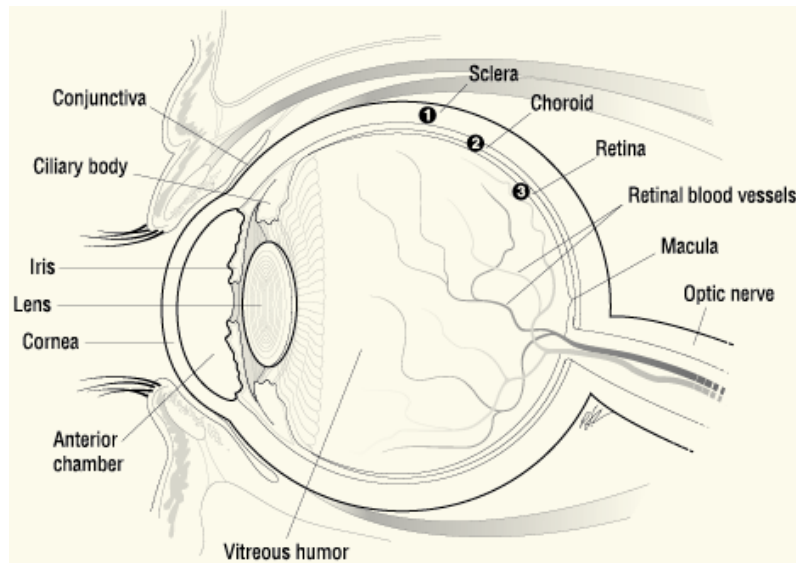


Figura 1: corte sagital que muestra las estructuras más importantes del ojo humano.
[<http://www.retinoblastoma.com/retinoblastoma/frameset1.htm>]

El **retinoblastoma** es unilateral en el 70% de los casos o bilateral en un 25-35% de los casos y aparece en los niños y niñas generalmente antes de que cumplan tres años de edad, se trata de una enfermedad rara con una incidencia aproximada en México de 1 en cada 15 000 nacidos vivos[6, 7]. La forma bilateral del retinoblastoma es una enfermedad genética autosómica dominante, esto quiere decir que está involucrado un gen cuyos alelos se ubican en un cromosoma no determinante del sexo. Si estos pacientes alcanzan la vida adulta y procrean, el producto de cada embarazo tiene un riesgo muy elevado (casi del 50%) de sufrir la enfermedad. Además los pacientes afectados por retinoblastoma bilateral tienen un riesgo aumentado de desarrollar otros tumores malignos[8]. Estas características han convertido al retinoblastoma como un modelo de estudio en el cual se ha investigado con éxito la predisposición genética a padecer cáncer.

1.4. Manifestaciones clínicas

La mayoría de los pacientes con retinoblastoma se presentan con un reflejo blanco en la pupila llamado **leucocoria**. Este reflejo blanquecino en la pupila es anormal. Un ojo desviado o estrabismo es el segundo síntoma más común con el que se presenta el retinoblastoma. El ojo del niño puede desviarse hacia afuera o región temporal, denominándose exotropia o desviándose hacia el interior o región nasal, denominándose endotropia. Otros síntomas con que el retinoblastoma se puede presentar son: un ojo rojo, doloroso, disminución de la visión, inflamación del tejido que rodea el ojo, pupila engrandecida o dilatada, o cambio en el color del iris del ojo signo llamado heterocromía [9]. Por estas razones, cuando un niño presenta leucocoria o estrabismo es importante que sea revisado por un oftalmólogo quien generalmente tiene la experiencia en el diagnóstico y tratamiento del retinoblastoma. Cuando existen antecedentes familiares de retinoblastoma, los bebés recién nacidos deben ser examinados por un oftalmólogo experimentado. Cuando no existen antecedentes familiares, son frecuentemente los padres quienes advierten la persistencia de los síntomas más frecuentes: la leucocoria o estrabismo. El retinoblastoma se debe distinguir de otras enfermedades como el estrabismo, la enfermedad de Coats y la toxocariasis principalmente [10].

1.5. Diagnóstico y tratamiento

El **tratamiento** de retinoblastoma es individualizado para cada paciente. Depende de la edad del niño, del compromiso de uno u ambos ojos, y si el cáncer se ha extendido o no a otras partes del cuerpo. La **enucleación** es el más común de los tratamientos de la enfermedad. Durante la enucleación se extirpa el ojo quirúrgicamente. Esto es necesario porque es la única oportunidad de quitar completamente el tumor si este no se ha extendido fuera del ojo. Cuando ambos ojos están implicados, algunas veces se extirpa el que está más comprometido, mientras

que el otro ojo es tratado con tratamientos que intentan preservar la visión tales como radioterapia con rayos externos, crioterapia, tratamiento con láser y quimiorreducción. Lamentablemente, algunas veces el retinoblastoma se ha extendido más allá del ojo, requiriendo quimioterapia para su control. El retinoblastoma es un tumor muy agresivo y una vez que se ha diseminado afuera del ojo, la sobrevivencia de los pacientes es muy baja [3].

1.6. Hipótesis de Knudson

La naturaleza claramente genética del retinoblastoma bilateral, condujo al estudio citogenético de los cromosomas de las células de estos tumores, demostrándose la existencia de pérdidas parciales del cromosoma 13, [11, 12] en el año 1978 [13]. El estudio epidemiológico de este tumor condujo a Alfred Knudson en 1971 a postular la hipótesis que hoy en día lleva su nombre y que también se conoce como la hipótesis de los dos eventos mutacionales (“two hits” en inglés). Esta hipótesis postuló que el retinoblastoma es un tumor causado por mutaciones, tanto en el alelo materno como el paterno de un mismo gene. Para la forma bilateral esta hipótesis propone que una de las mutaciones se hereda a través de las células germinales por lo que el individuo tiene en todas las células de su organismo este alelo mutado, lo que predispone a estos niños a desarrollar otros tumores malignos además del retinoblastoma. La hipótesis de Knudson propone que la segunda mutación se produce en células somáticas de la retina y cuando este evento ocurre se origina el retinoblastoma. En la forma unilateral no hereditaria, Knudson propuso que ambas mutaciones se producen en una célula somática de la retina. El retinoblastoma entonces, se origina cuando en alguna célula de la retina, ambos alelos de este gen sufren mutaciones que inactivan la función de la proteína que este gene codifica [14].

Aunque la mayoría de los casos de retinoblastoma, se han encontrado mutaciones en el gen RB1, se ha reportado que entre el 17% y 80% de los casos unilaterales no familiares de retinoblastoma tienen un gen RB1 intacto, lo que sugiere la existencia de un mecanismo alternativo para la inactivación de pRb [15].

1.7. Virus del papiloma humano (VPH) y Retinoblastoma

Los factores de riesgo para el desarrollo de la forma unilateral no familiar del retinoblastoma son poco conocidos. Se ha observado sin embargo que el uso de métodos anticonceptivos de barrera (condones) se asocia con un riesgo menor de tener un hijo afectado por retinoblastoma y se ha observado también una considerable superposición de factores de riesgo para la infección del Virus del Papiloma Humano (VPH) [16-18]. En otro estudio epidemiológico de casos y controles se ha detectado usando la reacción de Polimerasa en Cadena (PCR por sus siglas en inglés) secuencias de ADN del VPH en 14 de 39 (36%) retinoblastomas estudiados y grupos de diversos países han reportado hallazgos semejantes[19-22]. El mecanismo alternativo de desarrollo del retinoblastoma dependería de la oncoproteína E7 del VPH ya que se une a pRb y podría estar inactivándola en los casos en que el gen no tiene mutaciones [15].

Se han identificado diferentes tipos de virus del papiloma humano (VPH o VPH del inglés human papillomavirus) en diferentes especies. Estos virus están ampliamente distribuidos en la naturaleza; infectan específicamente el epitelio escamoso de más de 20 especies diferentes de mamíferos, así como aves y reptiles. En los humanos se clasifican como virus de bajo y alto riesgo. Los de bajo riesgo causan lesiones como verrugas, mientras los de alto riesgo causan enfermedades severas como cáncer cervical, anogenitales y de cuello y cabeza [23].

El genoma del VPH consiste de una molécula de ADN circular de doble cadena, aproximadamente de 8000 pares de bases. Se divide en tres regiones: la región larga de control, LCR, que no contiene marcos de lectura; la región E temprana (del inglés Early) que corresponde a las proteínas E1 a E8 y la región L tardía (del inglés Late) que corresponde a las proteínas L1 y L2 (figura 2). [23] La detección más común de este virus se realiza mediante la reacción de polimerasa en cadena (PCR) amplificando un amplicón de aproximadamente 450 pb del gene L1 que codifica para una de las proteínas de la cápside de este virus.

