



**“Sistemas basados en anticuerpos aviares y mamíferos para
la detección por Inmunohistoquímica del marcador tumoral
Her2.”**

Tesis en Opción al Título Académico de Máster en Biotecnología.

Mención Biotecnología Industrial

Autora: Lic. Jhoanet Jacas Molina

Tutor: Dr.C. Esteban Gutiérrez Calzado

Santiago de Cuba

2015

DEDICATORIA

Sistemas basados en anticuerpos aviares y mamíferos para la detección por Inmunohistoquímica del marcador tumoral Her2.

Dedicatoria

A mis padres, porque creyeron en mí, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de mi vida, y porque el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo ir hasta el final. Va por ustedes, por lo que valen, porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho de mí.

A mis hijas por quienes cada día de mi vida tiene sentido, las testigos silenciosas de mis luchas cotidianas en busca de un mejor futuro, a ellas, mi esperanza, mi alegría, mi vida y la culminación de este trabajo, para que tengan presente que en la vida el esfuerzo merece la pena y les pido perdón por el tiempo que no les he dedicado.

A todos aquellos que son movidos por un gran amor a la vida y a la naturaleza, que están convencidos de que un mundo mejor es posible si se tienen los conocimientos para ayudar y el corazón para vencer

A la vida.... Por lo aprendido

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

- A mis padres por todo el amor que solo ellos saben dar en cada momento
- A mis hijas por ser la fuente que me inspiran a ser cada día mejor
- A mi tutor Esteban por la paciencia que ha tenido conmigo, el tiempo que me dedicó y por sus consejos y enseñanzas que me servirán en mi vida profesional y personal, además por su gran apoyo y experiencia metodológica que ha sido crucial para la redacción de este documento.
- A mi amiga Nadia por estar a mi lado cada vez que la necesité.
- A Ernesto y su familia por dar todo lo que podían y hasta lo imposible en la realización y culminación de este objetivo y por ser parte de mi inspiración.
- A mis compañeros inseparables del Departamento de Calidad pero en especial a Suzelt, Rafael, Katyuska y Katya con los cuales compartí momentos alegres y tristes, fáciles y difíciles y que somos todos como una gran familia.
- A las muchachitas del laboratorio de Control de Calidad por todo el apoyo incondicional
- A mis compañeros de LABEX y el CIM por sus aportes imprescindibles en la ejecución de los trabajos experimentales y por el apoyo técnico
- Al claustro de profesores de la Maestría por los conocimientos y la ayuda brindada, especialmente a los de mención Industrial y a la profe Rosa.
- A mis compañeros de la maestría especialmente a Grisel por la ayuda incondicional y desinteresada que me ha dado. También, Maibis, Yamila, Abelardo, Ariel y Asel,
- A todos aquellos que de alguna manera u otra me dieron su apoyo.

RESUMEN

Resumen

RESUMEN

Los estudios recientes realizados con diversos biomarcadores de detección precoz del cáncer a nivel mundial han mostrado resultados controvertidos. Como parte de un esfuerzo a nivel internacional de mejorar su validación, se mantiene una incesante búsqueda de anticuerpos que los identifiquen, para ello se explotan diversas tecnologías para generar inmunoglobulinas específicas con este fin. En este trabajo nos propusimos obtener anticuerpos anti HER-2 a partir de la inmunización de aves y mamíferos, para utilizarlos como anticuerpos tanto primarios como secundarios, en un paquete diagnóstico para estudios posteriores en muestras de tejido. Para ello se inmunizaron gallinas y conejos con aproximadamente 150 µg de la proteína Her-2 pura, obtenida por Cromatografía de Inmunofinidad para la obtención de marcadores primarios, así como conejos para obtener las anti inmunoglobulinas Y de gallina como reactivo secundario, las que fueron marcadas con biotina. Como reactivo revelador en ambos sistemas se utilizó un complejo Streptavidina – FITC de una fuente comercial. Los resultados obtenidos en técnicas inmunohistoquímicas reflejan que el paquete diagnóstico formado por anticuerpos IgY primario conjuntamente con la IgG de conejo anti IgY, reveló ser más sensible y específico que su similar constituido exclusivamente por inmunoglobulinas de mamíferos, lo que nos sugiere que la Tecnología IgY puede constituir una vía para un suministro estable y consistente de anticuerpos primarios para la producción de paquetes reactivos con estos fines.

ABSTRACT

Abstract

ABSTRACT

Recent studies using various biomarkers for early cancer detection have shown controversial results worldwide. As part of an international effort to improve their validation, a relentless pursuit of antibodies that identify them remains, for that, different technologies are exploited to generate specific immunoglobulins for this purpose. In this paper we proposed anti HER2 antibody obtained from immunization of birds and mammals for use as both primary and secondary antibodies as a diagnostic package for further studies in tissue samples. To do, hens and rabbits were immunized with approximately 150ug of Her-2 pure protein obtained by immunoaffinity chromatography for obtaining primary markers, and rabbits to obtain anti chicken immunoglobulin Y as secondary reagent, which were labeled with biotin. As disclosing reagent in both systems consisted a streptavidin - FITC complex from commercial source.

The results obtained shown that for immunohistochemistry diagnosis, primary package formed by IgY antibodies together with rabbit IgG anti IgY revealed be more sensitive and specific than the similar consisting exclusively of mammalian immunoglobulins which it suggests that the IgY Technology can be a way for a stable and consistent primary antibody reagents for the production of packages for this purpose supply.

INDICE

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 <i>Biomarcadores. Concepto</i>	5
2.2 Biomarcadores Tumorales. Estado actual	7
2.3 Her2 y su relación con el cáncer de mama.....	9
2.4 Inmunoensayos para detección de Biomarcadores	13
2.5 Inmunoensayos y cáncer de mama	16
2.6 Actualidad en el diagnóstico de cáncer	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1 Antígenos para la inmunización.....	20
3.2 Determinación de la presencia de Her2 en las muestras inmunogénicas por el método ELISA. 21	
3.3 Esquema de inmunización.....	21
3.3.1. Biomodelos Experimentales.....	21
3.3.2 Inmunización	23
3.3.3 Obtención de los sueros.....	23
3.3.4 Obtención de los sobrenadantes delipidados de yema de huevos Preparación de la IgY de yema de huevo por el método de la fracción soluble en agua (WSF).	24
3.4 Purificación de los anticuerpos anti Her2 en conejo.....	25
3.5 Dinámica en el título de anticuerpos y especificidad.....	25
3.6 Técnica de Inmunodifusión doble bidimensional de Ouchterlony.....	25
3.7. Cromatografía de Inmunofinidad para los Acs anti IgY y la molécula Her2	26
3.8 Conjugación de anticuerpos con biotina.....	27
3.9. Determinación del reconocimiento específico de los anticuerpos primarios y secundarios mediante Citometría de Flujo.....	28
3.9.1. Anticuerpos primarios:	28
3.9.2. Anticuerpos secundarios conjugados a biotina.....	28
3.10. Caracterización de los dos sistemas (anti Her2 en conejo- anti conejo biotinilado y anti Her2 en pollo -anti pollo biotinilado) mediante inmunohistoquímica en tejido.	29
3.11. Análisis estadístico	31
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32

4.1. Purificación de antígeno	32
4.2. Electroforesis de la molécula Her2 purificada.	34
4.3. Valores de densidad óptica (DO) obtenidas por la prueba ELISA para evaluar la calidad de reconocimiento de los tres lotes de Ag purificado	36
4.4. Dinámica en la producción de Anticuerpos específicos obtenidos contra el antígeno Her2.	37
4.4.1. Niveles de anticuerpos anti Her2 en pollo.	37
4.4.2. Niveles de anticuerpos anti Her2 en conejo	40
4.4.3. Comparación de la dinámica de los títulos de anticuerpos específicos anti Her2 entre gallina y conejo	41
4.4.4 Purificación de los Anticuerpos primarios anti Her 2.....	43
4.6. Purificación de los Anticuerpos secundarios anti IgY	47
4.7. Reconocimiento de los anticuerpos primarios Anti-Her2 mediante Citometría de flujo.	48
4.8. Reconocimiento de los anticuerpos secundarios biotinilados.	51
4.9. Evaluación de los sistemas de detección por Inmunohistoquímica en tejido.....	52
4.10 Valoración Económica	54
5. CONCLUSIONES.....	55
6. RECOMENDACIONES	55
7. BIBLIOGRAFÍA	56

LEYENDA DE ABREVIATURAS

Leyenda de abreviaturas

LABEX: Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales

CIM: Centro de Inmunología Molecular

IgG: Inmunoglobulina IgG

IgY: Inmunoglobulina IgG de pollo.

IgM: Inmunoglobulina M

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína

RNAm: Ácido Ribonucleico mensajero

HER2: Human epidermal growth factor Receptor 2

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

ELISA: “*Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay*” (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)

IHQ: inmunohistoquímica

Ac: Anticuerpo

SPR Surface Plasmon Resonance

µg: microgramos

cm: centímetros

%: por ciento

mL: Mililitro

mg: Miligramo

kg: Kilogramo

g: Gramo

CENPALAB: Centro Nacional Producción de Animales de Laboratorio

°C: Grados Celsius

I.M: Intramuscular

SSF: Solución Salina Fisiologica ACF:

Adyuvante completo de Freund AIF:

Adyuvante incompleto de Freund

Leyenda de abreviaturas

WSF: Water soluble fraction (Fracción soluble en agua)

HCL: Ácido Clorhídrico

h: Hora

min: Minuto

EYS: Egg yolk supernatant (Sobrenadante de yema de huevo)

IRD: Inmunodifusión doble bidimensional

IEE Inmunoensayos Enzimáticos

DMSO: Dimetilsulfóxido

PBS: Buffer Fosfato Salino 0,01M pH 7,2

DAB: DIAMINOBENCIDINA

OPD: o-Phenylenediamine dihydrochloride

PSA: Antígeno Prostático Específico

Tnlc: Troponina IC

ECD: Dominio extracelular de la oncoproteína HER-2/neu

FA: Fosfatasa alcalina

QDs: quantum dots o nanocristales o puntos cuánticos

INTRODUCCION

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos treinta años se han alcanzado progresos significativos en el entendimiento del cáncer, no obstante esta entidad sigue constituyendo la segunda causa de muerte en países desarrollados. La detección precoz de cáncer por métodos no invasivos resulta un tema de gran interés dado que ésta, al permitir terapias con mayor precisión, puede incrementar significativamente la tasa de supervivencia de los pacientes.

La detección de cáncer en sus estadios tempranos necesita de ensayos de alta sensibilidad que puedan reconocer marcadores para la carcinogénesis. Los biomarcadores son indicadores celulares de estados fisiológicos y/o cambio durante el proceso de una enfermedad. Estos pueden tomar variedad de formas que incluyen genes y variaciones genéticas, cambios en el RNAm y/o la expresión de proteínas, modificaciones postraduccionales de las proteínas, y diferencias del nivel de un metabolito. Hasta la fecha, la mayoría de los biomarcadores para cáncer que se han identificado con mayor prominencia para la aplicación clínica son de naturaleza proteica.

De la familia de biomarcadores HER (relacionado con el EGFR humano) familia del receptor tyrosine kinases se conoce el HER1/EGFR (epidermal growth factor receptor)/c-erbB1, HER2/c-erbB2, HER3/c-erbB3 y HER4/c-erbB4), los cuales comparten un alto grado de homología estructural y funcional. Estos comprenden una red compleja de acoplamiento de varios ligandos extracelulares hacia rutas de transducción intracelular que resulta de la interacción del receptor y una activación cruzada, y su nivel de expresión celular juega un rol pivote como marcador pronostico ⁽¹⁾ sobre todo en cáncer de mama y es decisivo en la selección de pacientes para la terapia con trastuzumab. ^(2, 3)

Estos biomarcadores pueden ser probados a partir de diversas muestras que incluyen desde los propios tejidos tumorales hasta fluidos de la sangre y orina.

Introducción

Las técnicas de ELISA e Inmunohistoquímica son las de uso más común para identificar biomarcadores proteicos. La Inmunohistoquímica (IHQ) posee una principal ventaja, y es que permite la evaluación de la expresión del biomarcador con relación a las características morfológicas del tumor. Hay dos factores principales que han impedido el desarrollo de IHQ cuantitativos y son la baja especificidad de los Acs IgG de mamíferos y la inestabilidad de los fluoróforos orgánicos.

Todos los anticuerpos en uso clínico hasta hoy para hacer diana en células cancerosas son IgG monoclonales de origen mamífero. ⁽⁴⁾ Recientemente se ha visto renovado un interés en el uso de anticuerpos IgY aviares como sustitutos de las IgG en Inmunoensayos y aplicaciones clínicas. ⁽⁵⁾ Las IgY distintas de las IgG en cuanto a lo que estructura molecular y características bioquímicas se refiere posee muchas atractivas ventajas desde los puntos de vista bioquímico, inmunológico y de producción sobre las IgG, éstas poseen una alta afinidad por las proteínas de mamíferos por la diferencia en los procesos de maduración que sufre la IgY, alta estabilidad al ser aplicada en superficies como por ejemplo, mayor estabilidad al aplicarse a microesferas de latex, y sobre superficies hidrofóbicas, facilita la fabricación de microarreglos de proteínas basados en anticuerpos, mejora la detección de antígenos proteicos en la técnica SPR (del inglés Surface Plasmon Resonance) y se dispone de las mismas para su desarrollo prospectivo ⁽⁵⁾, de tal manera que ya ha sido demostrada las ventajas que ofrece el uso de anticuerpos IgY anti HER2 en la detección de células de cáncer de mama. ⁽⁶⁾ Los anticuerpos IgY suministran una detección más sensible y específica de células de cáncer de mama al compararse con anticuerpos IgG e IgM comerciales. Estos anticuerpos IgY anti HER2 conjugados a diversas etiquetas moleculares han mostrado tener potencial para brindar medidas cuantitativas de los biomarcadores. ^(2,6,7)

Introducción

La capacidad para obtener preparados puros de la proteína HER2 en nuestro laboratorio conjuntamente con la capacidad de extracción de anticuerpos IgY a partir de las yemas de huevos de gallinas inmunizadas, así como la experiencia en métodos tradicionales de producción de anticuerpos a partir de los sueros de mamíferos inmunizados, nos permitió trazarnos en este trabajo el objetivo de obtener preparados de inmunoglobulina IgY de pollo e IgG de conejo específica contra este biomarcador tumoral, así como sus respectivos anticuerpos anti inmunoglobulinas en animales heterólogos para evaluar su uso en un ensayo inmuistoquímico específico y proponer entre éstos, el de mejor desempeño en la detección de cáncer de mama.

Problema

La detección de cáncer en sus estadios tempranos necesita de ensayos de alta sensibilidad que puedan reconocer marcadores para la carcinogénesis. En nuestro país no se cuentan con paquetes diagnósticos específicos y sensibles para el marcador tumoral Her2 en los servicios de anatomía patológica de los hospitales provinciales.

Hipótesis

Un sistema de detección para el marcador tumoral Her2 a partir de anticuerpos primarios IgY es más específico y sensible que un sistema basado en anticuerpos primarios y secundarios de origen mamífero.

Para el rechazo o aceptación de esta hipótesis se plantean los siguientes objetivos:

Introducción

Objetivo general

Obtener anticuerpos primarios y secundarios para la detección del marcador tumoral Her2.

Objetivos específicos

1. Obtener anticuerpos primarios a partir de la Inmunización de gallinas y conejos.
2. Obtener anticuerpos secundarios conjugados con biotina.
3. Evaluar el desempeño de los anticuerpos obtenidos en aves y mamíferos mediante Inmunohistoquímica a través de un sistema de detección Streptavidina – FITC de origen comercial.