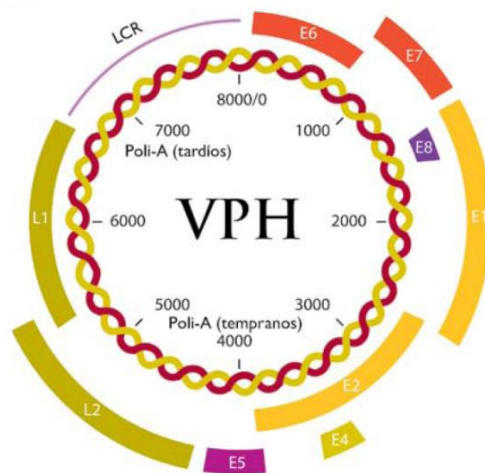


Figura 2: El genoma del VPH. [López -Saavedra y Lizano-Soberón, *Cancerología 1* (2006): 31-55]

1.8. Proteína RB (pRb)

El gen de susceptibilidad al retinoblastoma fue el primer gen supresor de tumores identificado hace ya más de dos décadas. Su ausencia está asociada a la aparición del tumor. Este gen fue identificado mediante clonación posicional a partir de las pérdidas ocurridas en el brazo largo del cromosoma 13 observadas en células de retinoblastomas hereditarios [24]. La identificación y la clonación de dicho gen abrieron una nueva era en el estudio genético del cáncer ya que a partir del conocimiento generado sobre este tumor y gen, surgió el concepto de los genes

supresores de tumores. Una vez clonada la región cromosómica del gen, hubo un ímpetu importante por estudiar la biología de esta proteína. **pRb** es una fosfoproteína de 928 aminoácidos con una movilidad relativa en geles de poliacrilamida de 110 kD y tiene un papel esencial en el control del ciclo celular [25, 26]. El estado de fosforilación es fundamental para la función de esta proteína. pRb tiene hasta 16 sitios de fosforilación que son fosforilados y defosforilados durante el ciclo celular. La forma hipofosforilada de pRb es la forma presente en células quiescentes es decir en las células que no se encuentran proliferando así como en células que sufren un proceso de diferenciación. En contraste, la forma hiperfosforilada, se considera la forma inactiva y predomina en células proliferativas. Durante la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular pRb se fosforila y, por tanto se inactiva, permitiendo así la progresión del ciclo celular. Dicha fosforilación se lleva a cabo por una familia de cinasas llamadas CDKs (del inglés Cycling Dependent Kinases). La actividad de las CDKs se regula por las ciclinas, que son otras proteínas cuya expresión varía a lo largo del ciclo celular. Los complejos ciclina D-CDK4/6 y ciclina E-CDK2 se encargan de la fosforilación secuencial de pRb necesaria para su completa inactivación [27].

La forma hipofosforilada de pRb es capaz de unir los factores de transcripción, conocidos como E2F, cuando los complejos pRb/E2F se forman, se unen a las regiones promotoras de genes involucrados en el ciclo celular inhibiendo la transcripción de genes implicados en la síntesis de ADN y a través de esta inhibición las células permanecen quiescentes. En contraste la fosforilación de pRb induce su separación de los factores E2F, permitiendo la expresión de numerosos genes implicados en replicación del ADN y así las células proliferan. Resumiendo, la función fundamental de pRb es la de controlar la transición entre las fases G1/S del ciclo celular (figura 3)[28].

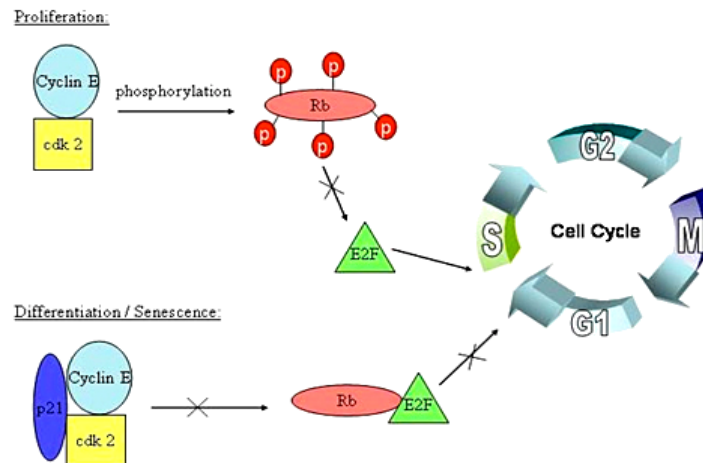


Figura 3. Función de pRb en el ciclo celular. [<http://www.conganat.org/>]

1.9. Familia de genes del retinoblastoma y sus funciones moleculares

Posteriormente a la identificación de pRb, se encontraron dos proteínas funcional y estructuralmente relacionadas con pRb, las proteínas p107 y p130, formando así la familia del gen de susceptibilidad al retinoblastoma. A pesar de que estos genes se encuentran en cromosomas diferentes (tabla 1, Figura. 4), los tres miembros comparten la presencia de tres dominios proteicos altamente conservados (Figura. 5-6) [29, 30].

Tabla 1: localización de los genes de la familia del retinoblastoma.

Cromosoma	Gen	Proteína
13	RB1	pRb
20	RBL1	p107
16	RBL2	p130

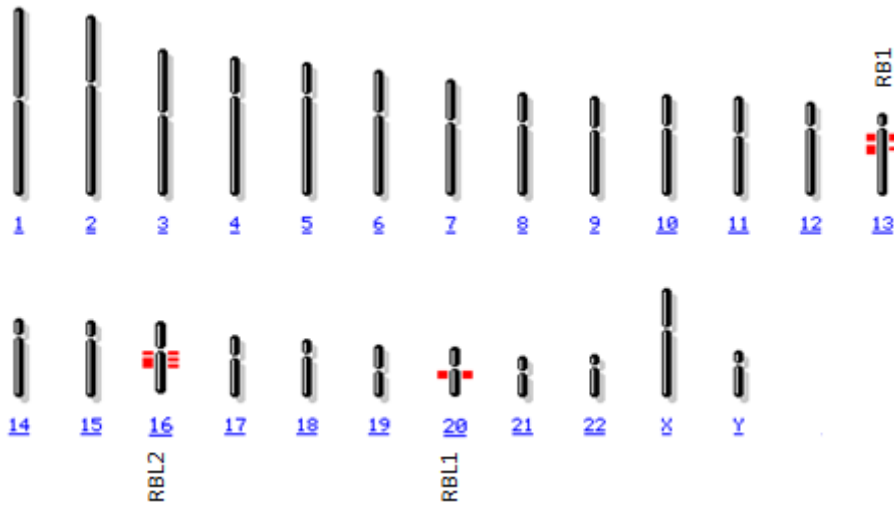


Figura 4. Localización de los genes RB1, RBL1 y RBL2 en los cromosomas.
 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview]

Familia de Proteínas de Retinoblastoma

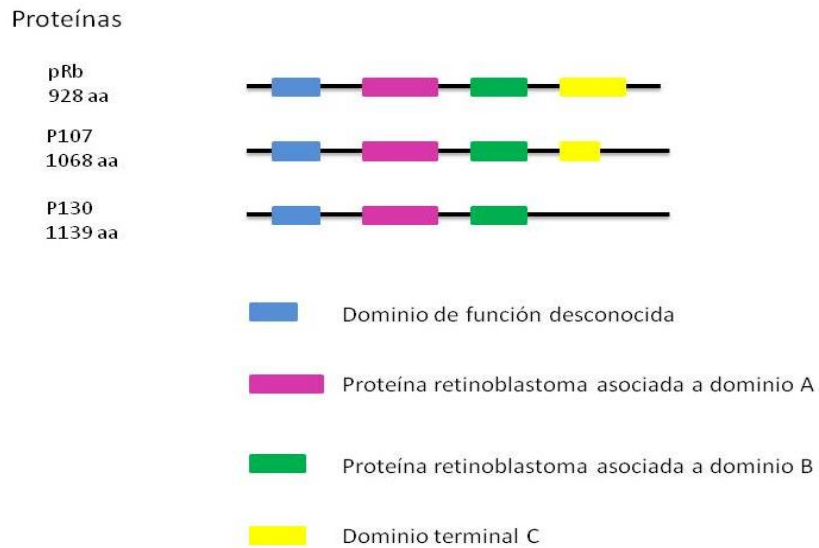


Figura 5. Homología entre las proteínas de la familia a del retinoblastoma.



Dominio de función desconocida
 Dominio B
 Dominio A
 Dominio C terminal

Figura 6: Alineación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas p107, pRb y p130 mostrando los dominios conservados entre las proteínas.

La familia de genes Rb tiene una alta afinidad por los factores de transcripción E2F, p107 y p130 se unen a factores de transcripción E2F inhibiendo su actividad transcripcional y deteniendo la proliferación celular cuando son sobreexpresados, aunque existen claras diferencias entre p107, p130, pRb y los factores E2F [31, 32].

Los miembros de la familia del Retinoblastoma no muestran la misma afinidad de unión por cada uno de los miembros de la familia de E2F. En general, E2F1-4 se unen a pRb, mientras que E2F4 y E2F5 se unen preferencialmente tanto a p107 como a p130. Es probable que estas diferencias se asocien a procesos celulares específicos como diferenciación y/o proliferación. También es posible que exista redundancia en los circuitos de control de estos procesos celulares, aunque esto se desconoce [33, 34].

Los factores E2F no son las únicas proteínas que los miembros de la familia de retinoblastoma pueden unir. De hecho, en los últimos años se han descrito numerosas interacciones con proteínas tales como elementos reguladores de la cromatina, otros factores de transcripción diferentes a E2F o proteínas implicadas en vías como la apoptosis o la diferenciación y cuya funcionalidad real no ha sido dilucidada en la mayoría de los casos [35, 36].

Las primeras investigaciones realizadas para las proteínas p107 y p130, fueron en 1991, donde se obtuvo cADN parcial para RBL1, este codifica para una proteína a la cual llamaron p107, esta proteína mostró homología con una región del gen RB1, que tiene una función esencial para el control del crecimiento[37]. Para 1996, se clonó el gen de ratón RBL1y al compararse con su contraparte humana se encontraron regiones conservadas entre las 2 secuencias[38]. Las características de unión implican que RB1 y p107 comparten una función bioquímica común [37].

En 1993 se clonó un gen humano relacionado con el retinoblastoma, denominado RBL2, los análisis revelaron homología con el gen RB1. Esta homología estructural con RB1 sugiere una posible función de RBL2 como un gen supresor de tumores [39].

Los miembros de la familia Rb pueden compensar funciones entre ellos, por alguna inactivación que uno de los miembros de la familia sufra, en estudios en ratones se ha observado que cuando hay inactivación de pRb, hay sobre expresión de p107 y viceversa, lo que sugiere una sustitución de funciones entre ambos genes [40, 41]. Algunos investigadores mencionan que p107 y p130 se localizan en regiones cromosómicas que frecuentemente se encuentran ausentes en tumores[40, 42, 43]. Estos hechos apuntan la importancia que tiene elucidar el papel que todos los miembros de esta familia tienen en el retinoblastoma humano [44].

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La familia del gene de susceptibilidad al retinoblastoma está compuesta por tres miembros (los genes que codifican para las proteínas pRb, p107 y p130) implicados todos en el control de la proliferación y diferenciación de las células. La inactivación de pRb está involucrada en el origen del retinoblastoma, sin embargo no se sabe si la inactivación de los otros miembros de esta familia también está involucrada en el desarrollo de este tumor y los datos de expresión de los otros dos miembros de esta familia en los retinoblastomas primarios son muy limitados.

3. JUSTIFICACIÓN

El Retinoblastoma es un tumor intraocular maligno cuyo tratamiento aun incluye la extirpación del ojo afectado, este dramático hecho justifica de por sí la necesidad de investigación en este campo. Más concretamente el conocimiento sobre el estado de expresión de las proteínas p107 y p130 ofrecerá información sobre las rutas proliferativas y antiproliferativas afectadas en este tumor. La cual contribuirá a orientar e identificar las rutas blanco que podrían usarse para desarrollar fármacos contra estas células tumorales.

4. HIPÓTESIS

Si identificamos las proteínas pRb, p107 y p130 en retinoblastomas primarios, entonces será posible encontrar un patrón de expresión característico asociado al tipo de tumor mediante la técnica de western blot.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general:

Determinar la presencia o ausencia de las proteínas p107, pRb y p130 en Retinoblastomas primarios previamente cultivados, mediante la técnica de Western blot.

5.2. Objetivos particulares:

- Estandarización de la técnica de western blot para las proteínas p107, pRb y p130 empleando controles positivos.
- Extracción de proteínas totales a partir de retinoblastomas primarios cultivados previamente hasta por una semana.
- Cuantificación de proteínas totales a partir de cultivos primarios de retinoblastoma mediante el método de Lowry.
- Explorar la presencia-ausencia de las proteínas p107, pRb y p130 en los extractos proteicos totales de retinoblastomas cultivados por períodos breves.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias en el Hospital de Pediatría del CMN SXXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social, en la ciudad de México D.F.

Las proteínas analizadas provienen de los tejidos tumorales primarios de 23 niños afectados por Retinoblastoma, cultivados brevemente. Estos niños fueron diagnosticados y atendidos quirúrgicamente como parte de su tratamiento en el Hospital de Pediatría del CMN SXXI (IMSS) y del Hospital Infantil de México (HIM) Federico Gómez entre 2004 y 2010. Este estudio forma parte de un estudio más amplio sobre retinoblastoma que se sigue llevando a cabo en estas instituciones.

De cada uno de los pacientes se obtuvieron los datos resumidos en la tabla 2.

Tabla 2: Datos de pacientes

No. de Muestra	Folio	Lateralidad	Hospital	Edad al Dx	Sexo
1	<u>F 19</u>	<u>1</u>	HIM	9 meses	Masculino
2	<u>F 22</u>	<u>1</u>	IMSS	7 meses	Masculino
3	<u>F 27</u>	<u>2</u>	HIM	9 meses	Femenino
4	<u>F 31</u>	<u>1</u>	HIM	1 año	Masculino
5	<u>F 32</u>	<u>2</u>	HIM	1 año	Femenino
6	<u>F 33</u>	<u>1</u>	HIM	3 años	Femenino
7	<u>F 40</u>	<u>1</u>	HIM	6 años	Femenino
8	<u>F 49</u>	<u>2</u>	HIM	2 años	Masculino
9	<u>F 53</u>	<u>2</u>	HIM	2 años	Femenino
10	<u>F 63</u>	<u>1</u>	HIM	2 años	Femenino
11	<u>F 65</u>	<u>2</u>	IMSS	1 año	Masculino
12	<u>F 73</u>	<u>2</u>	IMSS	1 año	Masculino
13	<u>F 74</u>	<u>2</u>	HIM	9 meses	Femenino
14	<u>F 81</u>	<u>1</u>	IMSS	10 meses	Femenino
15	<u>F 83</u>	<u>1</u>	IMSS	1 año	Femenino
16	<u>F 85</u>	<u>1</u>	IMSS	3 años	Masculino
17	<u>F 86</u>	<u>1</u>	HIM	3 años	Femenino
18	<u>F 92</u>	<u>1</u>	HIM	1 año	Masculino
19	<u>F 106</u>	<u>1</u>	IMSS	7 años	Masculino
20	<u>F 111</u>	<u>1</u>	HIM	3 años	Femenino
21	<u>F 114</u>	<u>1</u>	HIM	11 meses	Masculino
22	<u>F 122</u>	<u>1</u>	HIM	5 años	Masculino
23	<u>F 168</u>	<u>2</u>	HIM	2 años	Masculino
24	<u>Línea celular</u> <u>Y 79</u>	<u>2</u>			

Además se cultivaron 2 líneas celulares con la finalidad de obtener proteínas para utilizarse como controles positivos para los experimentos de Western blot como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3: Líneas celulares empleadas como controles positivos para los experimentos de Western blot.

Líneas celulares	Proteína que expresan	Origen
K562	p Rb y p107	Leucemia
C 32	p 107	Melanoma
C 32 (Extracto Nuclear)	p 130	Melanoma

6.1. Extracción de proteínas

A partir de los tejidos tumorales obtenidos de las piezas quirúrgicas, se realizaron cultivos primarios breves que se cosecharon en una solución caotrópica la cual permite extraer consecutivamente ADN, ARN y proteínas totales. Para obtener controles positivos fue necesario cultivar células que expresan estas proteínas, las líneas celulares utilizadas fueron la K562, esta línea crece en suspensión y fue cultivada en medio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) su origen es de una leucemia y la línea C32 que es una línea celular adherente y fue cultivada en medio MEM (Eagle's Minimum Essential Medium) su origen es un melanoma. Las células se trataron con una solución caotrópica de tiocianato de guanidina, fenol y cloroformo (TRIZOL) [45]. Cuando el agente caotrópico (Trizol) entra en contacto con la muestra y después de una centrifugación, se obtienen 3 fases: una acuosa incolora (ARN), una interfase blanca y una fase orgánica roja (ADN y proteínas), la fracción proteica se precipita agregando 1.5 ml de isopropanol por cada 1ml de Trizol. La pastilla obtenida se lava con hidrocloreuro de guanidina, se centrifuga y se lava con etanol al 100%, el material proteico obtenido se solubiliza en SDS (dodecil sulfato sódico) al 1% [45].

Este procedimiento fue utilizado para extraer proteínas totales de las líneas celulares K562 y C32, las cuales sirvieron como control positivo para las proteínas de interés y asegurar así que las proteínas que sirven como control positivo reciban el mismo tratamiento de extracción que las proteínas provenientes de los tumores cultivados, con la finalidad de asegurar una comparación válida entre las muestras y controles.

6.2. Extracto nuclear

En el caso del control positivo para p130 fue necesario purificar proteínas a partir de la fracción enriquecida de núcleos de la línea celular C32. Para purificar los núcleos, las células cosechadas se suspendieron en buffer de homogenización con inhibidores de proteasas, las células se pasaron de 15 – 20 veces por una aguja de calibre 22G en hielo. Para confirmar la ruptura de las membranas plasmáticas, se toman 10 μ l de la suspensión y 10 μ l de azul tripano y se observa la preparación en el microscopio de luz. El homogenado se centrifuga, hasta que se forma una pastilla en el fondo del tubo, se toma el sobrenadante que constituye la fracción citoplasmática, y a la pastilla formada que constituye la fracción nuclear, se le agrega el Trizol y se extraen las proteínas como anteriormente se ha descrito.

6.3. Cuantificación de proteínas

Las proteínas fueron cuantificadas mediante el método de Lowry el cual es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas, con ayuda de una curva tipo de concentración conocida [46, 47]. Este método se basa en la reacción de oxidación del reactivo de Folin dando un complejo coloreado, su sensibilidad es 1 – 200 μ g de proteínas.

6.4. Electroforesis

Para identificar las proteínas p130, p107 y p110 (pRb) por Western blot es necesario primero separar las proteínas de acuerdo a su peso molecular en geles de poliacrilamida mediante electroforesis. La electroforesis es un método por el cual se separan las biomoléculas, aprovechando la movilidad direccional de estas moléculas cuando están bajo el efecto de un campo eléctrico, en función de su tamaño. En este caso la separación de las proteínas se realiza en condiciones desnaturalizantes usando detergente y un agente reductor. El SDS (dodecil sulfato sódico) es un detergente que desnaturaliza las proteínas y está cargado negativamente, por lo tanto aporta este tipo de carga a las proteínas. Además se añade ditioneitol (DTT) que es un agente reductor, el cual rompe los puentes disulfuro de las estructuras terciarias y cuaternarias de las proteínas. El DTT altera las conformaciones estructurales naturales de las proteínas, con lo que se garantiza que las proteínas se mantengan desnaturalizadas y en conformación monomérica [48].

6.5. Tinción de gel

La electroforesis se lleva a cabo por duplicado y uno de los geles se tiñe con azul de Coomassie. La tinción con azul se emplea para la visualización de proteínas, esta tinción requiere un medio ácido para la generación de la atracción electrostática entre las moléculas del colorante y los grupos amino de las proteínas. La atracción iónica ocurre a través de las fuerzas de Van Der Waals, que une a las proteínas y al colorante formando un complejo de carácter no covalente. Esta unión es totalmente reversible en condiciones apropiadas (Figura. 7) [49].