REVISION BIBLIOGRÁFICA

Revisión Bibliográfica

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomarcadores. Concepto

La Biología actual ha tenido avances sorprendentes a partir de la segunda mitad del siglo pasado, desde 1950 y hasta la primera década de este milenio. Con la descripción del modelo de la estructura molecular del ácido desoxirribonucleico (ADN) y del proceso de preservación y transmisión de la información genética entre los individuos. ⁽⁸⁾

En 1953 se inicia una nueva etapa de la ciencia biológica conocida como era de la Biología Molecular. Esta etapa, sigue en constante desarrollo y ha sido potenciada significativamente por los últimos descubrimientos científicos y las importantes aportaciones tecnológicas como: la miniaturización y robotización de procedimientos de laboratorio (nanotecnología), el uso de computadoras de gran capacidad y velocidad de procesamiento de datos, así como la elaboración de programas computacionales especializados en el análisis de información biológica (bioinformática). Gracias a la conjunción de todos estos factores se han logrado concluir proyectos tan ambiciosos como la secuenciación completa del genoma humano. ⁽⁹⁾

El análisis pormenorizado de la información genómica obtenida de este proyecto está a la espera de ser comprendida y descrita en su totalidad, pero con la culminación de este proyecto se inicia la era del análisis masivo de información genética conocida como “la era genómica”. En este entorno se impulsa la opción del empleo de biomarcadores moleculares que surgen como una aplicación factible de uso para beneficio tanto en la salud humana, como en las evaluaciones de alteraciones ecológicas e incluso de aplicación en la industria biotecnológica. ⁽¹⁰⁾

Revisión Bibliográfica

La palabra biomarcador o marcador biológico se empezó a utilizar en las ciencias biológicas alrededor de 1960. Sin embargo, el uso de características indicadoras de patologías o síntomas en los individuos se ha realizado de muchos siglos atrás.⁽¹¹⁾

Actualmente, con los avances registrados en la genómica humana se puede considerar que la nueva generación de biomarcadores es aportada por el análisis de macromoléculas orgánicas (proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos) presentes en los individuos, que no solamente indiquen la presencia de alteraciones patológicas, sino también la posible susceptibilidad de cierto paciente a desarrollar alguna enfermedad en el futuro e incluso evaluar la posible respuesta que generará algún individuo enfermo ante determinados procedimientos terapéuticos.⁽¹²⁾

Los biomarcadores son parámetros biológicos que proveen información sobre el estado normal o patológico de un individuo o una población, y son utilizados para la comprensión de diferentes enfermedades en variados aspectos como: el tratamiento, prevención, diagnóstico y progresión de la enfermedad, respuestas a la terapia, evaluación experimental toxicológica de medicamentos o pesticidas, medición de riesgo ambiental y epidemiológico, además de evaluación de la intervención terapéutica, entre otros^(13,14)

La utilidad del uso de biomarcadores como elementos de evaluación de riesgos de afectación de la salud, cada día toma mayor importancia ya que permiten adquisición de mucha información acerca de diferentes tipos de enfermedades, identificación de factores de riesgo para la salud de los individuos y las poblaciones, selección de medicamentos, evaluación de la progresión de las enfermedades y su tratamiento, el desarrollo de políticas en salud ocupacional y ambiental, entre otros.

Revisión Bibliográfica

El desarrollo tecnológico posibilita que los biomarcadores implementados sean cada vez más específicos y son fundamentales en el desarrollo de las diferentes disciplinas biomédicas, que permiten la elaboración de las estrategias y políticas para mejorar las condiciones de vida de los pacientes y de las personas en general, al generar información que permite realizar correctivos para disminuir la mortalidad y morbilidad de los individuos. ^(15,16)

2.2 Biomarcadores Tumorales. Estado actual

Los grandes avances alcanzados en el campo de la oncología a partir de la mitad de la segunda década del Siglo XX, generaron en la comunidad científica la necesidad de contar con pruebas de laboratorios fáciles y eficaces, al alcance de la mayoría de la población, orientadas a detectar neoplasias ocultas, antes de que aparezcan las manifestaciones clínicas, con enfermedad localizada, de utilidad en el diagnóstico y pronóstico, en el tratamiento y en el seguimiento a corto, mediano y largo plazo de los pacientes con cáncer. La respuesta a esta necesidad fue el descubrimiento y el desarrollo tecnológico de los marcadores tumorales y es así como los marcadores tumorales o biomarcadores de cáncer, como también se les conoce, representan uno de los logros más importantes en la lucha contra el cáncer. ⁽¹⁷⁾

Los marcadores tumorales, también denominados marcadores biológicos o biomarcadores, se definen como moléculas, sustancias o procesos que se alteran cualitativa o cuantitativamente como resultado de una condición precancerosa o un cáncer, detectables mediante una prueba de laboratorio en sangre, en líquidos orgánicos o en tejidos. ⁽¹⁸⁾

La naturaleza del marcador tumoral puede ser muy variable, va desde un ácido nucleico, ADN o ARN, una proteína o un péptido, hasta procesos como la apoptosis, la angiogénesis y la proliferación que pueden ser medidos con técnicas apropiadas. ⁽¹⁹⁾

Revisión Bibliográfica

Son múltiples las sustancias y moléculas que pueden ser utilizadas como marcadores tumorales, identificando principalmente la transformación maligna, la proliferación, indiferenciación y diseminación de las células neoplásicas. El valor clínico de los marcadores tumorales dependerá de la sensibilidad y especificidad, pudiendo utilizarse en la búsqueda de cáncer oculto como prueba tamiz en población de alto riesgo, como prueba integral del diagnóstico de las neoplasias en donde se han identificado como criterios de clasificación, pronóstico y predictivos y para seguir el tratamiento y el curso de la enfermedad, incluida la posibilidad de detectar las recaídas oportunamente, cuando éstas se presentan.

(20)

Ciertos marcadores encontrados en células cancerosas pueden ser usados para ayudar a predecir si un tratamiento en particular es propenso a funcionar. Por ejemplo, en el cáncer de seno y cáncer de estómago, si las células contienen grandes cantidades de una proteína llamada HER2, los medicamentos como el trastuzumab (Herceptin®) pueden ser útiles en el tratamiento. Si las células cancerosas presentan niveles normales de HER2, estos medicamentos no serán útiles. En casos como estos, se somete a analizar el tejido del tumor para comprobar la presencia de HER2 antes de iniciar el tratamiento. ⁽²¹⁾

HER2: La HER2 (también conocida como HER2/neu, erbB-2 o EGFR2) es una proteína que hace que crezcan algunas células cancerosas. Se encuentra presente en mayores cantidades a lo normal en la superficie de las células cancerosas del seno en alrededor de 1 de cada 5 pacientes con este tipo de cáncer.

Los niveles más altos de lo normal pueden ser encontrados en otros tipos de cáncer también, como el de estómago y esófago. Los cánceres que son HER2 positivo tienden a crecer y propagarse más rápido que los otros tipos de cáncer.

(22,23,24,25,26)

Revisión Bibliográfica

Las desventajas son que pueden elevarse en pacientes con procesos benignos, no se elevan en todos los pacientes, especialmente en los estadios tempranos y muchos no son específicos de un determinado tipo de cáncer. ⁽²⁹⁾

2.3 Her2 y su relación con el cáncer de mama

HER 2 (factor de crecimiento epidérmico humano-2) son genes comprometidos con el crecimiento y la proliferación celular. El producto de estos genes es un receptor glicoprotéico de transmembrana, estructuralmente similar a EGFR, cuyas formas mutadas promueven la transformación neoplásica de las células, transmitiendo señales de crecimiento desde la membrana al núcleo aumentando la división celular. Un 25-30% de todos los cánceres de mama sobre expresan HER 2, éstos tienen mal pronóstico, mayor riesgo de recurrencia. ^(27,28,30,31)

El carcinoma de mama es una de las neoplasias malignas más frecuentes y de mayor mortalidad en las mujeres de los países industrializados. Debido al comportamiento agresivo de algunas variedades y dado que la mama es un órgano accesible para el diagnóstico temprano, el cáncer de mama es objeto permanente de estudios en relación con los métodos de diagnóstico y tratamiento. Se utilizan de rutina: tamaño del tumor, tipo histológico del mismo, pleomorfismo celular y nuclear, índice mitótico, presencia de necrosis, invasión vascular, estado de los receptores hormonales y de los ganglios linfáticos axilares. Sin embargo, estos parámetros no son suficientes para predecir el curso de la enfermedad.

Los avances de la biología molecular han permitido descubrir nuevos marcadores que ya se han incorporado a la práctica clínica y que brindan una importante información acerca del comportamiento biológico del tumor y la posible respuesta a la radio o quimioterapia y por lo tanto, orientan la terapéutica a implementarse.

En este aspecto, el uso de un panel de marcadores tumorales, proporciona información más certera que la que puede suministrar un solo factor.

Revisión Bibliográfica

Debido a esto, en la actualidad el pronóstico de las neoplasias es más exacto que hace 20 años. ⁽³²⁾

En el 20 al 30% de los cánceres de mama se ha reportado la sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 2 (HER2). ⁽³³⁾ Estos estudios fueron el punto de partida de una extensa serie de publicaciones que asociaron la expresión de esta molécula con mayor agresividad del tumor y la clasificaron como un predictor de respuesta a diferentes esquemas de tratamiento, especialmente al utilizar el trastuzumab, anticuerpo monoclonal humanizado que reconoce el dominio extracelular del HER2, aprobado desde 1998 para su utilización en el tratamiento del cáncer de mama metastásico. ^(34,35) Desde entonces y hasta la fecha, los resultados clínicos obtenidos en la predicción de respuesta abarcaron también a la hormonoterapia y la quimioterapia, y fueron estableciendo el valor del conocimiento de su expresión en los tumores mamarios al momento del diagnóstico, convirtiéndolo en un procedimiento estándar en la práctica clínica del cáncer de mama. ⁽³⁶⁾

En los últimos años se ha ampliado el espectro de marcadores en cáncer de mama, debido a los avances de la biología molecular que está estudiando en profundidad los eventos de la carcinogénesis, la progresión tumoral y los mecanismos de producción de las metástasis.

La sobreexpresión de la proteína Her2 está considerada como un importante factor pronóstico en los estadios tempranos del cáncer de mama y diversos estudios indican que puede ser utilizado también como un marcador predictivo con respecto a la respuesta a la quimioterapia y a la terapia con anti estrógenos.

Se relaciona con un pronóstico desfavorable, presencia de ganglios positivos, expresión alterada de p53 y aumento de la proliferación celular.

Revisión Bibliográfica

Su amplificación es una de las alteraciones genéticas más comunes asociadas con el cáncer de mama dando lugar a la aparición de resistencia a drogas quimioterapéuticas y a conductas clínico-patológicas más agresivas.

La sobreexpresión de este gen, que se observa frecuentemente en carcinoma in situ, aumenta el potencial invasor de las células cancerosas y parece ser más importante en el inicio de la enfermedad que en su evolución. ⁽³⁷⁾

El cáncer de mama HER2 positivo es una forma agresiva de la enfermedad que, si no se trata, se asocia a peores chances de supervivencia y una progresión más rápida de la enfermedad que el cáncer de mama que no es HER2 positivo. La proteína HER2 envía señales a la célula para que crezca y se divida, por lo tanto, cantidades excesivas de HER2 pueden llevar a un crecimiento celular descontrolado o maligno y al desarrollo de cáncer

Cabe destacar que mientras una célula normal posee 20.000 receptores HER2 en su superficie celular, cada célula cancerígena HER2 positiva tiene alrededor de 2 millones de receptores HER2.

La familia HER está compuesta por cuatro proteínas (HER1, HER2, HER3 y HER4).

El acoplamiento de las proteínas HER (también llamado dimerización: un compuesto formado por dos moléculas) es un paso importante en la activación de las vías de crecimiento y supervivencia de las células cancerígenas. La proteína HER2 es un miembro particularmente importante de la familia HER en el desarrollo del cáncer, ya que a diferencia de otras proteínas HER, está constantemente activa porque siempre se encuentra en una 'conformación' abierta lo que significa que está siempre libre para unirse a otros miembros de la familia HER.⁹

La unión de HER2 con otros miembros de la familia HER puede mandar múltiples señales a la célula para que crezca y se multiplique, lo que puede llevar al

Revisión Bibliográfica

desarrollo de cáncer. La proteína HER2 puede unirse a cualquiera de los miembros de la familia HER; sin embargo, se cree que la unión de HER2 a HER3 es la que tiene el mayor impacto en el crecimiento de la célula cancerígena.

Mientras que la pareja HER2-HER2 activa un conjunto de vías de señalización celular que son importantes para el crecimiento y la supervivencia de la célula, la pareja HER2-HER3 puede activar directamente vías de señalización adicionales, lo que también conduce a la supervivencia celular. ^(38,39)

En el cáncer de mama se utilizan marcadores específicos para predecir la respuesta al tratamiento y clasificar a los pacientes en diferentes grupos según su pronóstico cuando se combinan estos marcadores con la información relacionada con el tamaño tumoral, grado, afectación ganglionar. Los marcadores utilizados con estos fines en las muestras de biopsia son el receptor de estrógenos (RE), el receptor de progesterona (RP) y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2/neu, por sus siglas en inglés). ⁽⁴⁰⁾

Numerosos informes muestran que la proteína de HER-2/neu es un test diferente de los tradicionales marcadores tumorales como el Ca15.3. El marcador tradicional mide la presencia de proteínas de alto peso molecular e indica crecimiento o decrecimiento de la carga tumoral.

No hay evidencia que estas glicoproteínas participen en la conversión de células normales en cancerosas. La oncoproteína HER-2/neu se deriva de un oncogén conocido que está biológicamente relacionado con la conversión de células normales en tumorales. ⁽⁴¹⁾

El desarrollo de una neoplasia está directamente relacionado con mutaciones genéticas sucesivas en las que están involucrados oncogenes celulares. ⁽⁴²⁾ En el caso del cáncer de mama se sabe que el oncogén Her2/neu está amplificado y/o sobre expresado en aproximadamente un 30% de los casos. El conocimiento de la

Revisión Bibliográfica

positividad del mismo tiene un importante valor pronóstico asociándose a una mayor agresividad de la enfermedad. Así mismo dicho gen puede ser un marcador predictivo de respuesta a determinados tratamientos como el trastuzumab (Herceptin®).^(43,44,45)

Un marcador tumoral va a ser realmente útil si las decisiones terapéuticas basadas en sus variaciones mejoraran la sobrevida global, la sobrevida libre de enfermedad, la calidad de vida y los costos del tratamiento. El HER-2/neu cumple con estos requisitos y además: Los niveles séricos de HER-2/neu son indicadores de la agresividad del tumor. El monitoreo de los niveles séricos luego del diagnóstico primario puede ser un indicador temprano de la progresión de la enfermedad.

2.4 Inmunoensayos para detección de Biomarcadores

La detección de cáncer en sus estadios tempranos necesita de ensayos de alta sensibilidad que puedan reconocer marcadores para la carcinogénesis.

Los biomarcadores pueden ser probados de varios especímenes, incluyendo tejidos tumorales y fluidos corporales tales como suero y la orina. Hasta la fecha, la mayoría de los biomarcadores de cáncer identificados para la aplicación clínica son de naturaleza proteica. Las técnicas utilizadas comúnmente para las pruebas de biomarcador de proteína son los inmunoensayos o técnicas inmunoquímicas como son los ELISA y técnicas de inmunohistoquímica (IHC).⁽⁴⁶⁾

Los inmunoensayos o técnicas inmunoquímicas son métodos analíticos basados en la alta especificidad de la interacción antígeno-anticuerpo para la detección y cuantificación de sustancias de interés, a los que se denomina analítos.

Esta metodología, ampliamente utilizada tanto en análisis de rutina como en investigación científica se originó en 1959 con el ensayo inmunológico realizado por Rosalyn Yalow y Salomon Berson], que permitió detectar insulina humana a nivel de picogramos. A partir de entonces los inmunoensayos han representado un

Revisión Bibliográfica

importante avance en el análisis de sustancias de interés en muy diversos campos, encontrando aplicación en el diagnóstico clínico, la industria alimentaria y en el estudio y control del medio ambiente entre otros. ^(47,48,49)

Es el ELISA el método más popular dentro de los inmunoensayos, Su principal ventaja consiste en el corto período de tiempo que lleva su desarrollo, es una técnica de alto rendimiento, sensible cuantitativamente que mide la cantidad de analitos presente en un fluido fisiológico. Es el actual estándar de oro para la detección de marcadores de proteínas de bajo número de copias. Utilizan como marcador una enzima y el espectrofotómetro como sistema de detección devenido lector de microplacas. La ventaja de los ELISA es que puede ser utilizada con fluidos corporales que se recogen de forma no invasiva. Sin embargo, adolece de muchos inconvenientes, tales como la mano de obra intensiva y altamente calificada, y son métodos costosos.

La inmunohistoquímica (IHC) es una técnica que utiliza la tinción de muestras histológicas para detectar un marcador particular, es la técnica de diagnóstico de cáncer más importante en la práctica para predecir los resultados de los pacientes con diferentes grados de enfermedad. Para ello se emplean anticuerpos preparados frente a la proteína que se desea detectar marcados con moléculas fluorescentes. Se aprecia si hubo unión del anticuerpo con el antígeno por la fluorescencia emitida, que se observa bajo microscopio de luz ultravioleta. Este procedimiento (inmunofluorescencia directa) tiene la limitación del marcaje con un fluorocromo.

Para evitar esto, lo que se hace es tratar el tejido o células con antisueros anti antígeno producidos, por ejemplo, en conejo, y secundariamente tratar con antinmunoglobulinas marcadas con un fluorocromo que puede ser de unión covalente, son moléculas orgánicas pequeñas (FITC, biotina) forman una unión covalente con grupos amino libres en los anticuerpos. Como ejemplo tenemos el Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), flicocitrina, rodamina, rojo texas, cianinas.

Revisión Bibliográfica

El más utilizado para marcar proteínas es el FITC. Los fluorocromos de unión no covalente se unen no covalentemente a estructuras dentro de la célula son por ejemplo: Hoechst, DAPI, Naranja de acrimina, yoduro de propidio y otros. ⁽⁵⁰⁾

Las desventajas de este método son que depende de muestras de biopsia que se recogen utilizando técnicas invasivas, Altos costos en reactivos y equipos y debe ser realizado por personal muy especializado Sin embargo, en comparación con ELISA y otras técnicas moleculares que requieren la homogeneización del tejido tumoral, IHC tiene la gran ventaja de permitir la evaluación de la expresión de biomarcadores en relación con las características morfológicas de un tumor.