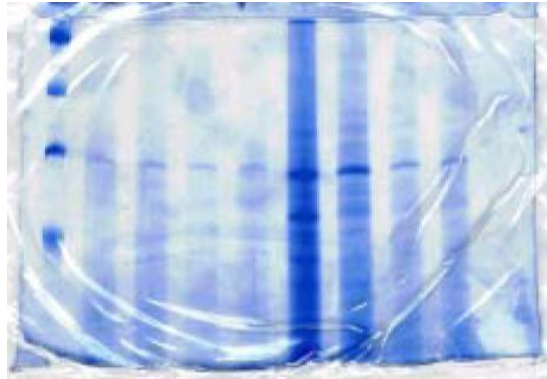


Figura 7: Gel teñido con azul de Coomassie.

6.6. Western blot

Para detectar las proteínas p130, p107 y p110 con anticuerpos específicos, las proteínas separadas electroforéticamente se transfieren a un soporte sólido que en este caso es una membrana de nylon. Para hacer esto, una vez terminada la electroforesis, las proteínas se transfieren desde los geles de poliacrilamida a una membrana de nylon, a través de electrotransferencia. Posteriormente se bloquea la membrana de nylon, para prevenir la unión no específica de los anticuerpos primarios y así lograr disminuir el fondo o “background”. Terminado el paso de bloqueo se realiza la incubación con el anticuerpo específico o primario dirigido hacia la proteína de interés (tabla 4). Esta interacción antígeno-anticuerpo se identifica mediante un sistema de amplificación y quimioluminiscencia, usando un anticuerpo secundario creado contra inmunoglobulinas del organismo en que se creó el anticuerpo primario. Este anticuerpo secundario está acoplado a peroxidasa de rábano que es una enzima que hidroliza un substrato que libera luz. Esta señal luminosa se detecta en películas autoradiográficas, que son hojas de plástico cubiertas con una emulsión fotosensible.

Tabla 4: Anticuerpos primarios y secundarios empleados para la detección de las proteínas pRb, p107 y p130.

Proteína	Anticuerpo primario	Ab. Secundario	Marca
p Rb	anti-Rb sc-50 policlonal conejo	anticonejo HRP ECLNA – 934	Santa Cruz Biotechnology
P 107	anti- p107 sc-318 policlonal conejo	anticonejo HRP ECLNA – 934	Santa Cruz Biotechnology
P 130	anti-p130 sc-317 policlonal conejo	anticonejo HRP ECLNA – 934	Santa Cruz Biotechnology
Actina	anti-Actina sc-1616		Santa Cruz Biotechnology

7. RESULTADOS

7.1. Estandarización de la técnica de western blot para las proteínas pRb, p107 y p130.

Se desarrolló el procedimiento explorando geles con distintas concentraciones y cargando 10 µg de proteínas control en cada carril, también se exploraron varias diluciones de anticuerpos y diversos regímenes de lavado para detectar la proteína pRb. El procedimiento final se incluye como un protocolo en el anexo I y se utilizó posteriormente para la detección en los extractos de retinoblastomas primarios. La evidencia autoradiográfica se ilustra en la Figura 8.

Autoradiografía que muestra la identificación de la proteína p110 (pRb) en extractos de controles positivos

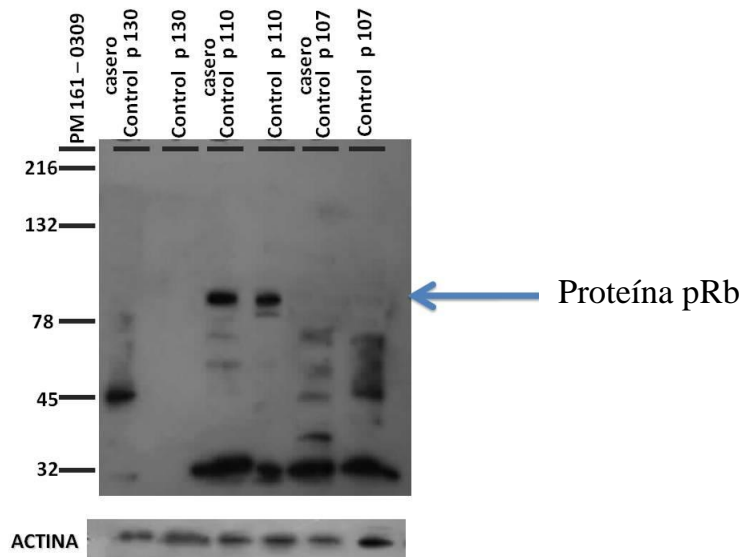


Figura 8: Autoradiografía que contiene la señal quimioluminiscente para p110 (pRb). La señal se obtuvo usando el anticuerpo primario en una dilución de 1:100 tanto en el extracto comercial como en el extracto producido en el laboratorio a partir de la línea celular K562.

En la figura 9 se muestra la Autorradiografía para detectar la proteína p 107. El procedimiento final se incluye como un protocolo en el anexo II.

Autorradiografía que muestra la identificación de la proteína p107 en extractos de controles positivos

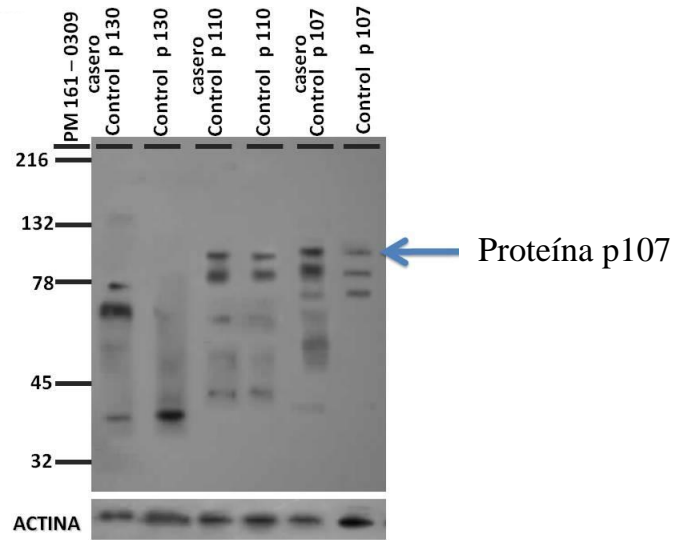


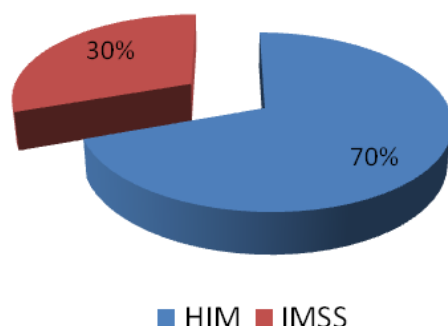
Figura 9: Autorradiografía que contiene la señal quimioluminiscente para p107. La señal se obtuvo usando el anticuerpo primario en una dilución de 1:300 tanto en el extracto comercial como en el extracto producido en el laboratorio a partir de la línea celular C32 y K562.

En la figura 10 se muestra la detección de la proteína p130. El procedimiento final se incluye como un protocolo en el anexo III.

Datos relacionados con el grupo de estudio:

Institución de origen de las muestras analizadas se muestran en la gráfica 2.

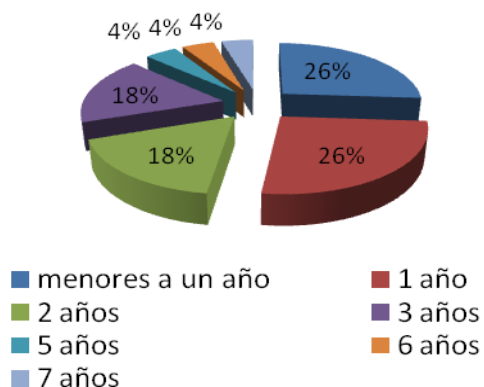
Pacientes por Hospital



Gráfica 2: 7 muestras de pacientes atendidos en el IMSS y 16 muestras de pacientes atendidos en el HIM.

La distribución por edad de los niños incluidos en este análisis se muestra en la gráfica 3.

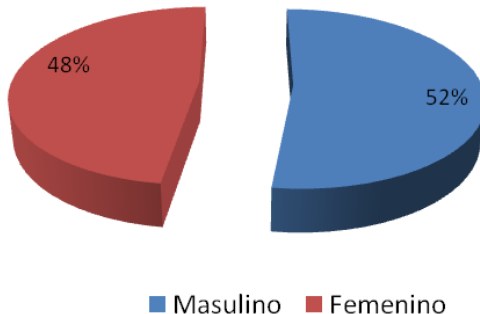
Edad de los pacientes



Gráfica 3: Distribución de la edad de los niños en el grupo de estudio.

El género de los pacientes analizados en el presente estudio se muestra en la gráfica 4.

Género de los pacientes



Gráfica 5: Se analizaron 23 casos de los cuales 12 fueron niños y 11 niñas.

7.2. Concentraciones de las Muestras

Las muestras fueron cuantificadas en un espectrofotómetro Multiskan y las curvas patrón tuvieron un coeficiente de correlación ≥ 0.98 como se indica en la figura 11. Las concentraciones calculadas fueron obtenidas a partir de curvas estándar realizadas (Tabla 5).