Tienen en la clínica estos métodos inmunoenzimáticos diversas aplicaciones por ejemplo: actualmente, en el mercado existen varios análisis inmunoenzimáticos cuantitativos en fase sólida para la detección de Troponina (TnIc), los cuales son útiles para detectar el daño miocárdico. Estos inmunoensayos son de tipo "sandwich", entre ellos Stratus II (Dade Diagnostics, Munich, Alemania), Access (Sanofi Diagnostics,) entre otros. En el caso de las pruebas cualitativas de TnIc, se trata de tiras reactivas basadas en un ensayo inmunocromatográfico que permite un análisis rápido de las muestras. Hasta el momento, estas tiras son comercializadas por la firma Spectral Diagnostics, (Toronto, Canadá). ⁽⁵¹⁾

En la urología por ejemplo se ha establecido que la glucoproteína PSA (Prostate Specific Antigen) es un marcador tumoral de diversos tipos de cáncer y especialmente para el cáncer de próstata.

El primer inmunoensayo para PSA, era un ensayo de tipo sándwich ligado a enzimas (ELISA). En los últimos años se ha desarrollado una gran variedad de inmunoensayos diferentes para la detección de PSA, basados en diferentes protocolos de detección, así como otros inmunoensayos basados en Microscopía de Fluorescencia, Espectroscopía por resonancia de plasmones superficiales (SPR) o Espectrometría Raman de superficie mejorada.

Revisión Bibliográfica

Cabe destacar dentro de los inmunoensayos para la detección de PSA, el gran desarrollo que están teniendo los basados en membranas inmunocromatográficas, o inmunoensayos de flujo lateral con detección capacitativa, colorimétrica o electroquímica. ^(52,53)

2.5 Inmunoensayos y cáncer de mama

En el cáncer de mama un aspecto importante lo constituye la determinación de la expresión de HER2 en tejido.

Los métodos más comúnmente utilizados para la determinación de la ampliación del oncogén y de la proteína HER-2/neu son: FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) para DNA, que puede ser fluorescente o cromogénica, la IHC (Immunohistochemistry), La técnica FISH es más difícil de realizar y más costosa que la IHQ. Sin embargo la cuantificación es más precisa y relativamente sencilla de realizar. Actualmente se comercializa El kit de sonda de ADN PathVysion HER-2 (Kit PathVysion) se ha diseñado para detectar la amplificación del gen HER-2/neu mediante la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) en muestras de tejido con cáncer de mama humano. Las dos técnicas presentan limitaciones *in situ* debido sobre todo a su variabilidad.

Por otra parte, al tratarse de métodos que miden el Her2/neu en tejido tumoral, no serían válidos para el seguimiento de la enfermedad una vez extirpado el tumor primario.

Una vez extirpado el tumor, la determinación de Her2/neu tiene una gran utilidad clínica complementaria. La determinación del dominio extracelular (ECD) circulante en suero o sea la expresión de la proteína p185 se realiza mediante Inmunoensayos tipo ELISA ó de Quimioluminiscencia Directa.

Actualmente el método más difundido por su excelente performance es el que emplea la tecnología de Quimioluminiscencia Directa en ADVIA Centaur. ⁽⁵⁴⁾

Revisión Bibliográfica

Algunas de las ventajas reportadas de la quimioluminiscencia en los ensayos incluyen sensibilidad (límites de detección de moles, nanogramos, picogramos) y velocidad (señal generada en unos pocos segundos y en algunos casos estable por varias horas), sin residuos peligrosos, y procedimientos simples. ⁽⁵⁵⁾

Otros de los sistemas de reconocimiento que se emplean en los inmunoensayos (IEE) como sistemas auxiliares, es el complejo avidina- biotina, estreptavidina.

Este sistema se ha convertido en una de las herramientas más importantes para los IEE. Las enzimas más usadas en las técnicas para el marcaje de Acs o más frecuentemente de Acs son la Peroxidasa y la Fosfatasa alcalina (FA) de mucosa intestinal de ternera. Esta última es la favorita por su bajo costo, su fácil conjugación y la amplia variedad de sustratos que posee. ^(56,57)

Este método no está exento de algunos inconvenientes como son la aparición de falsos positivos por la biotina endógena principalmente en tejidos no fijados con formol. Se ha desarrollado otro sistema de detección (EnVision) basado en la utilización de un polímero de alto peso molecular, el dextrano, al que se conjugan covalentemente un gran número de moléculas de enzimas y de anticuerpo secundario. Teóricamente aumenta mucho la sensibilidad del método, permite realizar la tinción en un paso menos que las técnicas tradicionales avidina-biotina y confiere una gran rapidez y simplicidad al método. ⁽⁵⁸⁾

Actualmente la firma comercial DAKO produce diversos kit que se suministran listo para su uso como por ejemplo: EnVision™+ Dual Link System-HRP; EnVision™ G|2 System/AP, Rabbit/Mouse (Permanent Red).

2.6 Actualidad en el diagnóstico de cáncer

El desarrollo de nuevas tecnologías como la nanotecnología y su aplicación en el inmunodiagnóstico ayudan a mejorar el diagnóstico citológico en muchos pacientes, se ha logrado la identificación temprana de células tumorales.

Revisión Bibliográfica

El desarrollo de nanotecnologías como instrumentos para acelerar los avances en la investigación de biomarcadores tiene por objetivo identificar nuevos agentes moleculares predictivos para controlar la progresión del cáncer así como también buscar nuevos agentes diagnósticos de imagen que permitan detectar tempranamente la enfermedad.

Mejorando la prevención y el control de la respuesta al tratamiento. Las nanotecnologías emergentes incluyen a los quantum dots (QDs) y nanopartículas de oro. ^(59,60)

Estudios recientes demuestran que el uso de estas nanopartículas es un blanco perfecto de la imagenología del siglo XXI. Estas poseen una serie de propiedades fisicoquímicas que las hacen ser mejores que los colorantes orgánicos convencionales en el diagnóstico citológico. La ventaja radica en que los QDs son más fotoestables, ingresan con mayor facilidad al interior de la célula, emiten distintas coloraciones con solo variar la longitud de onda, presentan un mayor contraste. También se suma la ventaja de que la estructura del dendrímero en su parte externa permite albergar una gran cantidad de moléculas que son blanco de un sin número de receptores celulares haciéndolo a su vez más selectivo. ^(61,62)

La nanotecnología servirá para identificar a células cancerígenas, y por lo tanto se brindará la posibilidad de dar nuevos y más eficaces tratamientos contra este padecimiento.

Es factible que a corto plazo, la nanotecnología pueda generar terapias oncológicas, por ejemplo, se han realizado investigaciones en las cuales se busca, mediante la utilización de láser, eliminar células cancerosas sin eliminar, ni dañar las células sanas. ^(63,64)

En éstas se ha intentado incorporar nanotubos de carbono, que son cilindros de grafito con propiedades eléctricas inusuales, que al detectar la presencia de células cancerosas y por medio del aumento de la temperatura de los mismos con

Revisión Bibliográfica

la ayuda de un láser, se pueden eliminar las células cancerosas y evitar el daño a las células sanas, como se ha intentado en cáncer de pulmón y mamas, entre otros.

La nanotecnología tiene un potencial muy grande para realizar importantes contribuciones en la prevención, detección, diagnóstico y por supuesto tratamiento del cáncer. ⁽⁶⁵⁾

La nanotecnología puede representar una oportunidad para un país como Cuba, que posee un importante capital humano preparado para enfrentar retos en el campo científico-tecnológico con un enfoque solidario y alto sentido ético. ⁽⁶⁶⁾

En nuestro país el desarrollo de la biotecnología nos ha permitido avanzar en la investigación científica, contar con biomoléculas de producción nacional útiles en la experimentación biomédica, en el diagnóstico del cáncer. ^(67,68,69)

El patrón de incidencia y mortalidad por cáncer en el sexo femenino en Cuba es similar al observado en los países desarrollados. Esta localización tumoral se considera un importante problema de salud en nuestro país. ⁽⁷⁰⁾ Los criterios clínicos, unidos a los medios diagnósticos y a las armas biotecnológicas, juegan un papel importante en el mejoramiento de la calidad de vida del paciente con cáncer y repercuten en los índices de mortalidad por esta enfermedad en nuestro país. ^(71,72,73)

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio experimental, consistió en la obtención de anticuerpos anti HER-2 a partir de la inmunización de aves y mamíferos para utilizarlos como anticuerpos primarios en un Kit diagnóstico. Los esquemas de inmunización, la obtención de los antisueros, evaluación de la respuesta inmune fueron desarrollados en los Laboratorios de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales (LABEX-CIM) mientras que el proveedor del sobrenadante de cultivo del transfectoma fue el Centro de Inmunología Molecular (CIM) y fue allí donde realizamos la evaluación del funcionamiento de los antisueros en el período comprendido de enero 2012 a junio del 2013.

3.1 Antígenos para la inmunización

Para el desarrollo de los esquemas de inmunización anti Her2 se utilizó como antígeno la proteína Her2 pura obtenida a partir del cultivo del transfectoma HEK 293, se descongeló un ampolla en frasco de cultivo de 2.5 cm, en medio DEMEN-F12 al 10% de suero, una vez el frasco estuvo confluyente se pasó para dos frascos de 175 cm en medio DEMEN-F12 al 5%, a los tres días se sembró en Spinner cambiándole el medio DEMEN-F12, por medio CPCHO-PFHMI a una concentración de 3×10^5 células por mL.

A los 10 días se recogió sobrenadante y se purificó por Cromatografía de Inmunoafinidad en una columna que contenía anti Her2 (Anticuerpo Monoclonal humanizado anti HER2. Un anticuerpo monoclonal humanizado IgG1, que reconoce la proteína HER2+) acoplada a una matriz de Sepharose 4B Fast Flow CNBr-activada.

En el esquema de inmunización anti IgY en conejo se utilizó como antígeno IgY de yema de huevo de gallina de la Sigma-Aldrich (USA).

Materiales y Métodos

3.2 Determinación de la presencia de Her2 en las muestras inmunogénicas por el método ELISA.

Al purificado de Her2 obtenido se le determinó reconocimiento específico mediante un sistema ELISA, utilizando los mismos como recubrimiento a una concentración de 10 µg/mL en buffer carbonato 1M a pH 9,6, en una placa ELISA de poliestireno de la firma COSTAR (USA), a razón de 50µL/pozo. Se utilizó como control negativo la molécula Her1 a la misma concentración. Se mantuvo durante 18 horas a una temperatura entre 2 y 8 °C, se dejó atemperar por 10 minutos, se sacudió vigorosamente contra papel absorbente. Luego se añadió anti Her2 terapéutico del CIM (Cuba) (referido anteriormente), a las concentraciones de 1mg/mL, 500 µg/mL y 250 µg/mL, utilizando como reactivo revelador anti IgG humana conjugada con peroxidasa de la Sigma (USA). Se incubó durante 1h a 37°C, se lavó 3 veces. Se aplicó 50 µL/pozo de la solución sustrato (5ml del Tampón Citrato-Fosfato + 1 tableta de OPD (*o*-Phenylenediamine dihydrochloride) de 2mg + 10 µl de H₂O₂) y se dejó a temperatura ambiente, en condiciones de oscuridad, para el tiempo de reacción previamente establecido durante la titulación, que en nuestro caso fue de 10 minutos. La reacción enzimática se detuvo añadiendo 50µL/pozo de solución H₂SO₄ al 10% y se prosiguió a la lectura de la placa. Se leyó la absorbancia a 490nm en un Lector de placa (DIAREADER UV ELx800, DIALAB, Austria). Los datos obtenidos se cargaron hacia un archivo EXCEL donde se terminó el análisis de la data obtenida. ⁽⁶⁹⁾

3.3 Esquema de inmunización

3.3.1. Biomodelos Experimentales

Para la obtención de anti Her2 en aves, fueron utilizadas gallinas ponedoras (White Leghorn de 24 semanas de edad), las gallinas se compraron en Centro de Producción de gallinas ponedoras El Hormiguero, San Luis, Santiago de Cuba, se

Materiales y Métodos

mantuvieron en condiciones convencionales a una temperatura de 28 ± 2 °C; la humedad relativa promedio fue de 65 ± 3 %.

Se ubicó una gallina por jaula con una dimensión de 128 cm. x 65 cm. x 80 cm. Se mantuvieron animales sin inmunizar durante todo el experimento como grupo control.

Para obtener suero hiperinmune anti Her2 y anti IgY, se utilizaron conejos hembras Nueva Zelandia Blanco, de 18 a 20 semanas de edad y entre 2 y 2,5 kg de peso) seleccionados del centro de cría y reproducción comercial (Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, CENPALAB[®], Habana, Cuba).

Los conejos se mantuvieron en condiciones similares a las descritas anteriormente para las gallinas, tomándose muestras de sangre de la vena central de la oreja para la titulación de los Acs en cada uno individualmente, y se promediaron semanalmente los títulos obtenidos.

Tanto gallinas como conejos recibieron una dieta diaria de alimentación consistente en 170 g de alimento especial estéril CM 005 Al y Co para las gallinas y 1400 Al y Co para los conejos (CENPALAB, Habana, Cuba), le fue suministrada agua destilada ad libitum a ambas especies.

El manejo y cuidado se realizó de acuerdo a las normas institucionales establecidas por la Comunidad Económica Europea (1980) y la Norma Oficial Mexicana, NOM, (1996), según la Guía para el cuidado y empleo de animales de laboratorio.

Todos los procedimientos se desempeñaron de acuerdo a la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. ⁽⁷⁴⁾

Materiales y Métodos

3.3.2 Inmunización

Para la obtención de anticuerpos primarios y secundarios los conejos fueron inmunizados por vía subcutánea, con inoculaciones de 150 µg del Ag en diferentes sitios de la región dorsal. Los intervalos de inoculación se realizaron a los 0, 21, 36, 66 días con inmunización de refuerzo a los 87 días.

El inmunógeno se aplicó emulsionado con Adyuvante Completo de Freund (ACF) para la primera inmunización, Adyuvante Incompleto de Freund (AIF) para las posteriores. Las emulsiones se realizaron volumen a volumen (inmunógeno: adyuvante) en un volumen final de 1mL de la emulsión y 1mL de solución 0.15 mol/L NaCl (Boehringer Mannheim, Alemania).⁽⁷⁵⁾ El control consistió en las muestras de sangre que se obtuvieron antes del comienzo de la inmunización.

Las gallinas fueron inmunizadas por vía intramuscular a través de varias regiones del músculo pectoral con inyecciones de 150 µg de la proteína en 0.5mL de SSF y emulsionada con igual volumen de ACF y AIF, los intervalos de inoculación se realizaron a los 0, 15, 36, 66 días con 3 inmunizaciones de refuerzo por mes. Los huevos fueron colectados a partir del primer día post inyección tomándose la mezcla de los huevos puestos por cada gallina en cada semana para su procesamiento y monitoreo posterior de los títulos de anticuerpos.⁽⁷⁶⁾

3.3.3 Obtención de los sueros

En cada grupo experimental, los sueros se extrajeron a partir del sangrado parcial en la vena central de la oreja de cada conejo, antes de iniciar el protocolo de inmunización y durante el desarrollo del esquema de inmunización a los 8,12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 y 40 días para determinar la dinámica de la respuesta de anticuerpos. El sangrado total de los conejos se realizó por sección parcial de la vena yugular externa al finalizar el esquema de inmunización.⁽⁷⁷⁾

Materiales y Métodos

3.3.4 Obtención de los sobrenadantes delipidados de yema de huevos

Preparación de la IgY de yema de huevo por el método de la fracción soluble en agua (WSF).

Los huevos se cosecharon diariamente, marcados con la fecha y el grupo experimental, y se almacenaron a 4°C hasta que fueron procesados.

Se separó la clara de la yema mediante un separador de yemas comercial (Promega. Co. USA) y se lavaron las yemas con abundante agua corriente y agua destilada para limpiarlas de la albúmina que pudiera quedarles adherida, se puncionaron sus membranas y sus contenidos fueron diluidos en 9 volúmenes de agua destilada estéril acidificada con HCL 0.1N hasta que la emulsión alcanzó un pH entre 4.8 y 5.2. ⁽⁷⁸⁾ Este extracto de yema se mantuvo por 24 h a 4°C, luego centrifugado por 25 min a 10,000x g aproximadamente en una centrifuga refrigerada (Medifriger, J.P Selecta SA, Abrera, España). Este sobrenadante de yema de huevo (EYS) obtenido, rico en IgY, se filtró por papel de filtro Whatman No. 1 (Whatman International, Maidstone, UK) y ajustado a pH 7.0 con tampón Tris (1M + 0.15M NaCL; Boehringer, Mannheim, Alemania).

Estos sobrenadantes se ensayaron mediante una prueba de Inmunodifusión doble bidimensional de Ouchterlony para determinar títulos específicos de Acs IgY contra la proteína Her-2 purificada, la cual se utilizó como antígeno en la técnica a una concentración de 0.5 mg/mL.

Para aumentar el nivel de pureza de estos anticuerpos se realizó sucesivas precipitaciones con sales. Primeramente con sulfato de amonio al 33 % y luego con sulfato de sodio al 19 %, seguida cada una de centrifugaciones a 14000xg.

⁽⁷⁸⁾

Materiales y Métodos

3.4 Purificación de los anticuerpos anti Her2 en conejo

Para la obtención del anticuerpo anti Her2 en conejo purificado se utilizó un sistema de Cromatografía líquida de baja presión (Pharmacia, LKB, Uppsala, Sweden), utilizando una matriz de Afinidad con proteína A-Sepharose.

La columna cromatográfica se equilibró con buffer Tris 50 mM, NaCl 1M a pH 8.5, hasta que la matriz de afinidad tomó el pH del buffer de equilibrio. El flujo de trabajo fue de 60 cm/h.

Luego de equilibrada la matriz hasta lograr el pH del buffer, se aplicaron 50 mL del suero hiperinmune filtrado seguido de la aplicación de 2 a 3 volúmenes de columna del Buffer de equilibrio.

Se continuó lavando la matriz con el buffer de equilibrio hasta que el registrador marcó cero de absorbancia, y se procedió a la elución de IgG con Buffer Citrato 0.1M pH 4. Se colectó un volumen de la muestra purificada de 20 mL y luego se regeneró la columna de proteína A con Buffer Citrato 0.1M pH 3.

Se procedió luego a la diálisis del material purificado en Buffer Fosfato Salino pH 7,2 (PBS) para su cambio de pH, durante 24 horas, a una temperatura entre 2-8 °C; con tres cambios de diálisis. ^(79,80)

3.5 Dinámica en el título de anticuerpos y especificidad

La dinámica en los títulos de anticuerpos en los antisueros obtenidos para todos los grupos a diferentes tiempos durante el desarrollo de los esquemas de inmunización, se determinaron mediante la técnica de inmunodifusión doble bidimensional de Ouchterlony (IRD). ^(81,82)

3.6 Técnica de Inmunodifusión doble bidimensional de Ouchterlony

Las placas de vidrio limpias y secas fueron cubiertas con agar (Sigma, USA) al 1 %, en solución salina 0,9 % (Laboratorio Farmacéutico Oriente Santiago de Cuba), pH 7,2 y conservadas con azida sódica (Sigma) al 1%.

Materiales y Métodos

Se le realizaron perforaciones sobre el agar solidificado a temperatura ambiente para conformar los pocillos. Un volumen de 15 μ L del antígeno fue colocado en el pocillo central, y a los pocillos equidistantes que se encuentran alrededor del pocillo central se le agregó el mismo volumen del antisuero puro (15 μ L), así como diluciones dobles progresivas del mismo en SSF y colocados en la dirección de las manecillas del reloj.

Durante 72 horas las placas se mantuvieron en cámara húmeda a temperatura ambiente. El título de anticuerpos se expresó como 2-Log del inverso de la máxima dilución en la que se observó una banda de precipitación. ^(83,84)

3.7. Cromatografía de Inmunoadfinidad para los Acs anti IgY y la molécula Her2

De acuerdo a las instrucciones del fabricante se preparó un gramo de Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno (Pharmacia, LKB, Uppsala, Sweden), ésta rindió 3.5 mL de resina, aproximadamente 10 mg de IgY de la Sigma(USA) y 10 mg de Anti Her2 de la Dako (Dinamarca) respectivamente, la molécula en cuestión, previamente dializada contra tampón de acoplamiento (0.5mol/L NaCl, 0.1mol/L NaHCO₃, pH 8.3) se le adicionó a la Sepharosa tratada, se mantuvo en rotación por 2 horas a temperatura ambiente y se centrifugó a 40 g por 5 min, el precipitado se incubó a 4°C por 16 horas con 10 mL de agente bloqueador (0.2mol/L glicina, pH 8.0) para bloquear los grupos que pudieran permanecer activos en la resina. Esta resina fue introducida en una columna (PD-10) y las proteínas unidas de forma inespecífica se lavaron mediante un procedimiento de cinco lavados sucesivos alternantes consistentes en una etapa de lavado con 5 mL de tampón de acoplamiento, seguido de otro con 5mL de tampón acetato (0.5 mol/L NaCl, 0.1mol/L acetato de amonio, pH 4.0). Después se lavó la columna con 50 mL de PBS y se tomó 25 mL de los sueros hiperinmune, dependiendo del caso, previamente dializado contra PBS se llevó a 50 mL con este mismo tampón fosfato y se descargó en la columna a una velocidad de flujo de 40 cm/h.

Materiales y Métodos

Posteriormente se lavó la columna con 50 mL de PBS y los Acs IgG anti IgY y anti IgG de conejo unidos se eluyeron con un tampón de elusión (0.15mol/L NaCl; 0.2 mol/L glicina, pH 2.2). Para la neutralización inmediata, se colectaron las fracciones eluidas de 2 mL aproximadamente en tubos que contenían 0.5 mL de un tampón (0.1mol/L Tris-HCL, pH 8.0). Al término de la operación, la columna se neutralizó con tampón Tris y se lavó con PBS, para su almacenamiento final se dejó en una preparación de PBS que contenía 0.05% NaN₃ a 4°C. Para su reutilización, la columna se lavó con PBS. ⁽⁸⁵⁾

3.8 Conjugación de anticuerpos con biotina

Se llevó a cabo con los anticuerpos purificados anti IgY en conejo y anti IgG de conejo en carnero de la Sigma-Aldrich (USA).

La biotilación fue realizada según el método de conjugación directa. ⁽⁸⁶⁾ Se tomaron 10 mg del Anticuerpo y se dializó contra buffer fosfato salino pH 7.2-7.4, se pesó 1mg de Biotina ((Biotinamidocaproate N-hydroxysuccinimide ester) (Sigma-Aldrich, USA) y se disolvió en 500 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Se añadió el anticuerpo en un frasco ámbar de 3 mL con una barra magnética y se añadió gota a gota 390 µL de la biotina diluida con agitación suave.

Se dejaron en agitación a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 4 horas. Se equilibró una columna PD-10 G-25 con 25 mL de PBS luego se aplicó el conjugado que quedó en un volumen de aproximadamente 2 mL y se llevó a 2.5 mL en la columna, se dejó pasar a la columna y luego se eluye con 3.5 mL de PBS en frasco ámbar. Posteriormente, se añade Albúmina sérica bovina (Dako, Dinamarca) al 1 % y azida sódica (Sigma, USA) al 0.2%. ^(86,87)

Materiales y Métodos

3.9. Determinación del reconocimiento específico de los anticuerpos primarios y secundarios mediante Citometría de Flujo.

3.9.1. Anticuerpos primarios:

Para el análisis de las muestras se añadió 100 μL con una concentración celular 5×10^6 células de la línea celular SKBR3 en tubo Falcon. Se preparó la cantidad de tubos teniendo en cuenta las cantidades de muestras a analizar, así como las diluciones de los primarios a estudiar (1:50, 1:100, 1:200) y controles necesarios (positivos y negativos). Como control negativo se utilizó Anti Her1 (Sigma-Aldrich) y control positivo Anti Her2 (Dako, Dinamarca) ambos obtenidos en conejo.

A continuación se añadió 20 μL de las diferentes diluciones de los anticuerpos primarios y de los controles y 20 μL de las diferentes diluciones de los conjugados biotinilados según su especificidad o sea anti conejo biotinilado (Dako, Dinamarca) a la diluciones 1:200 y anti IgY biotinilado (Jackson ImmunoResearch, USA) y 20 μL del sistema revelador Streptavidina-FITC (Dako, Dinamarca) a la dilución 1:50. Se agitan los tubos utilizando el Vortex para que la mezcla sea homogénea. Se incubó durante 30 min. a 4 °C, en la oscuridad, agitándola cada 2 ó 3 min en el Vortex. Finalmente se realizaron las lecturas de las muestras en el Citómetro de Flujo marca FACScan de Becton Dickinson y se aplicó el programa CellQuest obteniéndose los resultados finales de la lectura (porcentaje de reconocimiento específico y la intensidad de marcaje).⁽⁸⁸⁾

3.9.2. Anticuerpos secundarios conjugados a biotina.

Para el análisis de las muestras se añadió 100 μL con una concentración celular 5×10^6 células de la línea celular SKBR3 en tubo Falcon.

Se preparó la cantidad de tubos teniendo en cuenta las cantidades de muestras a analizar, así como las diluciones y controles necesarios (positivos y negativos). A

Sistemas basados en anticuerpos aviares y mamíferos para la detección por Inmunohistoquímica del marcador tumoral Her2.

Materiales y Métodos

~~continuación se añadió en tubos diferentes 20 µL de los anticuerpos primarios,~~
para el caso del de gallina 1:100 y 1:50 para el obtenido en conejo y 20 µL de las

Materiales y Métodos

diferentes diluciones de anticuerpos conjugados a biotina (anti IgY o anti IgG de conejo) a las diluciones 1:20, 1:50, 1:100 y 1:200 según su especificidad y 20 µL del sistema revelador Streptavidina/FITC (Sigma-Aldrich, USA) del conjugado de referencia. Se agitan los tubos utilizando el Vortex para que la mezcla sea homogénea. Se incuba durante 30 min. a 4°C, en la oscuridad, agitándola cada 2 ó 3 min en el Vortex. Finalmente se realizaron las lecturas de las muestras en el Citómetro de Flujo marca FACScan de Becton Dickinson y se aplicó el programa CellQuest obteniéndose los resultados finales de la lectura (porcentaje de reconocimiento específico y la intensidad de marcaje).

Como control positivo tomamos el siguiente sistema: Células SKBR3, Anti Her2 en conejo (1:100), Anti IgG de conejo biotinilado (Jackson ImmunoResearch, país) a la dilución 1:200 y como revelador Streptvid/FITC (Dako, Dinamarca) a la dilución 1:50.

Como controles negativos en el ensayo tomamos las células solas, las células con cada uno de los conjugados por separado, así como con el sistema utilizado como agente revelador. ⁽⁸⁹⁾

3.10. Caracterización de los dos sistemas (anti Her2 en conejo- anti conejo biotinilado y anti Her2 en pollo -anti pollo biotinilado) mediante inmunohistoquímica en tejido.

La caracterización fue realizada a partir de muestras en láminas con adenocarcinoma de mama provenientes del servicio de Anatomía Patologica del Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR).

Para desparafinar el tejido fijado, se colocaron las láminas en una gradilla y se incubaron en una estufa 30 minutos a 60°.

Materiales y Métodos

Posteriormente fueron sumergidas en tres vasos de xilol durante 15, 10 y 5 minutos respectivamente y por tres vasos en escala descendiente de etanol (100%, 90% y 70%) durante 5 min cada vez.

Las láminas fueron lavadas con agua destilada por 10 min y se colocaron en una solución reanimadora (epitope retrieval solution) previamente calentada, durante 20 min a 90°C. Cuando se enfriaron fueron lavadas con PBS durante un tiempo de 5-10 minutos. Se eliminó el exceso de solución y fueron circulados los tejidos con lápiz hidrofóbico.

Se bloqueó la peroxidasa endógena con Peroxidase Block durante un tiempo de 5-10 min. Después de un lavado con PBS y un correcto secado alrededor del tejido cuidando que este se mantuviera húmedo.

Las muestras se incubaron durante 30 minutos en cámara húmeda con el anticuerpo primario.

Luego de 5 lavados los cortes se secaron y se incubaron durante 30 minutos en cámara húmeda con el anticuerpo secundario biotinilado, según su especificidad. Se aplicó el complejo streptavidina-FITC y se le añadió a las láminas una solución reveladora de Diaminobencidina (DAB) entre 5-8 min todo el tiempo bajo vigilancia microscópica.

Se lavaron las láminas con PBS y para obtener contraste se añadió Hematoxilina de Mayer por 1 minuto. Hasta que se azulearon los núcleos se introdujeron las láminas en solución acuosa sobresaturada de Carbonato de Litio.

Se realizó un lavado con PBS y una deshidratación con alcohol ascendentes (70%, 90% y 100%), para el aclarado se utilizó el xilol por el cual se pasó pasando la gradilla por tres vasos con este solvente y se montó con Medio de montaje permanente (Bálsamo de Canadá).

Materiales y Métodos

La visualización y captura de las imágenes se realizó en un microscopio óptico (Olympus BX51, Japón) con cámara acoplada de la misma marca. ^(89,90)

3.11. Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados de este trabajo se utilizó un ANOVA en bloques al azar (diferencias entre los protocolos de inmunización). La prueba de las medias móviles para analizar los títulos de Acs en el tiempo y para la correlación con los dos conjugados obtenidos.

Cálculo de estadígrafos simples para analizar las diferencias en los ensayos ELISA se utilizó el Programa Profesional Estadístico EXCEL (Microsoft Corporation).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados y Discusión

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para los productos de la Biotecnología llamada tradicional hay un gran conocimiento tecnológico y de las propiedades básicas de las moléculas a purificar tanto como del entorno en que se encuentran luego de la etapa de producción. No ocurre lo mismo con los productos de última generación ya que, por las necesidades comerciales para aprovechar la baja competencia, el elevado precio, y dada la baja escala actual de producción, la estrategia es llegar rápido con el producto al mercado con la tecnología que se posea (por lo general la desarrollada a escala de laboratorio). Esta estrategia posibilita un buen posicionamiento en el mercado que permite, posteriormente, el desarrollo de nuevas tecnologías de purificación y cambio de escala. Las estrategias de diseño de procesos de purificación dependen en primera instancia de las propiedades físicas y químicas básicas del principio activo y características del producto final, bien conocidas para las Inmunoglobulinas

El desarrollo de métodos y técnicas para la purificación de proteínas ha sido un pre requisito esencial para muchos de los avances de la biotecnología. Específicamente, la purificación de anticuerpos monoclonales ha sido una herramienta de obtención de diagnosticadores y muchos productos biotecnológicos de uso biofarmacéuticos en general. ⁽⁸⁰⁾

4.1. Purificación de antígeno

La materia prima utilizada para la obtención del Her2 purificado fue sobrenadante de cultivo, el purificado obtenido promedió un valor de concentración de 1.095 mg/mL, con un volumen de 2.9 mL. La purificación por interacción específica con los ligandos de la matriz constituyó el método que permitió la obtención del producto en un solo paso cromatográfico, como se puede observar en la Figura 1.

Resultados y Discusión

El cromatograma obtenido en la purificación de Her2 se corresponde a una técnica de Cromatografía de Inmunoafinidad basada en una matriz de Sefarosa 4B a la que se le inmovilizó un anticuerpo específico contra la proteína Her2.

La separación de las diferentes moléculas presentes en el sobrenadante de cultivo de partida mediante esta cromatografía, coincide con lo descrito por los laboratorios de Separación de Proteínas de la firma Pharmacia ⁽⁹¹⁾, el pico 1 corresponde a todos los contaminantes presentes en la muestra, ya que en electroforesis realizada a esta fracción no apareció banda en la zona de los 185 KDa.

El pico 2 representa la proteína Her2 purificada, la cual se caracterizó su correspondencia mediante SDS-PAGE. Este perfil cromatográfico obtenido es característico para este tipo de cromatografía. La misma se basa en la interacción bioespecífica antígeno-anticuerpo, es altamente selectiva por la sustancia de interés y, por lo tanto, es el paso clave de toda la etapa de purificación. Varios autores sugieren la cromatografía de inmunoafinidad por la alta eficiencia mostrada en varias investigaciones. ^(92,93,94)

El proceso empleado para la purificación de la molécula Her2 fue eficaz, estando acorde con el método cromatográfico empleado, que permite la captura de la molécula por los anticuerpos específicos inmovilizados a la matriz, recuperando gran parte de la molécula de interés debido a la alta selectividad de la misma.

Resultados y Discusión

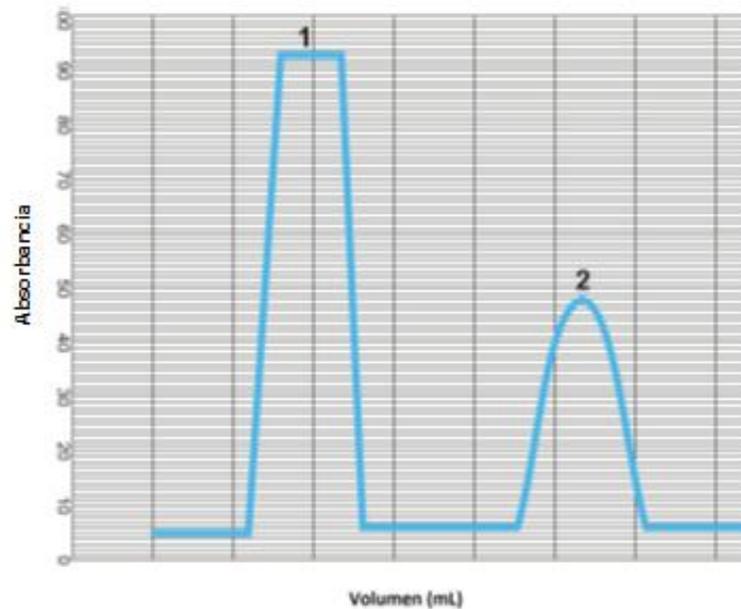


Fig. 1. Perfil cromatográfico obtenido en la purificación de Her2. (1) Moléculas no enlazadas a la matriz, (2) Molécula de Her2 eluída con buffer glicina 0.2 moles/L, cloruro de sodio 0.15 moles/L, pH 2.2.