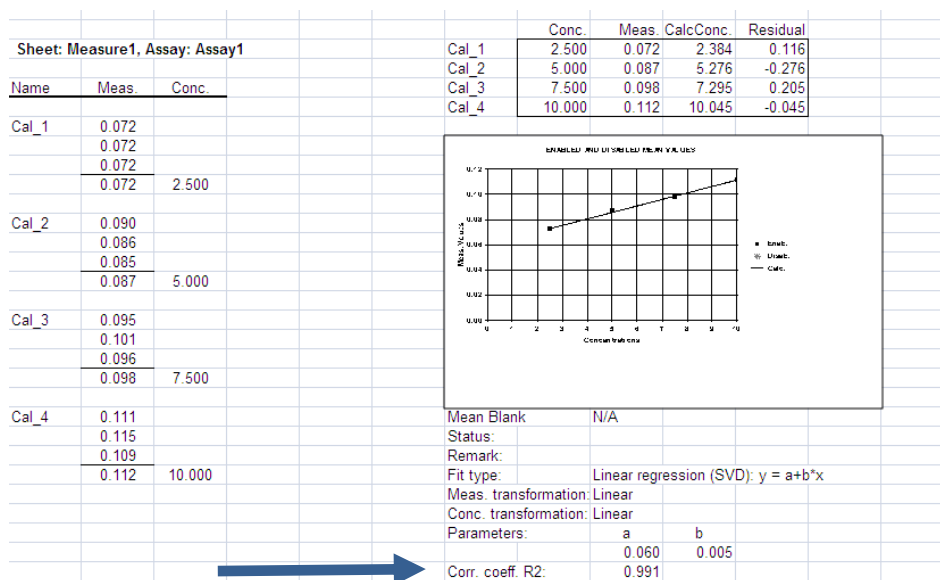


Figura 11: Cuantificación de proteínas de retinoblastomas. Hoja de resultados representativa arrojada por el Multiskan a partir del ensayo en microplacas.

Tabla 5: Concentraciones de las muestras analizadas.

No. de Muestra	Folio	concentración $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Estatus VPH*
1	<u>F 19</u>	1.1	<u>pos</u>
2	<u>F 22</u>	1.3	<u>pos</u>
3	<u>F 27</u>	1.1	<u>pos</u>
4	<u>F 31</u>	1	<u>pos</u>
5	<u>F 32</u>	1.2	<u>pos</u>
6	<u>F 33</u>	2.3	<u>pos</u>
7	<u>F 40</u>	2.2	<u>neg</u>
8	<u>F 49</u>	1.1	<u>pos</u>
9	<u>F 53</u>	1.4	<u>neg</u>
10	<u>F 63</u>	1.2	<u>pos</u>
11	<u>F 65</u>	1	<u>pos</u>
12	<u>F 73</u>	2	<u>pos</u>
13	<u>F 74</u>	3.1	<u>pos</u>
14	<u>F 81</u>	1.5	<u>neg</u>
15	<u>F 83</u>	1.2	<u>pos</u>
16	<u>F 85</u>	2.5	<u>pos</u>
17	<u>F 86</u>	2.5	<u>pos</u>
18	<u>F 92</u>	1.5	<u>pos</u>
19	<u>F 106</u>	1.4	<u>neg</u>
20	<u>F 111</u>	2.1	<u>pos</u>
21	<u>F 114</u>	1.8	<u>pos</u>
22	<u>F 122</u>	2	<u>neg</u>
23	<u>F 168</u>	1.1	<u>neg</u>
24	y79	5.1	<u>neg</u>

* El estatus VPH de las muestras de retinoblastoma analizadas en este trabajo, fue determinado en un estudio previo por la técnica de PCR utilizando un par de iniciadores (oligonucleótidos) que amplifican un segmento de aproximadamente 450 pb correspondiente a una región altamente conservada de gen L1 que codifica para la proteína principal de la cápside del virus de papiloma humano.

7.3. Electroforesis y tinción con azul de Coomassie

Una vez cuantificadas las proteínas se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 8 %, cargando 10 µg de cada una de las muestras. Los geles se tiñeron con azul Coomassie para evaluar la integridad de las proteínas (figura 12).

Gel con proteínas de retinoblastomas teñido con azul de Coomassie

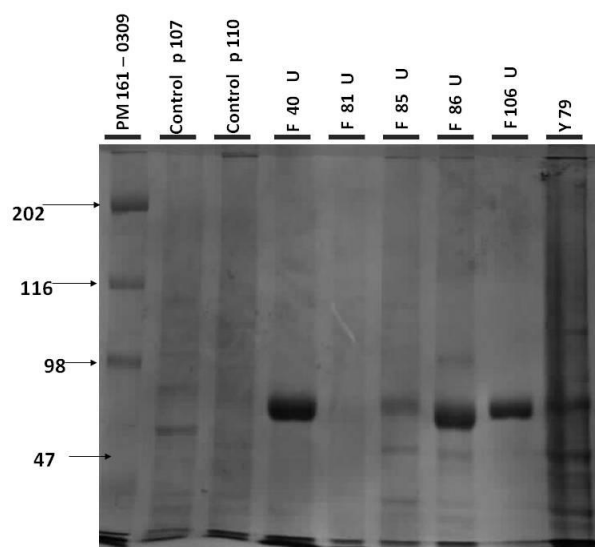


Figura 12: La letra F es un identificador para las muestras y la letra U hace referencia a la lateralidad del tumor, en este gel se trata de casos unilaterales.

7.4. Identificación de la proteína pRb por western blot.

Con el protocolo de detección desarrollado, se procedió a la búsqueda de la proteína pRb, en los extractos de proteína total de los retinoblastomas incubando con el anticuerpo específico. Las figuras 13-14 ilustran resultados representativos.

Western blot de la proteína pRb en retinoblastomas

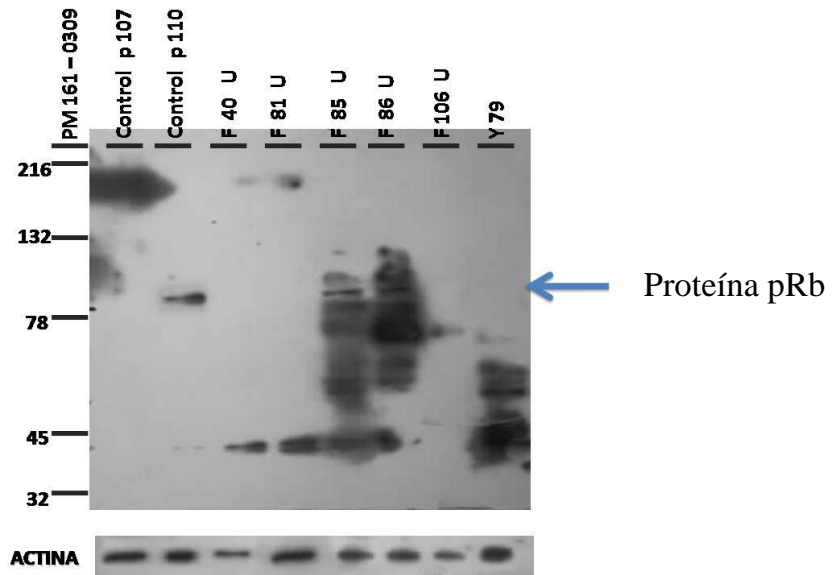


Figura 13: Dos de los cinco retinoblastomas unilaterales en este grupo expresan pRb.

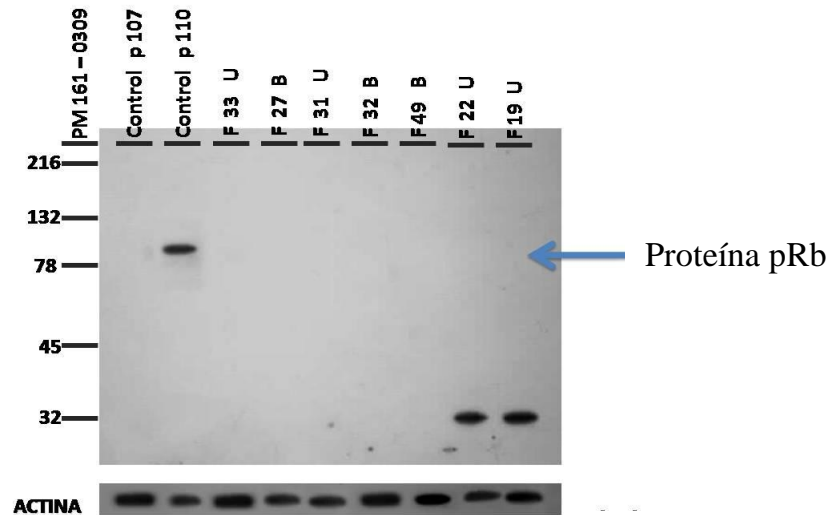


Figura 14: Ninguno de los retinoblastomas en este grupo expresan pRb, sin embargo se observan dos señales para el F22 y F19 aunque no en el peso esperado, lo que indica que si se trata de pRb, se podría tratar de proteínas truncadas.

Los resultados obtenidos de la presencia-ausencia de la proteína p Rb (p110), en las 24 muestras totales analizadas, se resumen en la tabla 6.

Tabla 6: Resumen de los resultados obtenidos para la proteína pRb (p110).

Folio	p 110	Folio	p 110
<u>F 19</u>	√*	<u>F 74</u>	√
<u>F 22</u>	√*	<u>F 81</u>	x
<u>F 27</u>	x	<u>F 83</u>	x
<u>F 31</u>	x	<u>F 85</u>	√
<u>F 32</u>	x	<u>F 86</u>	√
<u>F 33</u>	x	<u>F 92</u>	x
<u>F 40</u>	x	<u>F 106</u>	x
<u>F 49</u>	x	<u>F 111</u>	x
<u>F 53</u>	x	<u>F 114</u>	x
<u>F 63</u>	x	<u>F 122</u>	x
<u>F 65</u>	x	<u>F 168</u>	√
<u>F 73</u>	√	y 79	x

√ : señal presente para la proteína p110

X : señal ausente de la proteína p 110

√*: señal presente, pero no en el peso esperado lo que sugiere que podría tratarse de una proteína truncada.

7.5. Identificación de la proteína p107 por western blot.

Para rehusar las membranas anteriores se denudaron mediante la incubación de las membranas en un amortiguador para denudación, por 40 minutos a 65°C, para despegar los anticuerpos de los experimentos anteriores, y se procedió a la identificación de la proteína p107, con el protocolo desarrollado previamente e incubando con el anticuerpo específico. Como se observa en la Figura 15-16 donde se ilustran los resultados representativos, se encontró la proteína p107 en todas las muestras analizadas.