4.2. Electroforesis de la molécula Her2 purificada.

Resulta de vital importancia la aplicación de métodos que comprueben la presencia en la muestra biológica de un solo tipo de molécula. La electroforesis de proteínas, cuyo fundamento es la separación de las moléculas según su carga eléctrica, nos permite aislar, separar y caracterizar moléculas según su peso molecular. ⁽⁹⁵⁾

La técnica SDS-PAGE es la electroforesis de proteínas más ampliamente usada. Su nombre significa la electroforesis en geles de poliacrilamida que se realiza en presencia de SDS (SDS-polyacrilamide gel electrophoresis). Fue descrito por Laemmli. ⁽⁹⁶⁾

La Figura 2 nos muestra una banda en el carril derecho, que al compararse con el patrón de peso molecular (carril izquierdo) muestra la presencia de una proteína

Resultados y Discusión

que migra sobre los 105 KDa, la cual se corresponde a la talla del elemento del dominio extracelular de la proteína Her2. La cual constituye una glicoproteína transmembrana con actividad tirosina quinasa, codificada por un proto-oncogén localizado en el cromosoma 17. (69,97)

Estos elementos conjuntamente con los resultados que muestra la tabla 3 donde como se observan las DO obtenidas para los tres lotes obtenidos en el proceso de purificación constituyen valores en un orden de magnitud (entre 0.8 y 0.9 para 1 mg de la proteína de recubrimiento) que demuestran un alto nivel de reconocimiento del anticuerpo comercial utilizado por la molécula en estudio, elemento que nos permitieron aceptar la conclusión que nos encontrábamos en presencia de este fragmento del Her2 y fue el material que utilizamos para nuestros esquemas de inmunización.

En la tabla referida se observa que están por encima de 3 veces la desviación del blanco y es proporcional a medida que disminuye la concentración del Ac disminuyen los valores de absorbancia.

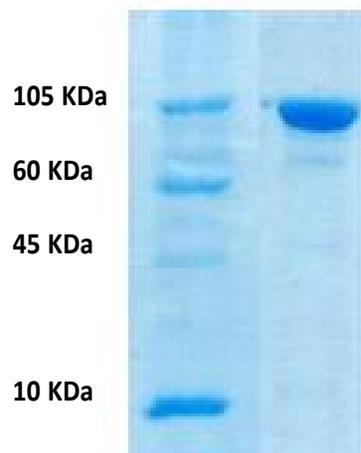


Fig.2. Electroforesis no reducida al 12.5 %. Izquierda Patrón de peso molecular de la firma BIO-RAD (10-250 KDa), a la derecha banda obtenida a los 105

Resultados y Discusión

KDa perteneciente a la molécula de Her2 obtenida en la purificación por cromatografía de inmunoafinidad. Véase la banda que se corresponde con el PM de 105 KDa reportado para Her2. Se aplicaron 15 µL de ambas muestras

4. 3. Valores de densidad óptica (DO) obtenidas por la prueba ELISA para evaluar la calidad de reconocimiento de los tres lotes de Ag purificado

	HER-2/1		HER2/2		HER-2/3		HER-1	
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0,090	0,092	0,085	0,084	0,081	0,083	0,081	0,084
B	0,089	0,095	0,095	0,087	0,080	0,079	0,079	0,082
C	0,826	0,820	0,868	0,826	0,783	0,708	0,082	0,087
D	0,837	0,847	0,864	0,849	0,790	0,798	0,087	0,085
E	0,530	0,535	0,560	0,559	0,431	0,433	0,087	0,082
F	0,530	0,531	0,542	0,561	0,425	0,423	0,086	0,084
G	0,210	0,213	0,223	0,221	0,199	0,206	0,087	0,087
H	0,215	0,216	0,226	0,219	0,210	0,213	0,080	0,088

Dónde:

Las filas A y B: constituyen muestras blanco (albúmina sérica bovina al 2%)

Las filas C y D: 1 000 µg/mL del Ac, las filas E y F: 500 µg/mL del Ac, las filas G y H: 250 µg/mL del Ac.

Resultados y Discusión

4. 4. Dinámica en la producción de Anticuerpos específicos obtenidos contra el antígeno Her2.

4.4.1. Niveles de anticuerpos anti Her2 en pollo.

La obtención de IgY a partir de yema de huevo de gallina, resulta ser un método alternativo en las ciencias biomédicas por los bajos costos, ya que se reduce el sufrimiento del animal implicado, pues no se requiere la colección de sangre, sino que se obtiene una gran cantidad de anticuerpos policlonales específicos a partir de la yema de huevo. ⁽⁹⁸⁾

La Figura 3 muestra la dinámica de producción de anticuerpos en el esquema de inmunización llevado a cabo en las gallinas inmunizadas con la proteína Her2 purificada. Como se demuestra en los resultados no se aprecian diferencias significativas entre las gallinas que recibieron el antígeno, contrario a la comparación con relación al grupo control que difirieron significativamente.

Diferentes métodos de inmunización aplicados en gallinas son reportados en la literatura; intramuscular, ⁽⁷⁸⁾ intrabursal subcutáneo ⁽⁹⁹⁾ y oral, como también se ha reportado que las aves sufren inflamaciones y desarrollan granulomas en las áreas de inoculación.

La vía de inoculación aplicada a las aves en este trabajo (I.M.) no causó ningún malestar, ni proceso inflamatorio, debido a que se respetó un volumen por dosis moderadamente bajo para la especie, resultado que fue congruente con lo reportado por algunos autores en la Obtención de Anticuerpos Policlonales IgY antiparvovirus canino. ⁽¹⁰⁰⁾

La reactividad de los anticuerpos IgY específicos para el antígeno utilizado fue monitoreada por la técnica de inmunodifusión doble bidimensional de Ouchterlony (IRD) Los datos obtenidos mostraron que para animales inmunizados con la

Resultados y Discusión

proteína Her2 como antígeno, la producción de anticuerpos IgY específica era detectable entre los 21 y 30 días de la inmunización.

Resultado similar obtenido por otros autores quienes probaron la reactividad y maduración de los anticuerpo y la avidéz mostrada mediante la técnica de ELISA para el antígeno CA 15-3 utilizado en la inmunización, en este la producción de anticuerpos IgY específica era detectable desde la cuarta semana de inmunización, y su nivel se mantuvo estable durante todo el periodo de inmunización.⁽¹⁰¹⁾

Similar resultado obtuvimos en nuestra investigación donde se observa un incremento en la producción de anticuerpos, observándose un pico a los 90 días de trascurrida la primera inmunización.

En otros experimentos de inmunización llevados a cabo en gallinas realizados con el antígeno SARSCoV NP controlada por un ELISA indirecto y muestra una respuesta primaria caracterizada por un ligero incremento en su actividad similar a lo que ocurrió en nuestro estudio y luego de una inyección de refuerzo, se puede observar una rápida respuesta secundaria que se muestra con alta especificidad SARSCoV NP.⁽¹⁰²⁾

En resultados reportados por otros autores se lograron niveles razonables de anticuerpos al inmunizar gallinas con dosis de 100 µg de IgG humana.⁽¹⁰³⁾

El análisis en conjunto de estos resultados obtenidos hasta hoy en la inmunización de gallinas no concuerda con lo planteado por otros autores^(101,102,103) que han encontrado en gallinas sometidas a esquemas de inmunización una cinética en los niveles de anticuerpos que con más frecuencia suele ser un incremento transiente posterior a la primera inmunización y una segunda fase posterior a la inmunización de refuerzo que se caracteriza por un incremento inicial en el título de anticuerpos a los 10 días aproximadamente seguido de una meseta en los 10 días posteriores y acto seguido un descenso de nuevo, en nuestro caso como

Resultados y Discusión

tendencia obtuvimos el aumento de los niveles de producción de Acs al día 28 y la meseta se alcanzó a los 90 días de iniciado el esquema de inmunización en 3 de las 5 gallinas inmunizadas. El descenso en el título fue después de los 120 días en este experimento.

El uso de gallinas se puede tomar como una alternativa interesante en la producción de anticuerpos policlonales por los bajos costos y porque evita en parte las manipulaciones invasivas y logra así una mejora en el bienestar animal, ya que se obtiene una gran cantidad de anticuerpos policlonales específicos a partir de la yema de huevo. Esta metodología está siendo muy estudiada y utilizada, no sólo en pruebas diagnósticas sino también como medida terapéutica y profiláctica.⁽⁷⁶⁾

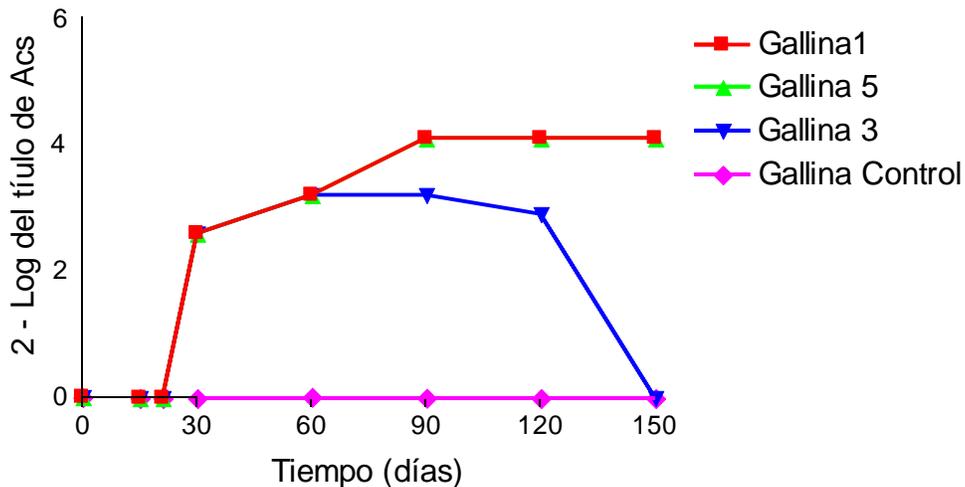


Fig.3. Dinámica en el tiempo de la producción de anticuerpos en las gallinas inmunizadas con la proteína Her2 purificada. Los números que aparecen en el eje de ordenadas se corresponden con 2-log de los títulos de anticuerpos alcanzados (dilución de los sobrenadantes delipídados de yemas de huevos ricos en IgY específica para el HER2) a través de la técnica de Inmunodifusión doble

Resultados y Discusión

bidimensional de Ouchterlony utilizando como antígeno de la prueba 0.5 mg de la proteína Her2 purificada en nuestro trabajo.

4.4.2. Niveles de anticuerpos anti Her2 en conejo

La dinámica de producción de anti Her2 en conejo se muestra en la Figura 4. Los resultados muestran un comportamiento clásico, en nuestro caso se inmunizaron 3 animales, se representa 1 solo conejo ya que no hay diferencias entre los valores obtenidos para los conejos 1,2 y 3 , alcanzando valores máximos entre los días 40 y 70 mientras que entre estos y el conejo control si hay diferencia significativa.

Este experimento demuestra que para los conejos las dosis inmunogénicas utilizadas permiten obtener respuestas de anticuerpos que corroboran las recomendaciones de muchos autores.

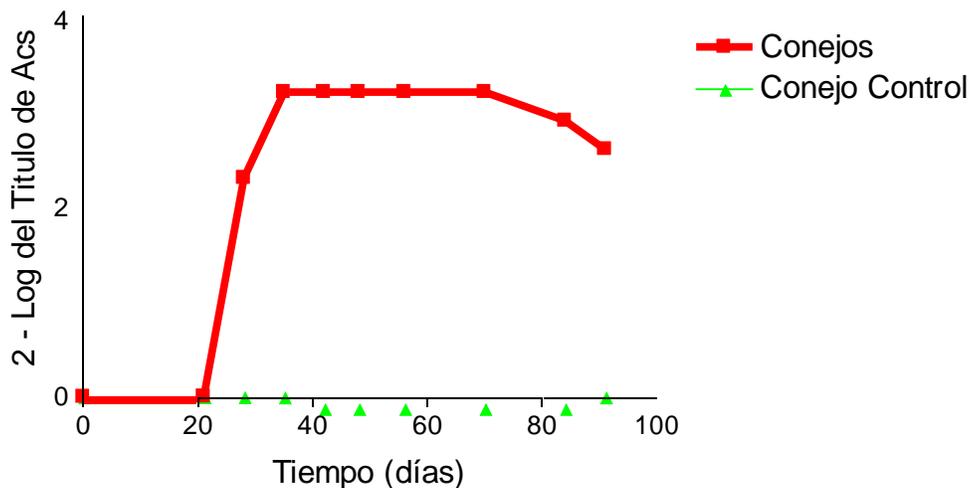


Fig.4. Detección de la producción de anticuerpos en el tiempo en los sueros hiperinmunes de conejos inmunizados con la proteína Her2. En el eje de las ordenadas se corresponden con 2-log de los títulos de anticuerpos obtenidos

Resultados y Discusión

mediante la técnica de Inmunodifusión doble bidimensional de Ouchterlony enfrentados a 0.5 mg de la proteína Her2 utilizada como antígeno.

4.4.3. Comparación de la dinámica de los títulos de anticuerpos específicos anti Her2 entre gallina y conejo

El haber desarrollado en este estudio esquemas de inmunización en paralelo con Her 2 manteniendo las mismas condiciones nos permite hacer una comparación bastante fiel del comportamiento de ambas especies en lo que a respuesta de anticuerpos se refiere.

Para la discusión de este aspecto, es necesario primeramente repasar algunos datos obtenidos de la literatura que se han detenido a revisar estas comparaciones.

En estudios reportados se compararon el desarrollo en los títulos de anticuerpos en conejos y gallinas inmunizados con inmunógenos que se obtuvieron de una fuente comercial (IgG de ratón pura, grado técnico de Sigma, (USA.)

Con los resultados de la dinámica de producción de anticuerpos obtenida en este trabajo se puede demostrar que dosis entre 0.1 – 0.5 mg de este antígeno soluble (IgG de ratón) se incluyen dentro del concepto de ventana de inmunogenicidad para ambos modelos animales (gallina y conejo) y tipo de antígeno todo esto puede afirmarse por la demostración de una respuesta inmune humoral activa por el antígeno dado. ^(103,104)

Este experimento demostró que los conejos brindan mejores títulos de Acs utilizando las mismas dosis de inmunógeno que en gallina y sometidos al mismo esquema en este caso, pero el solo hecho de concentraciones mayores no es razón suficiente para considerar al conejo como el animal de preferencia para los fines que se propusieron en el trabajo, pues además de que se pueden obtener

Resultados y Discusión

mejores resultados en las respuestas de anticuerpos optimizando los esquemas de inmunización en gallinas según recomendaciones. ^(103,105,106)

Otros reportes encontraron que después de la inmunización con EPF (Factor Precoz de Preñez) La obtención de anticuerpos policlonales anti-EPF resultó ser efectiva utilizando conejos y gallinas.

El uso de gallinas se puede tomar como una alternativa interesante en la producción de anticuerpos policlonales por los bajos costos y porque evita en parte las manipulaciones invasivas y logra así una mejora en el bienestar animal, ya que se obtiene una gran cantidad de anticuerpos policlonales específicos a partir de la yema de huevo.

En el caso de los conejos, los anticuerpos obtenidos si bien presentaron una mayor especificidad su rendimiento fue significativamente menor. De la investigación se concluye que para la obtención de anticuerpos anti-EPF, utilizados posteriormente para la detección del EPF a partir de suero de cerdas, el péptido sintético induce la producción de anticuerpos más específicos cuando son desarrollados en conejos.

También se podría concluir que la utilización de la banda de 29 KDa proveniente del gel de poliacrilamida como inmunógeno no es adecuada ya que, si bien produce anticuerpos capaces de detectar la proteína de interés, éstos son de baja especificidad. ⁽⁷⁶⁾

En nuestro estudio, como muestran las Fig. 3 y 4 se pueden concluir que aunque de manera general los anticuerpos fueron logrados de manera similar para ambos modelos animales, mayores títulos de anticuerpos contra la proteína Her 2 se obtiene con el uso de la gallina (en nuestro caso la 1) como modelo animal, lo que

Sistemas basados en anticuerpos aviares y mamíferos para la detección por Inmunohistoquímica del marcador tumoral Her2.

Resultados y Discusión

unido a todas las ventajas descritas anteriormente que estas ofrecen nos corrobora la utilidad de nuestra elección.

Resultados y Discusión

4.4.4 Purificación de los Anticuerpos primarios anti Her 2

Las figuras 5 y 6 nos muestran los resultados de los purificados obtenidos a partir de la materia prima hiperinmune para ambos anticuerpos primarios.

Como se observa en la Fig. 5 se lograron purificados con alto nivel de pureza para el anticuerpo primario de origen mamífero, esto se corresponde con otros reportes donde utilizan este método de purificación por cromatografía de afinidad para obtener anticuerpos específicos a partir de suero de conejos machos albinos Nueva Zelanda inmunizados con el veneno de *B. atrox*.⁽¹⁰⁷⁾

Otros métodos para la obtención, purificación y caracterización se reportan en la bibliografía en la obtención de IgG policlonal de conejo anti-Lipoproteína humana con un alto grado de pureza. La biomolécula purificada mostró el grado de pureza necesario para los fines en que será utilizada.⁽¹⁰⁸⁾

De la misma manera la figura 6 nos muestra los altos niveles de pureza de IgY que se obtienen al someter los preparados delipídados de yema de huevo a diluciones en volúmenes de agua destilada estéril acidificada que permitieron su uso como anticuerpos primarios en nuestro trabajo.⁽¹⁰⁹⁾ Este procedimiento ya ha sido reportado por otros autores.^(110,111)

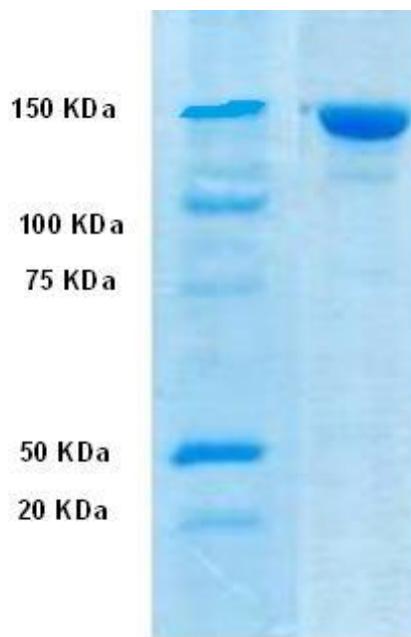
Recientemente, se han desarrollado nuevos métodos que emplean simples diluciones en agua destilada del contenido de la yema bajo condiciones ligeramente ácidas junto a posteriores pasos de purificación que envuelven precipitaciones salinas, alcohólicas o con polietilenglicol y ultrafiltraciones, seguidas de diversos tipos de cromatografía, con rendimientos de IgY que oscilan entre 4 y 9 mg/mL de inmunoglobulinas específicas con pureza del 89 al 94 %.⁽¹¹²⁾

Resultados y Discusión

Algunos autores plantean que el mejor método de delipidación y extracción de IgY requiere dilución con agua, acidificación del extracto y precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60%, recuperándose 43,35 mg de proteína/yema. ⁽¹¹³⁾

Hay autores que reportan rendimientos de IgY total en los sobrenadantes de yema de huevo de alrededor de 100 mg, algunos reportan rendimientos de IgY por mL de yema entre 2 y 5 mg después del proceso de purificación, en el que obtienen entre un 75 y un 90 % de pureza. Otros como demuestran que se pueden obtener alrededor de 100 mg de IgY total en los sobrenadantes, y los purificados después de tres pasos de precipitación con sales de amonio y sodio los cuales rinden las inmunoglobulinas con más de un 90 % de pureza y a su vez, brindan recobrados en el orden de 2 mg por mL de yema. ⁽¹¹⁴⁾

Resultados similares fueron logrados por nuestro trabajo lo que demuestra la utilidad del mismo para el logro de preparados de anticuerpos útiles para diversos ensayos como el realizado en nuestra investigación.



Resultados y Discusión

Fig.5. Electroforesis no reducida al 12.5 %, correspondiente a la purificación de los sueros hiperinmunes de conejo. Izquierda Patrón de peso molecular de la firma BIO-RAD (20-150 KDa), a la derecha banda obtenida a los 150 KDa perteneciente a la IgG de conejo purificada. Véase la correspondencia entre el patrón y el preparado policlonal obtenido en nuestro trabajo. Se aplicaron 15 μ L de ambas muestras.

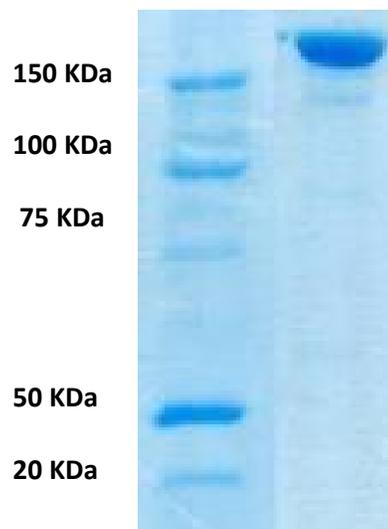


Fig.6. Electroforesis no reducida al 12.5 %, de los purificados de IgY obtenidos a partir del método de la fracción soluble en agua (WSF). Izquierda Patrón de peso molecular de la firma BIO-RAD (10-250 KDa), a la derecha IgY de pollo purificada anti Her2. Véase que se corresponde con la IgY de pollo pura a nivel de un PM de 180 KDa. Se aplicaron 15 μ L de ambas muestras.

Resultados y Discusión

4.5. Dinámica en la producción de Acs secundario anti pollo.

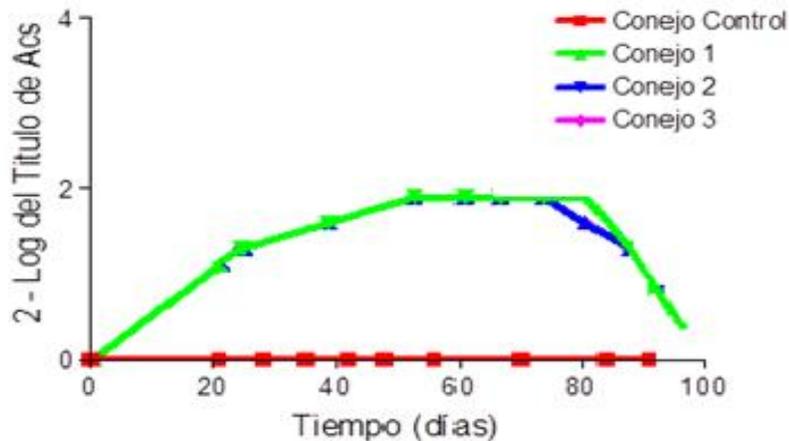


Fig. 7. Detección de la producción de anticuerpos en el tiempo en los sueros hiperinmunes de conejos inmunizados con la proteína IgY. En el eje de las ordenadas se representan 2-log de los títulos de anticuerpos que se corresponden con las diluciones realizadas a los sueros enfrentados a 0.5 mg de la proteína IgY utilizada como antígeno en la técnica de Inmunodifusión doble bidimensional de Ouchterlony.

Se pudo demostrar que los 3 conejos desarrollaron una respuesta inmune clásica, caracterizada por una fuerte respuesta a la segunda inmunización, se logró un título estable por un período de 21 días para los conejos 2 y 3, mientras para el conejo 1 fue de 28 días.

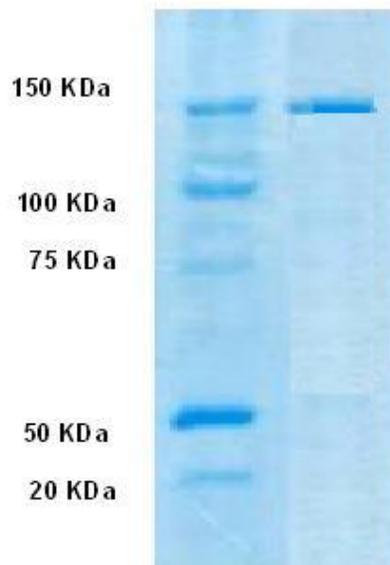
Estos datos corroboran lo obtenido en nuestro laboratorio pues en experimentos anteriores se ha producido este reactivo usando otros modelos mamíferos (ratas, cobayos carneros) además de los conejos.

Resultados y Discusión

4.6. Purificación de los Anticuerpos secundarios anti IgY

El cromatograma arrojó el perfil característico de elusión para estos casos ²¹⁻²³, donde en un primer pico se eluyó con el buffer de equilibrio (PBS pH 7,4) y se corresponde precisamente con la IgG no específica y un segundo pico que se obtiene con el buffer de elusión (Glicina 0,2 mol/L; NaCL 0,15 mol/L) que se corresponde con la IgG de conejo específica anti IgY.

Como se observa en la Fig. 8, la molécula purificada corresponde a la IgG de mamífero, ya que aparece banda única en la zona de los 150 KDa, véase la correspondencia entre el patrón y el preparado policlonal obtenido en nuestro trabajo. La presencia de banda única no solo corrobora la pureza del purificado, sino también que el procedimiento de purificación fue adecuado, al conservarse la integridad de la molécula purificada.



Resultados y Discusión

Fig.8. Electroforesis no reducida al 12.5 %, de los purificados de anti IgY obtenidos por Inmunofinidad. Izquierda Patrón de peso molecular de la firma BIO-RAD (20-150 KDa), a la derecha IgG de conejo purificada anti IgY. Se aplicaron 15 μ L de ambas muestras.

4.7. Reconocimiento de los anticuerpos primarios Anti-Her2 mediante Citometría de flujo.

En el anexo I se muestran los resultados obtenidos del porcentaje de reconocimiento y la intensidad media de fluorescencia de todos los sistemas ensayados. Como se puede observar los controles negativos, poseen valores de fluorescencia por debajo de 20 y la capacidad de reconocimiento de ellos están por debajo de 30 %, que varían significativamente con respecto al % de reconocimiento de todos los sistemas ensayados en nuestro trabajo, básicamente en el sistema donde se utiliza la IgY, que su valor de reconocimiento está por encima del 99 % y valores de intensidad media de fluorescencia de 232.3 para la dilución óptima.

La comparación entre los dos Ac primarios anti Her2, teniendo que cuenta el porcentaje de reconocimiento, aparece graficado en la figura 9, donde se puede ver que para la dilución de Ac de 1:50, existe poca variación de este parámetro, mientras que para las diluciones 1:100 y 1:200, la variación es significativa, mayor en ambos casos para los Ac obtenidos en pollos.

En la figura 10, aparece la comparación de los anticuerpos anti Her2 teniendo en cuenta la intensidad media de fluorescencia, Los valores obtenidos con los Ac de pollo son superiores a los obtenidos con los Ac de conejo, en todos casos. En el caso de los Ac de conejo este parámetro disminuye a medida que aumenta la dilución, mientras que en los de pollo este parámetro tiene su valor máximo en la dilución 1:100, que es la dilución óptima considerando solamente este parámetro.

Resultados y Discusión

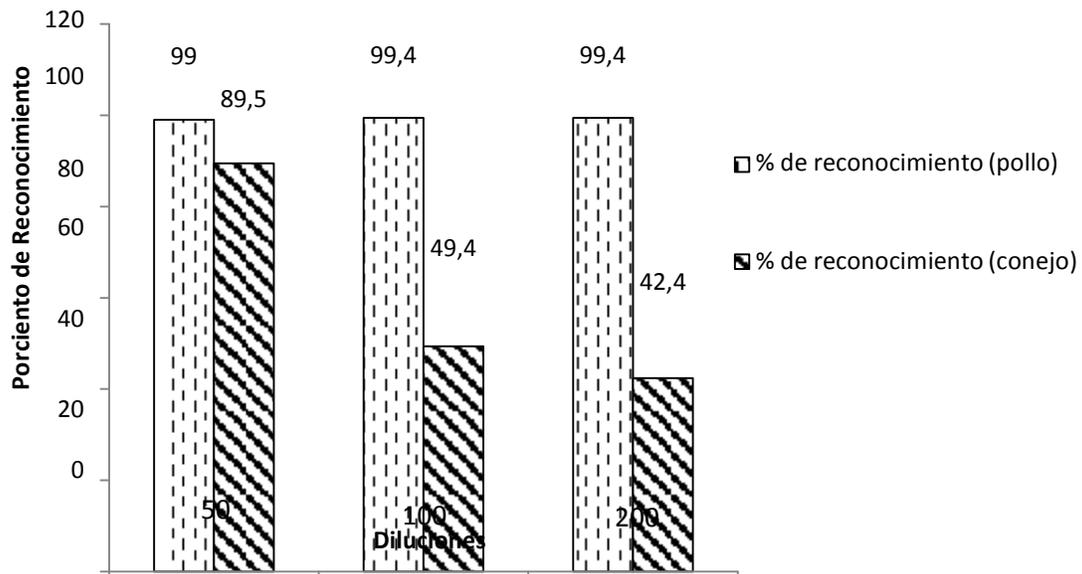


Fig. 9. Porcentaje de reconocimiento de los Ac primarios (Anti Her2) mediante Citometría de Flujo

Resultados y Discusión

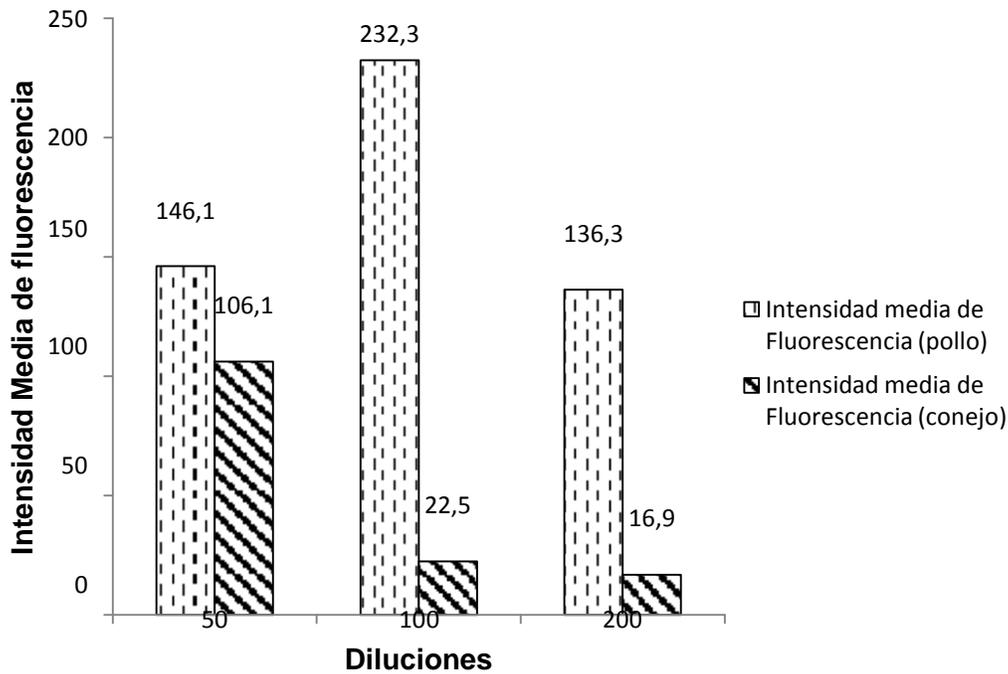


Fig. 10. Intensidad Media de Fluorescencia (Anti Her2) mediante Citometría de Flujo

Los valores más elevados corresponden a los de los anticuerpos anti Her2 obtenidos en gallina, tanto para los % de reconocimiento como para los valores de intensidad de fluorescencia, lo que puede deberse a la alta afinidad de estos anticuerpos y a la mayor concentración de los mismos.

Se puede apreciar que la dilución óptima para el caso del anti Her en gallina es 1:100, mientras que en conejo es 1:50. Esto nos corrobora que los purificados de gallina tienen mayor concentración de anticuerpos anti Her2 que los obtenidos en conejo y que su especificidad es buena.

Resultados y Discusión

4.8. Reconocimiento de los anticuerpos secundarios biotinilados.

En el anexo II se muestra la tabla con los resultados obtenidos de la Citometría de Flujo para los sistemas evaluados, así como con el patrón Dako utilizado, soportando la posibilidad de utilizar dichos conjugados para este fin y su posterior evaluación en la técnica de IHQ.

En el sistema comercial de referencia se obtuvo un % de reconocimiento del 99.4 % y una intensidad de 416, mientras con el sistema desarrollado en aves pudimos obtener a la dilución de 1: 200 del anticuerpo anti IgY un % de reconocimiento de 99.8 % y una intensidad de fluorescencia de 381.5, como se puede apreciar no hubo diferencias significativas en estos resultados que si difieren de forma significativa de los obtenidos con el sistema de mamífero donde se obtuvo para la misma dilución un % de reconocimiento de 81.1 % y una intensidad de marcaje del 31.2 %.

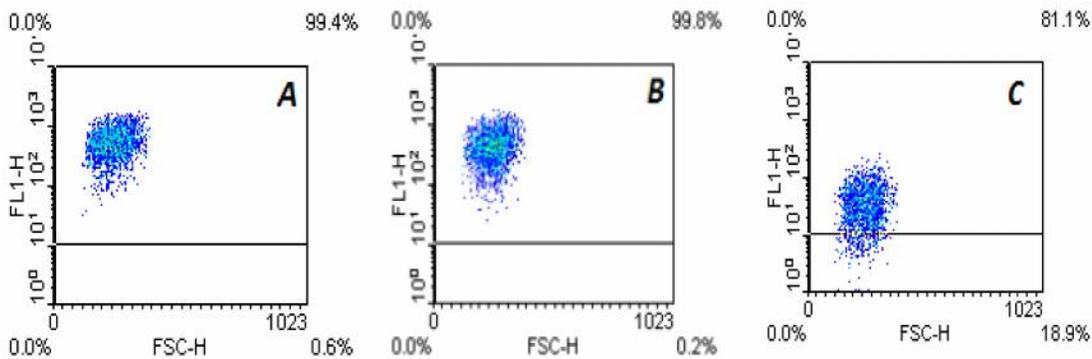


Fig. 11. Imágenes de los dot plot arrojados por el análisis por Citometría de Flujo.