Western blot de la proteína p107 en retinoblastomas

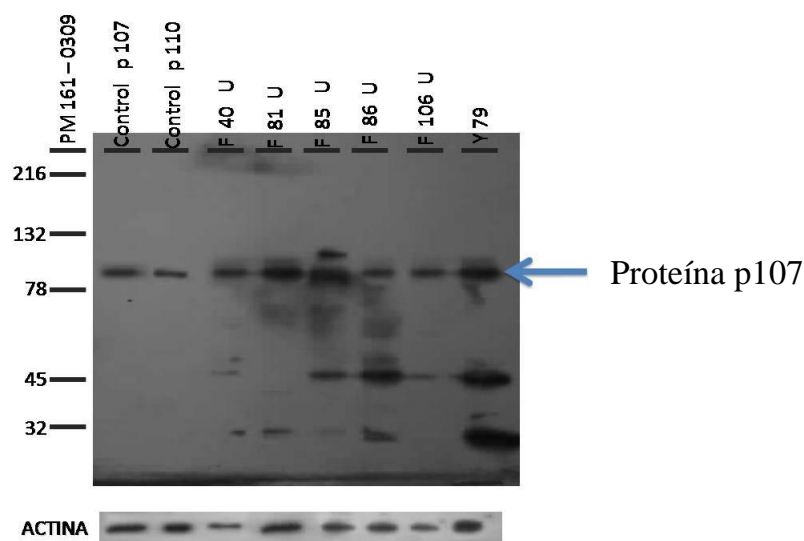


Figura 15: Señal presente para los controles positivos de la proteína p107, al igual que en el grupo de muestras de los retinoblastomas.

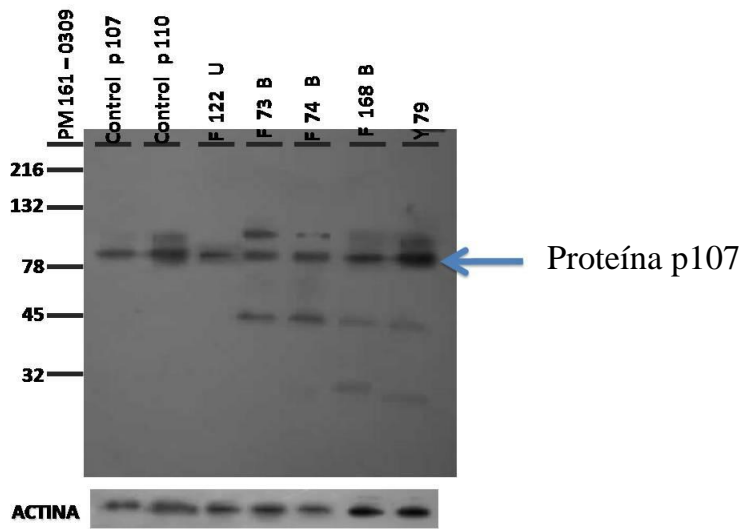


Figura 16: Señal presente para los controles positivos de la proteína p107, al igual que en el grupo de muestras de los retinoblastomas.

Los resultados obtenidos para la presencia de la proteína p 107, en las 24 muestras totales analizadas, se resumen en la tabla 7.

Tabla 7: Resumen de los resultados obtenidos para la proteína p107.

Folio	p 107	Folio	p 107
<u>F 19</u>	√	<u>F 74</u>	√
<u>F 22</u>	√	<u>F 81</u>	√
<u>F 27</u>	√	<u>F 83</u>	√
<u>F 31</u>	√	<u>F 85</u>	√
<u>F 32</u>	√	<u>F 86</u>	√
<u>F 33</u>	√	<u>F 92</u>	√
<u>F 40</u>	√	<u>F 106</u>	√
<u>F 49</u>	√	<u>F 111</u>	√
<u>F 53</u>	√	<u>F 114</u>	√
<u>F 63</u>	√	<u>F 122</u>	√
<u>F 65</u>	√	<u>F 168</u>	√
<u>F 73</u>	√	<u>y 79</u>	√

√ : señal presente para la proteína p107

7.6. Identificación de la proteína p130 por western blot.

Usando un nuevo juego de membranas se procedió a la búsqueda de la proteína p130, con el protocolo desarrollado previamente e incubando con el anticuerpo específico. Como se observa en la Figura 17-18 donde se ilustran los resultados representativos, se encontró la proteína p130 en todas las muestras analizadas.

Western blot de la proteína p130 en retinoblastomas

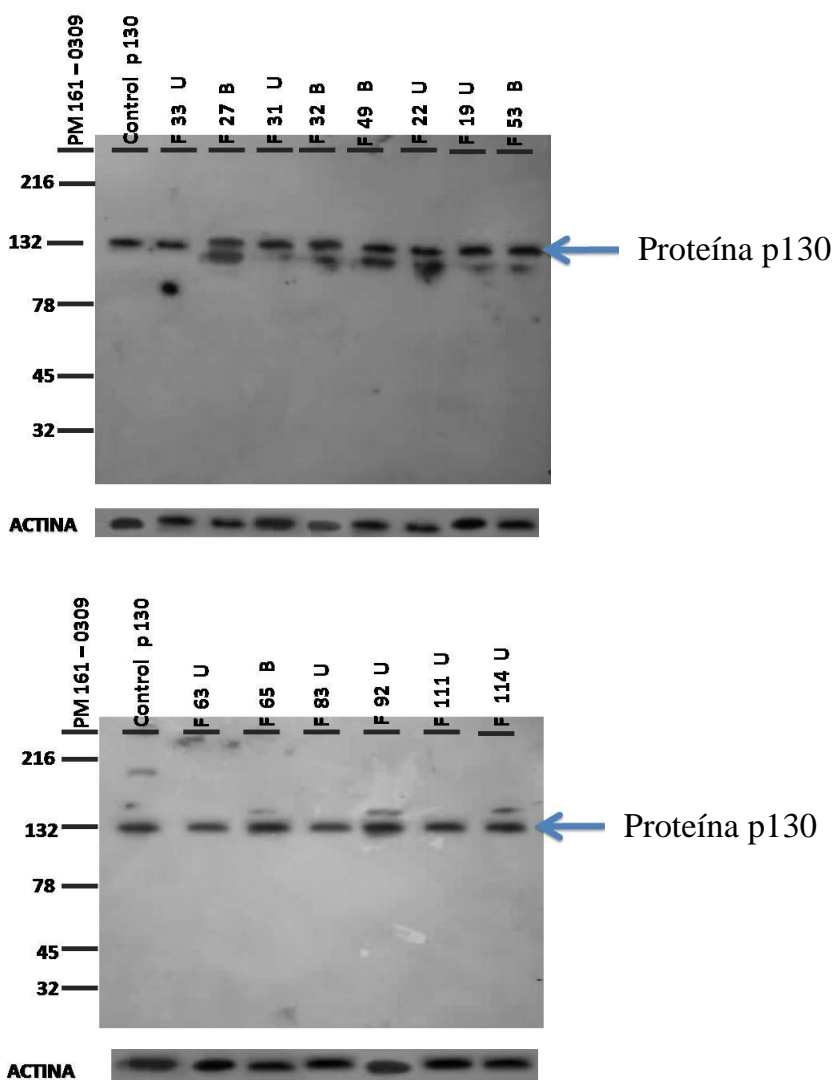


Figura 17-18: Señal presente para los controles positivos de la proteína p130, al igual que en el grupo de muestras de los retinoblastomas.

Los resultados obtenidos para la presencia de la proteína p 130, en las 24 muestras totales analizadas, se resumen en la tabla 8.

Tabla 8: Resumen de los resultados obtenidos para la proteína p130.

<u>Folio</u>	<u>p 130</u>	<u>Folio</u>	<u>p 130</u>
<u>F 19</u>	√	<u>F 74</u>	√
<u>F 22</u>	√	<u>F 81</u>	√
<u>F 27</u>	√	<u>F 83</u>	√
<u>F 31</u>	√	<u>F 85</u>	√
<u>F 32</u>	√	<u>F 86</u>	√
<u>F 33</u>	√	<u>F 92</u>	√
<u>F 40</u>	√	<u>F 106</u>	√
<u>F 49</u>	√	<u>F 111</u>	√
<u>F 53</u>	√	<u>F 114</u>	√
<u>F 63</u>	√	<u>F 122</u>	√
<u>F 65</u>	√	<u>F 168</u>	√
<u>F 73</u>	√		
		y 79	√

√ : señal presente para la proteína p130

El resumen de los datos experimentales obtenidos así como los datos clínicos relevantes de las muestras se ilustran en la tabla 9.

Tabla 9: Resumen de las 24 muestras con los parámetros analizados.