- A. Control positivo (Anti Her2 en conejo (Dako), anti conejo en carnero (Dako)-biotina, Streptavidina/FITC.
- B. Sistema anti Her2 en gallina, anti IgY en conejo-biotina, Streptavidina/FITC

Resultados y Discusión

C. Sistema anti Her2 en conejo, anti conejo en carnero (Dako)-biotina, Streptavidina/FITC.

Los resultados que muestran las imágenes arrojadas por los dot plots obtenidos con los diferentes sistemas de detección ensayados son muestra elocuente de la especificidad obtenida con el uso en el sistema de los anticuerpos primarios de pollo (IgY), véase la correspondencia entre las nubes de puntos obtenidas con el control, corroborando el reconocimiento específico hacia la población celular a donde van dirigidos, no ocurriendo así en el caso del sistema que lleva anticuerpos primario de mamíferos.

4.9. Evaluación de los sistemas de detección por Inmunohistoquímica en tejido

La inmunohistoquímica (IHC) es uno de los métodos más comúnmente empleados para determinar el estatus del HER2/neu en tejido fijado con formol y embebido en parafina, así como en tejido congelado. Es un método cualitativo y cuantitativo que se utilizan actualmente, es de bajo costo, sencillo, donde se observa una señal estable. Permite la interpretación de resultados sobre el contexto microanatómico. Con ella se evalúa el grado de expresión de la proteína en la membrana celular. Es recomendada como una prueba primaria para una decisión terapéutica. ⁽¹¹⁵⁾

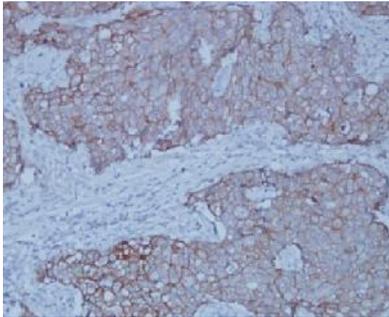
Como se puede observar en la figura 12.B la especificidad del anticuerpo primario anti Her2 obtenido en gallinas y su correspondiente secundario obtenido en conejo conjugado a biotina fue mayor al sistema obtenido en mamífero solamente, al no presentar reacción inespecífica o fondo en los tejidos de adenocarcinoma de mama Her2 positivo y reaccionar con ese antígeno empleando el conjugado a la dilución 1: 200 respectivamente, superiores a las obtenidas con el sistema basado

Resultados y Discusión

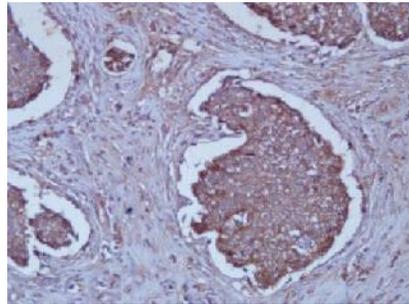
solamente en mamífero que fue 1:50, que aparece en la figura 12.C. En la figura 12.B, se observa una positividad de membrana intensa y uniforme, una tinción completa y fuerte

(anillo grueso) ⁽¹¹⁶⁾, similar al patrón Dako que se muestra en la figura 12.A y en contraposición a lo que se aprecia en la figura 12.D que es el control negativo y no aparece ningún tipo de tinción, tal como se espera en estos casos.

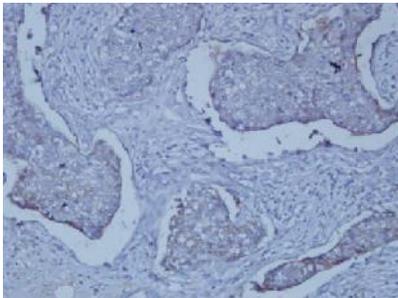
La reacción primaria entre el antígeno y el anticuerpo específico es amplificada con un anticuerpo secundario biotinilado que actúa como puente. Esta reacción se demuestra a través del complejo estreptavidina/FITC y la adición del cromógeno diaminobencidina que evidencia la reacción al formar un compuesto colorido que permite observar al microscopio un patrón de tinción esperado. ⁽¹¹⁵⁾



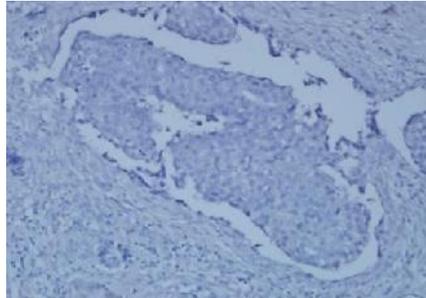
A



B



C



D

Resultados y Discusión

Fig.12. Inmunohistoquímica en muestra de tejido Adenocarcinoma de mama Her2 positivo. Biopsias: B13-0195 y B13-666 Ref.: CIMEQ. (A). Anticuerpo policlonal de conejo anti proteína-humana Her2DAKO. Ref.: K520 Lote: 00081907, dilución 1: 50. (B) Sistema basado en IgY obtenido en LABEX, dilución 1:200. (C). Sistema basado en mamífero, obtenido en LABEX, dilución 1:50. (D) Control negativo (todo menos la muestra). 40X

4.10 Valoración Económica

Para conocer las posibles ventajas desde el punto de vista económico se estimó el costo de producción de este Kit, apoyados en los asesores económicos de la Consultoría Económica CANEC, S.A contratados para la realización de esta tarea, durante la realización del proyecto de investigación, así como la comparación con productos similares existentes en el mercado internacional con estos fines.

El precio de un Kit de 100 determinaciones, se comercializa por DAKO AG por un precio alrededor de 934 USD, cada uno; estos reactivos producirlos en LABEX con las mismas características de calidad, presentación y uso, tienen un costo de 188.85 USD y 192.15 MN cada uno. El país tiene actualmente una demanda anual de 10 400 determinaciones, que representan una cantidad de 104 kits. Cantidad que debe aumentar significativamente cuando el biosimilar cubano anti Her2 humano obtenido en el CIM se comience a comercializar en el extranjero, ya que se pretende que este Kit acompañe a la vacuna que se encuentra en fase de registro ante el CECMED.

Al comparar el costo de producción para las necesidades del país (19 640.4 USD y 19 983 MN) con los gastos necesarios para comprarlos (97 136 USD), es evidente las ventajas de su producción nacional, teniendo un ahorro anual por sustitución de importación de unos 77 495.6 USD aproximadamente. Esta sería la forma en que se traducen los resultados de este trabajo desde el punto de vista económico.

*CONCLUSIONES Y
RECOMENDACIONES*

Conclusiones y Recomendaciones

5. CONCLUSIONES

1. Se lograron títulos de anticuerpos policlonales primarios hasta 128 a partir de los esquemas de inmunización en gallinas y conejos según la técnica de Inmunodifusión doble bidimensional.
2. Los anticuerpos anti IgY en conejos, fueron conjugados con biotina y acoplados a un sistema de detección comercial Streptavidina - FITC los que fueron capaces de reconocer de manera específica, el marcador tumoral por técnicas tanto Inmunohistoquímica (IHQ) como por Citometría de Flujo (CF).
3. El sistema de detección compuesto por anticuerpos primarios aviares resultó ser más específico y sensible que el obtenido a base de anticuerpos de mamíferos solamente.

6. RECOMENDACIONES

Realizar esquemas de inmunización en gallinas ponedoras con otros marcadores tumorales fundamentalmente aquellos cuyas estructuras están altamente conservadas filogenéticamente con el fin de evaluar la superioridad de este biomodelo para la generación de anticuerpos específicos con otras tecnologías de producción.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Yamauchi H, Stearns V, Hayes DF. When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2001; 19(8): 2334 –56
2. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D."Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease".*J Clin Onco l*, 1999; 17(9):2639–2648
3. Yan X, Xiugong G."Use of IgY antibodies and semiconductor nanocrystal detection in cancer biomarker quantization". *Biomarkers Med*, 2010; 4(2): 227–239.
4. Gabizon AA. "Pegylated liposomal doxorubicin: metamorphosis of an old drug into a new form of chemotherapy". *Cancer Invest*, 2001; 19:424-436.
5. Zhang WW. "The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery". *Drug Discov Today*, 2003; 8:364-371.
6. Xiao Y, Gao X, Gannot G, Emmert-Buck MR, Srivastava S, Wagner PD. "Quantitation of HER2 and telomerase biomarkers in solid tumors with IgY antibodies and nanocrystal detection". *Int J Cancer*, 2008; 122:2178-2186.
7. Xiao Y, Gao X, Taratula O, Treado S, Urbas A, Holbrook RD. "Anti-HER2 IgY antibody-functionalized single-walled carbon nanotubes for detection and selective destruction of breast cancer cells". *BMC Cancer*, 2009; 9:351. [citado 2015 Mar 05]. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/9/351>

Bibliografía

8. Abbott A. Human genome at ten: The human race". *Nature*, 2010 ;464 : 668-669
9. Anguiano V G A. "Biomarcadores moleculares: La nueva herramienta en la Biotecnología médica y ambiental": *Entretextos* [Internet]. 2013; 5(14): 2007-5316. Disponible en: <http://entretextos.leon.uia.mx/num/14/PDF/E14-Art8.pdf>
10. Brunicardi FC, Gibbs RA, Wheeler DA, Nemunaitis J, Fisher W, Goss J, et al. "Overview of the development of personalized genomic medicine and surgery". *World Journal of Surgery*, 2011; 35 (8): 1693-1699.
11. Vandy VS, Bonventre JV. *Biomarkers in medicine, drug discovery and environmental health*. New Jersey: John Wiley & Sons; 2010; 618.
12. Ziegler A, Koch A, Krockenberger K, Grobhennig A. "Personalized medicine using DNA biomarkers: a review". *Human Genetic*, 2012; 131: 1627-1638.
13. Smolders R, Bartonova A, Boogaard PJ, Dusinska M, Koppen G, Merlo F,. The use of biomarkers for risk assessment: reporting from the INTARESE/ENVIRISK Workshop in Prague. *Int J Hyg Environ Health*, 2010; 213(5): 395-400.
14. Schulte PA, Hauser JE. "The use of biomarkers in occupational health research, practice, and policy". *Toxicol Lett*. 2012 13;213(1):91-9
15. Sandra S, Arango V. "Biomarkers for the evaluation of human health risks". *Rev Fac Nac Salud Pública*, 2012; 30 (1): 75-82.

Bibliografía

16. Arango SS. "Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana". Rev Fac Nac. Salud Pública, 2011; 30(1): 75-82.
Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-386X2012000100009
17. Chan DW, Schwartz MK. "Tumor markers: Introduction and general principles. En: Diamandis EP, Fritsche HA, Lilja H, Chan DW, Schwartz MK Tumor Markers: Physiology, Pathobiology, Technology, and Clinical Applications". Washington: Diamandis; 2002. p. 9-17
18. Campuzano-Maya G. "Utilidad clínica de los marcadores tumorales". Medicina & Laboratorio ,2010; 16: 411-445.
19. Schrohl AS, Holten-Andersen M, Sweep F, Schmitt M, Harbeck N, Foekens J. et al. "Tumor markers: from laboratory to clinical utility". Mol Cell Proteomics (MEDLINE), 2003; 2(6):378-387. Disponible en : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12813140>
20. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. "Cancer statistics". CA Cancer J Clin , 2010; 60(5):277-300.
21. American Society of Clinical Oncology. Tumor markers tests. Alexandria, VA: ASCO; 2015 [citado 10 Sep 2015]. Disponible en: <http://www.cancer.net/navigating-cancer-care/diagnosing-cancer/tests-and-procedures/tumor-marker-tests>
22. Associated Regional and University Pathologists (ARUP) Laboratories. ARUP's Laboratory Test Directory. [citado 10 Sep 2015]. Disponible en: <http://www.aruplab.com/testing>

Bibliografía

23. Bergamaschi S, Morato E, Bazzo M. "Tumor markers are elevated in patients with rheumatoid arthritis and do not indicate presence of cancer". *Int J Rheum Dis*, 2012; 15(2):179-82.
24. Hayes DF. Biomarkers. En: De Vita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, *Cancer Principles & Practice of Oncology*. 9 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p 694-701.
25. National Cancer Institute. Tumor Markers [citado 10 Sep 2015]. Disponible en: www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Detection/tumor-markers
26. National Cancer Institute. *Tumor Markers*, 2012 . [citado 2015 Mar 05]. Disponible en: www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Detection/tumor-markers on June 20
27. National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology. Non-Small Cell Lung Cancer, 2011; (3) [citado 2015 Mar 05]. Disponible en: www.nccn.org. on
28. Pall M, Iqbal J, Singh SK, Rana SV. "CA 19-9 as a serum marker in urothelial carcinoma". *Urol Ann*, 2012; 4(2):98-101.
29. Sánchez R, Schneider E, Martínez G, Fonfach C. "Cáncer de mama. Modalidades terapéuticas y marcadores tumorales". *Cuad Cir*, 2010; 22: 55-63.
30. Buys SS, Partridge E, Black A, Johnson CC, Lamerato L, Isaacs C, et al. "Effect of screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial". *JAMA*. 2011; 305(22):2295–2303.

Bibliografía

31. Pinsky PF. "Principles of Cancer Screening" Surg Clin North Am. , 2015; 95(5):953-66.
32. Coronato S, Laguens G E, Spinelli OM, Di Girolamo W. "Marcadores tumorales en cáncer de mamas". Medicina (Buenos Aires), 2002; 62: 73-82.
33. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA. Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. "Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer". Science, 1989; 244(4905): 707-12.
34. Piccart- GebhartMJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER 2 positive Breast Cancer. N Engl J Med, 2005; 353(16): 1659-72.
35. Jackisch C. "HER-2-positive metastatic breast cancer optimizing trastuzumab-based therapy". The Oncologist , 2006; 11(Suppl 1): 34-41
36. Taucher S, Rudas M, Mader RM. Gnant M, Dubsy P, Bachleitner T, et al. "Do we need HER-2/neu testing for all patients with primary breast carcinoma? "Cancer, 2003; 98(12): 2547-53.
37. Blok EJ. "Cytoplasmic Overexpression of HER2: a Key Factor in Colorectal Cancer". Clin Med Insights Oncol. 2013; 7: 41–51.
38. Baselga J, Cortes J, Pivot XB, Clark E, Knott A, Ross G. "Adverse events with pertuzumab and trastuzumab: Evolution during treatment with and without docetaxel in CLEOPATRA". J Clin Oncol, 2012 ,30(15) suppl : 597.
39. Ewer M, Baselga J, Clark E, Benyunes M, Ross G, Swain SM. "Cardiac tolerability of pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel in patients with HER2

Bibliografía

positive metastatic breast cancer in the CLEOPATRA study". *J Clin Oncol*, 2012 ; 30(15 suppl) : 533

40. Carvajal Garcés CF, Morales Clavijo M. "Sensibilidad y especificidad de los marcadores tumorales. " *Rev. méd. (Cochabamba)*, 2010 ;21 (1): 86-97

41. Lal P, Salazar PA, Ladanyi M, Chen B. " Impact of Polysomy 17 on HER-2/neu immunohistochemistry in breast carcinomas without HER-2/neu gene amplification" . *Mol Diagn*, 2003; 5: 155-159.

42. Benítez Martín A, Pérez Herrezuelo A. Plataformas genómicas del cáncer de mama: avances hacia una medicina personalizada. Servicio de Obstetricia y Ginecología Hospital Universitario "Virgen de las Nieves" Granada. 2014 [citado 10 Sep 2015]. Disponible en:

http://www.hvn.es/servicios_asistenciales/ginecologia_y_obstetricia/ficheros/actividad_docente_e_investigadora/clases_residentes/2014/clase2014_plataformas_genomicas_cancer_mama.pdf

43. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, et al. . "Current perspectives on HER-2 testing ": A review of National Testing Guidelines. *Mod Pathol*, 2003; 16: 173-182.

44. Ceccarelli C, Santini D, Chieco P, Lanciotti C, Taffurelli MG, Marrano D. "Quantitative p21 (walf-1) / p53 immunohistochemical analysis defines groups of primary invasive breast carcinomas with different prognostic indicators ". *Int J Cancer*, 2001; 95(2): 128-134.

45. San Miguel A, Gonzalez Blanco I, García Iglesias R, Alonso N, Rodríguez Bujez AB, Martín Medrano EM. "Factores pronósticos del cáncer de mama y oncogén her2/neu". *Rev Electron Biomed / Electron J Biomed* ,2006; 2: 72-88.

Bibliografía

46. Yan X, Xiugong G. "Use of IgY antibodies and semiconductor nanocrystal detection in cancer biomarker quantitation ". *Biomarkers Med*, 2010; 4(2): 227–239.
47. Franco J. "Estrategias de inmovilización de anticuerpos para la detección directa de hormonas mediante Inmunosensores de Resonancia de Plasmón Superficial ". Barcelona: Institut Català de Nanociència i Nanotecnologia (ICN2); 2013.
48. Estevez MC, Alvarez M, Lechuga LM, "Integrated optical devices for lab-on-a-chip biosensing applications ". *Laser & Photonics Reviews*, 2012; 6(4):463-487
49. Ronkainen NJ, Halsall HB, Heineman WR, "Electrochemical biosensors". *Chem Soc Rev*, 2010; 39:1747-1763.
50. Robinson JP. *Handbook of flow cytometry methods*. New York: Wiley-Liss; 1993.
51. Mainet González D, Sorell Gómez L, Torres M. "La troponina I cardiaca: marcador bioquímico de elección del daño miocárdico". *Biotecnología Aplicada*, 2000; 17(2): 77-84.
52. Blanco Covián L, Blanco López MC. "Desarrollo de un Inmunoensayo de Flujo Lateral para la detección de PSA". Oviedo: Universidad de Oviedo; 2013.
53. Weia Y, Xiao-bing L, Guo-wena L, Bing-bing Z, Yiab Z, Taoc K. "Biosensors and Bioelectronics", 2011; 26 :3710–3713.
54. San Miguel A, Gonzalez Blanco I, García Iglesias R, Alonso N, Rodríguez Bujez AB, Martín Medrano EM. "FACTORES PRONOSTICOS DEL CANCER DE MAMA Y ONCOGEN HER2/NEU". *Rev Electron Biomed / Electron J Biomed*, 2006; 2:72-88.