No. De Muestras	Folio	Lateralidad	VPH	Hospital	Edad al Dx	Sexo	p 107	p 110 (pRb)	p 130
1	<u>F 19</u>	<u>1</u>	<u>pos</u>	HIM	9 meses	Masculino	√	√*	√
2	<u>F 22</u>	<u>1</u>	<u>pos</u>	IMSS	7 meses	Masculino	√	√*	√
3	<u>F 27</u>	<u>2</u>	<u>pos</u>	HIM	9 meses	Femenino	√	X	√
4	<u>F 31</u>	<u>1</u>	<u>pos</u>	HIM	1 año	Masculino	√	X	√
5	<u>F 32</u>	<u>2</u>	<u>pos</u>	HIM	1 año	Femenino	√	X	√
6	<u>F 33</u>	<u>1</u>	<u>pos</u>	HIM	3 años	Femenino	√	X	√
7	<u>F 40</u>	<u>1</u>	<u>neg</u>	HIM	6 años	Femenino	√	X	√
8	<u>F 49</u>	<u>2</u>	<u>pos</u>	HIM	2 años	Masculino	√	X	√
9	<u>F 53</u>	<u>2</u>	<u>neg</u>	HIM	2 años	Femenino	√	X	√
10	<u>F 63</u>	<u>1</u>	<u>pos</u>	HIM	2 años	Femenino	√	X	√
11	<u>F 65</u>	<u>2</u>	<u>pos</u>	IMSS	1 año	Masculino	√	X	√
12	<u>F 73</u>	<u>2</u>	<u>pos</u>	IMSS	1 año	Masculino	√	√	√
13	<u>F 74</u>	<u>2</u>	<u>pos</u>	HIM	9 meses	Femenino	√	√	√
14	<u>F 81</u>	<u>1</u>	<u>neg</u>	IMSS	10 meses	Femenino	√	X	√
15	<u>F 83</u>	<u>1</u>	<u>pos</u>	IMSS	1 año	Femenino	√	X	√
16	<u>F 85</u>	<u>1</u>	<u>pos</u>	IMSS	3 años	Masculino	√	√	√
17	<u>F 86</u>	<u>1</u>	<u>pos</u>	HIM	3 años	Femenino	√	√	√
18	<u>F 92</u>	<u>1</u>	<u>pos</u>	HIM	1 año	Masculino	√	X	√
19	<u>F 106</u>	<u>1</u>	<u>neg</u>	IMSS	7 años	Masculino	√	X	√
20	<u>F 111</u>	<u>1</u>	<u>pos</u>	HIM	3 años	Femenino	√	X	√
21	<u>F 114</u>	<u>1</u>	<u>pos</u>	HIM	11 meses	Masculino	√	X	√
22	<u>F 122</u>	<u>1</u>	<u>neg</u>	HIM	5 años	Masculino	√	X	√
23	<u>F 168</u>	<u>2</u>	<u>neg</u>	HIM	2 años	Masculino	√	√	√
24	y 79	<u>2</u>	<u>neg</u>				√	X	√

√ : presente de la proteína

X : ausencia de la proteína

√*: señal presente, pero no en el peso esperado (tal vez se trate de una proteína truncada)

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las 23 muestras analizadas 7 provienen de pacientes atendidos en el IMSS, lo que corresponde al 30% y las 16 muestras restantes correspondientes al 70 % provienen de pacientes atendidos en el Hospital Infantil de México. Esto se debe a que en el HIM se atienden más casos de retinoblastoma que en el Hospital de Pediatría del IMSS. El género de los pacientes analizados no mostró diferencia, ya que se encontró un porcentaje semejante entre niños y niñas, lo cual es consistente con lo reportado en la literatura [10].

El análisis y la distribución de la edad al momento del diagnóstico, nos indica que la edad promedio de los niños es de 2.1 años, sin embargo al separar el análisis por lateralidad los niños que tienen enfermedad bilateral tienen en promedio 1.3 años de edad al momento del diagnóstico mientras que los niños afectados por la forma unilateral tienen en promedio 3 años de edad al momento del diagnóstico lo cual tiene relación con lo citado en la literatura, por ejemplo, Martin y colaboradores menciona que la edad media al diagnóstico de esta enfermedad es de aproximadamente 24 meses [3].

Se demostró la presencia de las proteínas p130 y p107 por western blot, en todas las muestras analizadas. La proteína pRb se encontró expresada en 5 de las 24 muestras F73, F74, F85, F86 y F168 mostradas en negritas en la tabla 9. En las muestras F19 y F22 mostradas en cursivas en la tabla 9, se identificaron claramente dos señales, aunque de un tamaño no esperado. Se puede especular que se trata de formas truncadas de la proteína pRb por mutaciones que resulten en codones de terminación prematura. Es interesante señalar que 4 de las 5 muestras en las cuales se detectó pRb, son VPH positivos, también llama la atención que las muestras provenientes de los casos F19 y F22, comentadas previamente estas también son VPH positivas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con lo encontrado con trabajos previos. Ya que al igual que Orjuela y colaboradores que encontraron por inmunohistoquímica la proteína pRb significativamente asociada al DNA del virus detectado por PCR, en este trabajo encontramos por western blot la presencia de la proteína pRb en varios casos VPH positivos[15]. En el grupo de estudio de este trabajo, la proporción total de casos VPH positivos por PCR es de 17 casos, correspondiente al 71%.

Los datos anteriores sugieren una asociación entre la expresión de la proteína pRb, el estatus VPH positivo y edad al diagnóstico menor de 3 años, como lo muestra la Figura 19. La cantidad de muestras sin embargo es pequeña y es conveniente aumentar la N para poder realizar análisis estadísticos.

Posible asociación con la expresión de la proteína pRb



Figura 19: Los datos sugieren una asociación entre a la presencia de la proteína pRb con el estatus VPH y la edad de los niños.

No se logró identificar patrones característicos con los otros parámetros analizados como son lateralidad y género, probablemente sea necesario incrementar el número de muestras para descartar que en realidad no haya una asociación con estos parámetros.

8. CONCLUSIONES

- Se estandarizó la técnica de western blot para las proteínas p 107, p Rb y p130.
- Se llevó a cabo la extracción de las proteínas totales a partir de los retinoblastomas primarios.
- Se cuantificaron las proteínas totales mediante el método de Lowry.
- Las proteínas p107 y p130 se encontraron mediante Western blot en todas las muestras analizadas.
- La proteína pRb se encontró en 4 casos con estatus VPH positivo, de los cuales dos son unilaterales y 2 son bilaterales y en 1 caso con estatus VPH negativo que es bilateral, todos pacientes menores de 3 años al momento del diagnóstico.

PERSPECTIVAS

Para poder hacer análisis estadístico es necesario incrementar el número de casos en este estudio. Sería de interés también profundizar en aspectos funcionales de las proteínas pRb identificadas para establecer si son funcionales o no.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alberts, B., *Biología Molecular de la Célula*. . 3ª. ed. 2004 España: editorial Omega.
2. Fajardo A, *Epidemiología descriptiva de las neoplasias malignas en niños*. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 1999. 6(2): p. 75-88.
3. N. Martín, et al., *Retinoblastoma* *Annals d´ Oftalmología* 2001. 9(2): p. 74-92.
4. Abbas, A.L., A, *Inmunología celular y molecular*. 5ta. Ed. 2004, España Elsevier.
5. Villee, A., *Biología*. Octava edición ed. 1996, México D.F.: Editorial McGraw –Hill.
6. Rodriguez-Cruz, M., M. del Prado, and M. Salcedo, [Genomic retinoblastoma perspectives: implications of tumor supressor gene RB1]. *Rev Invest Clin*, 2005. 57(4): p. 572-81.
7. Adams, P.D., Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin/cdks. *Biochim Biophys Acta*, 2001. 1471(3): p. M123-33.
8. J.R. Fontenla, A.M., L. Pelegrín, A. Aranda, A. Burés, M. Ferran, E. Ribas, *Retinoblastoma*. *La Medicina Hoy* 2005 LXVIII: p. 33-44.
9. Ibis Menéndez, M.P., Nora Ruisánchez, *El Retinoblastoma: Paradigma del cáncer hereditario*. *Rev Cubana Med*, 2002. 41(1): p. 35-38.
10. Arturo Trincado, J.L., M González,, *Retinoblastoma en pediatría, experiencia en un hospital pediátrico*. *Revista Chilena de Pediatría*, 2008. 79 (6): p. 614-622.
11. Orye, E., M.J. Delbeke, and B. Vandenabeele, *Retinoblastoma and D-chromosome deletions*. *Lancet*, 1971. 2(7738): p. 1376.
12. Lele, K.P., L.S. Penrose, and H.B. Stallard, *Chromosome Deletion in a Case of Retinoblastoma*. *Ann Hum Genet*, 1963. 27: p. 171-4.

-
-
13. Knudsen, E.S. and K.E. Knudsen, Retinoblastoma tumor suppressor: where cancer meets the cell cycle. *Exp Biol Med* (Maywood), 2006. 231(7): p. 1271-81.
 14. Knudson, A.G., Jr., Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1971. 68(4): p. 820-3.
 15. Orjuela, M., et al., Presence of human papilloma virus in tumor tissue from children with retinoblastoma: an alternative mechanism for tumor development. *Clin Cancer Res*, 2000. 6(10): p. 4010-6.
 16. Mohan, A., et al., Detection of human papillomavirus ADN in retinoblastoma samples: a preliminary study. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2009. 31(1): p. 8-13.
 17. Montoya-Fuentes, H., et al., Identification of ADN sequences and viral proteins of 6 human papillomavirus types in retinoblastoma tissue. *Anticancer Res*, 2003. 23(3C): p. 2853-62.
 18. Palazzi, M.A., et al., Detection of oncogenic human papillomavirus in sporadic retinoblastoma. *Acta Ophthalmol Scand*, 2003. 81(4): p. 396-8.
 19. Matsunaga, E., [Genetics and epidemiology of retinoblastoma]. *Gan No Rinsho*, 1987. 33(5 Suppl): p. 507-13.
 20. Pawlak, B.R., Retinoblastoma: an epidemiological study (survey and review). *J Surg Oncol*, 1975. 7(1): p. 45-55.
 21. Somsanguan, A., Epidemiology study of retinoblastoma in Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital. Elsevier Science Publishers, 1992
 22. Bunin, G.R., et al., Pre- and postconception factors associated with sporadic heritable and nonheritable retinoblastoma. *Cancer Res*, 1989. 49(20): p. 5730-5.
 23. López, A.y.L., M, Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología 1*, (2006): p. 31-55.
 24. Friend, S.H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R.A., Rapaport, J.M., Albert, D.M. y Dryja, T.P. , A human ADN segment with properties of the

-
- gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*, 323, 1986 p. 643-6.
25. Weinberg, R.A., The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 1995. 81(3): p. 323-30.
 26. Morgan, D.O., Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1997. 13: p. 261-91.
 27. Lundberg, A.S. and R.A. Weinberg, Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol*, 1998. 18(2): p. 753-61.
 28. Du, W. and J. Pogoriler, Retinoblastoma family genes. *Oncogene*, 2006. 25(38): p. 5190-200.
 29. Lee, E.Y., et al., Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature*, 1992. 359(6393): p. 288-94.
 30. Sage, J., et al., Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G(1) control and immortalization. *Genes Dev*, 2000. 14(23): p. 3037-50.
 31. Farkas, T., et al., Distinct phosphorylation events regulate p130- and p107-mediated repression of E2F-4. *J Biol Chem*, 2002. 277(30): p. 26741-52.
 32. Claudio, P.P., et al., Mutations in the retinoblastoma-related gene RB2/p130 in lung tumors and suppression of tumor growth in vivo by retrovirus-mediated gene transfer. *Cancer Res*, 2000. 60(2): p. 372-82.
 33. Trimarchi, J.M., et al., The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(4): p. 1519-24.
 34. Ichimura, K., et al., Structure of the human retinoblastoma-related p107 gene and its intragenic deletion in a B-cell lymphoma cell line. *Gene*, 2000. 251(1): p. 37-43.
 35. Classon, M. and N. Dyson, p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets. *Exp Cell Res*, 2001. 264(1): p. 135-47.

-
36. Cinti, C., et al., Genetic alterations of the retinoblastoma-related gene RB2/p130 identify different pathogenetic mechanisms in and among Burkitt's lymphoma subtypes. *Am J Pathol*, 2000. 156(3): p. 751-60.
 37. Ewen, M.E., et al., Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression of the cADN for p107, a retinoblastoma gene product-related protein. *Cell*, 1991. 66(6): p. 1155-64.
 38. Huppi, K., et al., Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression of the mouse p107 gene. *Mamm Genome*, 1996. 7(5): p. 353-5.
 39. Mayol, X., et al., Cloning of a new member of the retinoblastoma gene family (pRb2) which binds to the E1A transforming domain. *Oncogene*, 1993. 8(9): p. 2561-6.
 40. Donovan, S.L., et al., Compensation by tumor suppressor genes during retinal development in mice and humans. *BMC Biol*, 2006. 4: p. 14.
 41. Dannenberg, J.H., et al., Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G(1) control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions. *Genes Dev*, 2000. 14(23): p. 3051-64.
 42. Jiang, Z., et al., The retinoblastoma gene family is differentially expressed during embryogenesis. *Oncogene*, 1997. 14(15): p. 1789-97.
 43. Tedesco, D., J. Lukas, and S.I. Reed, The pRb-related protein p130 is regulated by phosphorylation-dependent proteolysis via the protein-ubiquitin ligase SCF(Skp2). *Genes Dev*, 2002. 16(22): p. 2946-57.
 44. Cinti, C., et al., Genetic alterations disrupting the nuclear localization of the retinoblastoma-related gene RB2/p130 in human tumor cell lines and primary tumors. *Cancer Res*, 2000. 60(2): p. 383-9.
 45. Chomczynski, P. and N. Sacchi, Single-step method of ARN isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987. 162(1): p. 156-9.

-
46. Frederick M. Ausubel, R.B., Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith, Kevin Struhl., Current Protocols in Molecular Biology. 2003, John Wiley & Sons, Inc.
 47. Augusto, F., Rango Lineal de Una Curva de Calibración. . Universidad Estadual de Campinas: Instituto de Química, Chemkeys., 2000.
 48. Campell, M., Biochemistry. , ed. 2da. 1995, Saunders: College Publishing, pp 522.
 49. Ausubel, F.M., Short protocols in molecular biology : a compendium of methods from Current protocols in molecular biology. . 5th ed. 2002, New York: Wiley, pp 4410.

10. GLOSARIO

Radioterapia con rayos externos: tratamiento que emplea máquinas para dar radiación y tratar los tumores.

Placas radiactivas: son discos radioactivos para radiar el retinoblastoma.

Crioterapia: tratamiento que se realiza bajo anestesia local o general y congela los tumores más pequeños mediante la aplicación de nitrógeno líquido.

Quimiorreducción: es el tratamiento del retinoblastoma con quimioterapia (medicamentos contra el cáncer). Su administración es por vía intravenosa y provocan la reducción del tumor

Enfermedad de Coats: La enfermedad de Coats es un problema que se observa principalmente en pacientes de sexo masculino, y que se caracteriza por la presencia de telangiectasias que son malformaciones vasculares en la retina.

Toxocariasis: es una enfermedad parasitaria constituida por una alteración retiniana/coroidea causada por la larva de *Toxocara canis*, que generalmente produce un granuloma solitario, usualmente a nivel macular.

Clonación posicional: es una estrategia para la identificación de enfermedades genéticas donde se localiza al gen responsable basándose únicamente en su posición cromosómica

Dominio proteico: es la zona de la proteína donde se halla mayor densidad. Es decir, donde hay más plegamientos. Un dominio proteico puede ser funcional si es una unidad modular de la proteína que lleva a cabo una función bioquímica determinada, y estructural si se refiere a un componente estable de la estructura

Solución caotrópica: Los agentes caotrópicos son aquellos que desestabilizan estructuras moleculares que se sostenían con interacciones no permanentes (interacciones electrostáticas, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno) al ser solutos en una disolución.

11. ANEXOS

ANEXO I

Protocolo para detectar por western blot la proteína pRb (p110) usando como control positivo extractos totales de la línea celular K562.

PASOS	REACTIVOS Y SOLUCIONES	CONDICIONES
SDS PAGE		8% 200 V / 60 min
Transferencia	Membrana PVDF	Cámara semi-seca (BIORAD) 15 V / 100 min
Bloqueo	TBS – T / Leche 5 %	2 hrs / TA
Anticuerpo 1º	SC _ 50 TBS – T / Leche 5 %	1: 100 Toda la noche / CF
1 Lavado	TBS – T	10 min
Anticuerpo 2º	ECLNA – 934 TBS – T / Leche 5 %	1: 5000 ; 1 hr / TA
3 Lavados	TBS – T	10 min cada uno
Revelado	Sustrato Quimioluminiscente HRP (Peroxidasa de rábano)	minigel 1 ml (0.5ml luminol + 0.5 ml peróxido) Tiempo aprox: 5 min

TA: Temperatura Ambiente

CF: Cuarto Frio

ANEXO II

Protocolo para detectar por western blot la proteína p107 usando como control positivo extractos totales de la línea celular C32.

PASOS	REACTIVOS Y SOLUCIONES	CONDICIONES
SDS PAGE		8% 200 V / 60 min
Transferencia	Membrana PVDF	Cámara semi-seca (BIORAD) 15 V / 100 min
Bloqueo	TBS – T / Leche 5 %	2 hrs / TA
Anticuerpo 1°	SC _ 318 TBS – T / Leche 5 %	1: 300 Toda la noche / CF
1 Lavado	TBS - T	10 min
Anticuerpo 2°	ECLNA – 934 TBS – T / Leche 5 %	1: 5000 ; 1 hr / TA
3 Lavados	TBS - T	10 min cada uno
Revelado	Sustrato Quimioluminiscente HRP (Peroxidasa de rábano)	minigel 1 ml (0.5ml luminol + 0.5 ml peróxido) Tiempo aprox: 5 min

TA: Temperatura Ambiente

CF: Cuarto Frio

ANEXO III

Protocolo para detectar por western blot la proteína p130 usando como control positivo extractos Nucleares de la línea celular C32.

PASOS	REACTIVOS Y SOLUCIONES	CONDICIONES
SDS PAGE		10% 200 V / 60 min
Transferencia	Membrana PVDF	Cámara semi-seca (BIORAD) 15 V / 100 min
Bloqueo	TBS – T / Leche 5 %	2 hrs / RT
Anticuerpo 1°	SC _ 317 TBS – T / Leche 5 %	1: 300 Toda la noche / CF
6 Lavados	TBS - T	10 min
Anticuerpo 2°	ECLNA – 934 TBS – T / Leche 5 %	1: 5000 ; 1 hr / TA
3 Lavados	TBS - T	10 min cada uno
Revelado	Sustrato Quimioluminiscente HRP (Peroxidasa de rábano)	minigel 1 ml (0.5ml luminol + 0.5 ml peróxido) Tiempo aprox: 5 min

TA: Temperatura Ambiente

CF: Cuarto Frio

ANEXO IV

Preparación de geles de poliacrilamida al 8%

Componentes del gel separador 8%		Componentes del gel concentrador	
Agua mQ	2.3 ml	Agua mQ	2.1 ml
Acrilamida- bisacrilamida 30% (29g-1g)	1.3 ml	Acrilamida- bisacrilamida 30% (29g-1g)	0.5 ml
Tris/HCl 1.5 M pH 8.8	1.3 ml	Tris/HCl 1 M pH 6.8	0.38 ml
SDS 10%	50 µl	SDS 10%	30 µl
Persulfato de amonio 10%	50 µl	Persulfato de amonio 10%	30 µl
TEMED	3 µl	TEMED	3 µl

Componentes para la preparación del amortiguador de corrida

Buffer de corrida 1X (1L)	
Tris base 25mM	3.03g
Glicina 191mM	14.4g
SDS 0.1%	1g
H2O	

Componentes para la preparación del amortiguador de Transferencia

Buffer de transferencia 1X (1L)		
Tris base	25mM	3.03g
Glicina	191mM	14.4g
Metanol	20%	200 ml
SDS	0.1%	5 ml
H2O		