Bibliografía

55. García Rodríguez C; Martínez Maldonado I. “Ventajas del Método de Quimioluminiscencia frente al de radioinmunoanálisis (RIA). *Vis Cientí* [Internet], 2010; 2 (2): 60-68.

Disponible en: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2222-43612009000100010&script=sci_arttext

56. Departamento de Sanidad Animal Técnicas Inmunológicas III.

Enzimoinmunoanálisis. Seroperfiles y su aplicación en veterinaria. *Western blot*.

Inmunomigración. Inmunohistoquímica. Inmunología. Curso 2009-10. Tema 12. Madrid: Universidad Complutense; 2010 [citado 10 Sep 2015]. Disponible en:

<http://pendientedemigracion.ucm.es/info/saniani/troncales/inmunologia/documentostemas/Tema%2012.pdf>

57. Medina Cano FJ. “Diferencias biológicas y de supervivencias según el método de detección en pacientes con cáncer de mamas”. [tesis doctoral]. Málaga: Universidad de Málaga; 2014 [citado 10 Sep 2015].

Disponible en:

http://riuma.uma.es/xmlui/bitstream/handle/10630/8570/TDR_MEDINA_CANO.pdf?sequence=1

58. Pardo Mindán J, Panizo A, Martínez L. “Valoración del sistema de polímeros de dextrano En Vision (PDE) en la detección inmunohistoquímica”. *Rev Esp Patol* ,1998; 31(1): 9-16.

59. Salcedo-Vargas M. “La nanotecnología en apoyo a la investigación del cáncer”. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* ,2011; 49 (6): 621-630.

60. Jaimes S, González A, Granados C, Álvarez D, Espitia E. “Nanotecnología: avances y expectativas en cirugía”. *Rev Colomb Cir*, 2012; 27:158-166.

Bibliografía

61. Villalobos C. "Nanobiomarcadores de células tumorales basados en polímeros inteligentes con Quantum Dots" [tesis]. Talca: Universidad de Talca; 2010 [citado 10 Sep 2015]. Disponible en: <http://dspace.utalca.cl:8888/salud/61322.pdf>
62. Blanco Bea D, Pérez Tejada A, Acuña Pardo A, Carreño Cuador J. "Nanomedicina: aspectos generales de un futuro promisorio". Rev haban cienc méd [Internet]. 2011 Sep [citado 10 Sep 2015]; 10(3):
Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2011000300018&lng=es.
63. Yih TC, Wei C. "Nanomedicine in cancer treatment". Nanomed. Nanotechnol. Biol Med, 2010; 1: 191-192.
64. Heath JR, Davis ME. Nanotechnology and cancer. Annu Rev Med. 2010; 59: 251.
65. Escamilla C, Martínez H, Rivera G, "La Nanotecnología y sus Nuevas Aplicaciones en Oncología". Biotecnología, 2011; 15 (2): 12-21
66. Cuba. Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (CITMA). Elementos iniciales para el análisis sobre la Nanotecnología en Cuba. La Habana: CITMA; 2002.
67. Lage A. "Connecting immunology research to public health: Cuban biotechnology". Nat Immunol, 2008 ,9(3): 329- 32
68. Lage A. Transforming cancer indicators beg bold new strategies from biotecthnology. Medicc Rev. 2009; 11: 8-12.

Bibliografía

69. Goyanes Álvarez R I, Rengifo Calzado C, Carr Pérez A E. "Evaluación de factores pronósticos y predictivos en cáncer de mama en Cuba. Su papel en la terapia personalizada". [tesis doctoral]. La Habana: Facultad de Ciencias; 2011 [citado 10 Sep 2015].

Disponible en: <http://tesis.repo.sld.cu/349/1/AlvarezGoyanes.pdf>

70. Cuba. Ministerio de Salud Pública. Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas de Salud. Anuario Estadístico de Salud. 2011. Edición especial. La Habana: MINSAP; 2012.

71. Camacho R. "Targeting cancer with the resources at hand". *Medicc Review* summer, 2009; 11: 13-15.

72. Rodríguez PC, Rodríguez G, González G. "Clinical development and perspectives of CIMAvax EGF, Cuban vaccine for non-small-cell lung cancer therapy". *MEDICC Rev* Winter, 2010; 12(1): 17-23.

73. Schnitt SJ. "Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy". *Mod Pathol*, 2010; 23: 60-64.

74. U.S. Department of Health and Human Services. National Institute of Health. Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals. Bethesda, MD: NIH Publication; 2013 [citado 10 Sep 2015].

Disponible en: <http://grants.nih.gov/grants/olaw/references/phspolicylabanimals.pdf>

Bibliografía

75. Oliver Salvador MC, Zárate Segura PB, Torres Bustillos LG, Muñoz Soto R, IBT Molina Jiménez H. Manual de Prácticas del laboratorio de Inmunología Aplicada. México, D.F.: Instituto Politécnico Nacional; 2008.
76. Grosso MC, Cuello MF, Martínez RA, Greco CR, Henklein P, Schade R. “Evaluación de la especificidad de anticuerpos policlonales aviarios y mamíferos anti-Factor Precoz de Preñez porcino” *Inmunología* , 2008; 27 (1) : 1-10.
77. Góngora Amores W, Sánchez Artigas R, Torres Ponce Z, Corella Sánchez J, Cobos Valdés D, Miranda Cruz A. “Suero de conejo con actividad de complemento para tipificación del complejo mayor de histocompatibilidad humano”. *Rev Cubana Invest Bioméd*, 2012; 31 (1): 81-86
78. Akita EM, Nakai S. “Immunoglobulins from Egg Yolk: Isolation and Purification”. *Journal of Food Science*, 1992; 57(3): 629–634.
79. Documento de Calidad. Procedimiento Normalizado de Operación. Purificación del anticuerpo monoclonal de la subclase IgG1. O5 NO.003 Edición No: 01 Fecha: 1/3/13.
80. Rabell Velázquez G, Rodríguez Pérez S, Abijana Lora G. “Obtención del anti-CD45 conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína” [tesis]. Santiago de Cuba: Universidad de Oriente; 2014.
81. Aníbal Margni R. “Inmunología e Inmunoquímica. Fundamentos”. 5 ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2008

Sistemas basados en anticuerpos aviares y mamíferos para la detección por Inmunohistoquímica del marcador tumoral Her2.

Bibliografía

82. Janeway CA, Tavers P. Walport M &Shlomchick M. Immunologie. (German version) 5 Ed. Berlin: Spektrum Springer; 2002.

Bibliografía

83. Martínez Manrique C, Tamayo Ortega V, Sierra González G. Obtención del suero anti IgG humano con la solución CM-95 tratada magnéticamente como adyuvante inmunológico. MEDISAN [Internet]. 2007[citado 10 Sep 2015]; 11(4).

Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol11_4_07/san09407.htm

84. Lobato García, Bárbara R, Rivera Ochoa N, Rodríguez Sánchez VM, Rodríguez Morales P, Callejas Morales F. "Optimización de protocolos de producción de anticuerpos policlonales: un ejercicio de innovación educativa" Rev Med UV [Internet]. 2009 [citado 10 Sep 2015]; 9(2). Disponible en: https://www.uv.mx/rm/num_anteriores/revmedica_vol9_num2/articulos/optimizacion.pdf

85. Gutiérrez Calzado EJ, Silva GR, Garrido RMG, Polanco LB, Ramos DP, Clarke DH, Tanty CR, Rojas AM. "Obtainment of anti chicken IgY reagent in rabbits and its use in IgY Technology". Revista CENIC Ciencias Biológicas, 2002; 33(2): 43-48.

86. Hay FC, Westwood OMR. Practical Immunology. 4 ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2002.

87. Frank CH, Olwyn M R. Practical Immunology .4: Westwood; 2002. 978p.

88. Calderón Pascacio RV, Stock Silberman RP. "Curso de Métodos Físicoquímicos en Biotecnología". México, D.F.: UNAM; 2007.

89. Martín-Lacave I, García-Caballero T. "Atlas de inmunohistoquímica: Caracterización de células, tejidos y órganos normales. Madrid: Ediciones Díaz de Santos; 2012. 445 p.

Bibliografía

90. Leslie P, Gartner S, James L. Hiatt "Histología básica". Madrid: Elsevier; 2011. 352 p.
91. Amersham Pharmacia Biotech. Antibody Purification. Handbook. Amersham: GE Healthcare; [s.a.].
92. Rodríguez Cardoso O, García I, Ilera G. "Determinación de los parámetros de la isoterma de adsorción para el sistema antígeno de superficie de la hepatitis B- anticuerpo monoclonal CB.Hep-1, en un gel de inmunoafinidad". Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Biotecnología Aplicada, 2007; 18:17-19.
93. Amersham Pharmacia Biotech. Affinity Chromatography. Principles and Methods. Amersham: GE Healthcare; 2004
94. Liscano MG, Longa Z, Infante M, Téllez S. "Evaluación de un método para el aislamiento de péptidos naturales de *Leishmania spp*". Salud; 2011,15 (1):1316-7138.
95. Amersham Pharmacia Biotech. 2-D Electrophoresis. Principles and Methods. Amersham: GE Healthcare; 2004.
96. Laemmli U K. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4". Nature, 1970; 227(5259):680-685
97. Ross JS. "Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein".

Sistemas basados en anticuerpos aviares y mamíferos para la detección por Inmunohistoquímica del marcador tumoral Her2.

Bibliografía

Mol. Cell Proteomics, 2004; 3(4): 379-98

Bibliografía

98. Manouchehr M, Pharm R. "Purification of anti-HbsAg from egg yolks of immunized hens and its application for detection of HBsAg". Arch Iranian Med, 2002; 5(2): 91-93.
99. Svendsen L, Crowley A, Ostergaard LH, Stodulski G. Hau J "Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk". Lab Anim Sc, 1995; 45(1):89-93.
100. Pinto J, Barco M, Afanador MC, Merchán AM, Montañez, MF, Andrade F, et al. "Obtención de anticuerpos policlonales IgY antiparvovirus canino a partir de yema de huevo de gallina". Universitas Scientiarum, 2005; 10(1): 37-43.
101. Grzywa R, Łupicka-Słowik A, Walczak M, Idzi M, Bobrek K, Boivin S. et al "Highly Sensitive Detection of Cancer Antigen 15-3 Using Novel Avian IgY Antibodies". ALTEX, 2014; 31 (1): 43-52.
102. Palaniyappan A, Das D, Kammila S, Suresh MR, Sunwoo H. "Diagnóstico del antígeno del nucleocápside del síndrome respiratorio agudo severo asociado a coronavirus (SARS-CoV) con inmunoglobulina Y de pollo". Poult Sci. 2012 Mar;91(3):636-42
103. Gutiérrez Calzado E, Samón Chávez T, Sierra González G, Higginson Clarke D. "Desarrollo de un Sistema ELISA para cuantificar IgG de ratón tomando como base la tecnología IgY". Revista CENIC Ciencias Biológicas, 2007 ; 38(1): 75-8
104. Carey H, Artwohl W, James E, Taylor B. "Review of Polyclonal Antibody Production Procedures in Mammals and Poultry". International Laboratory Animals Resource (ILAR) Journal, 1995; 37(3): 93-118

Bibliografía

105. Schade R, Henklein P, Hlinak A, de Vente J, Steinbusch H. "Specificity of chicken (IgY) versus rabbit (IgG) antibodies raised against cholecystokinin octapeptide (CCK-8)". *ALTEX*, 1996; 13 (5): 80-5
106. Leenars M, Hendriksen CFM. "Critical Steps in the Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies: Evaluation and Recommendations". *ILAR J.* 2005; 46(3):269.
107. Sandoval GA, Lazo F, Rodríguez E, Mendoza J, Yarlequé A. "Inmovilización del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox*. en columna de afinidad para la obtención del anti veneno específico". *Rev Per Quím Ing Quím*, 2011; 14 (1 & 2):68-72.
108. Jevey González A, Hernández González SM, Nápoles Vega Á, Pedrosa Amado A, Ramírez Zayas R. "Obtención, Purificación y Caracterización de IgG policlonal de conejo anti-lipoproteína humana". *AMC [Internet]*. 2005 [citado 10 Sep 2015]; 9(4).

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=211117887001>
109. Murcia Gutierrez HW. "Importancia de las inmunoglobulinas aviares y sus aplicaciones en inmunoensayos". *Teoría y Praxis Investigativa*, 2009; 4(2) : 19-26
110. Akita EM, Nakai S. "Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain". *J Immunol Methods*, 1993; 160(2):207-14.
111. Ali A. Al-Edany "Preparation and Purification of Immunoglobulin Y from Egg

Sistemas basados en anticuerpos aviares y mamíferos para la detección por Inmunohistoquímica del marcador tumoral Her2.

Bibliografía

Yolk of Immunized Hens“. Journal of Thi-Qar University, 2013; 2 (8): 7-16

Bibliografía

112. Gutiérrez Calzado EJ. "Anticuerpos de yema de huevo (IgY) como herramientas para el diagnóstico y la terapéutica". Revista CENIC Ciencias Biológicas, 2000; 31(1): 75-82
113. Barroso P, Murcia H, Vega N, Pérez G. "Obtención y purificación de IgY dirigidas contra la lectina de *Salvia bogotensis*". Biomédica (Bogotá). 2005;25: 496-510.
114. Gutiérrez Calzado EJ, Cruz Mariño E, Toledano Heredia M, y Samón Chávez T. "Obtención de anti IgG humana en aves". Revista CENIC Ciencias Biológicas, 2001, 32(2): 207-210
115. Navidad Cervera F, Chávez Martínez MA. "Trascendencia de la determinación del Her2 por inmunohistoquímica y su utilidad terapéutica". Rev Latinoam Patol, 2012; 50(2):87-93.
116. Ortiz-Vega M, Sánchez González JD, Mora-Mendoza I. " Expresión de los receptores de estrógenos, progesterona y Her2/neu en muestras de tejido con diagnóstico histopatológico de carcinoma de mama". Rev Sanid Milit Mex ,2012; 66(4): 172-180.

ANEXOS

Anexos

7. ANEXOS

ANEXO I. Porciento de reconocimiento e intensidad media de fluorescencia de los anticuerpos primarios obtenidos mediante Citometría de flujo.

Muestra	% de reconocimiento	IMF
SKBR3	25.9	14.5
Strept/FITC	29.7	16.3
Anti IgY biotinilado (1:200)	22.7	17.6
Anti IgG de conejo biotinilado (1:200)	20.9	16.7
Anti Her 1 (10 ug/mL) + Anti IgY biot (1:200)	23.5	17.6
Anri Her 2 Dako (10 ug/mL) + Anti IgG de conejo biotinilado (1:200)	99.0	198.6
Anti Her 2 en pollo		
Anti Her 2 (1:50) + Anti IgY biot (1:200)	99.0	146.1
Anti Her 2 (1:100) + Anti IgY biot (1:200)	99.4	232.3
Anti Her 2 (1:200) + Anti IgY biot (1:200)	99.4	136.3
Anti Her 2 en conejo		
Anti Her 2 (1:50) + Anti IgG biot (1:200)	89.5	106.1
Anti Her 2 (1:100) + Anti IgG biot (1:200)	49.4	22.5
Anti Her 2 (1:200) + Anti IgG biot (1:200)	42.4	16.9

Anexos

Anexo II. Porcentaje de reconocimiento e intensidad media de fluorescencia de los anticuerpos secundarios conjugados obtenidos mediante Citometría de flujo.

Tubo	Célula	Anti Her 2		Conjugado biotinilado	Streptavidina /FITC	%	IMF
		gallina	conejo				
1	X	-	-	-	-	3	12,1
2	X	-	-	1:20	1:50	44,6	30,7
3	Si	-	-	1:200	1:50	7,1	13,6
4	Si	-	1:100*	1:200*	1:50	99,4	426
5	Si	1:100	-	1:20	1:50	99,8	262,9
6	Si	1:100	-	1:50	1:50	98,6	273,7
7	Si	1:100	-	1:100	1:50	99,8	339,7
8	Si	1:100	-	1:200	1:50	99,8	381,5
9	Si	-	1:50	1:20	1:50	65,8	23,6
10	Si	-	1:50	1:50	1:50	88,1	35,8
11	Si	-	1:50	1:100	1:50	81,1	31,2
12	Si	-	1:50	1:200	1:50	79,5	30,3

Conteo celular

Línea: SKBR-3 (P-2)

Vivas: 39

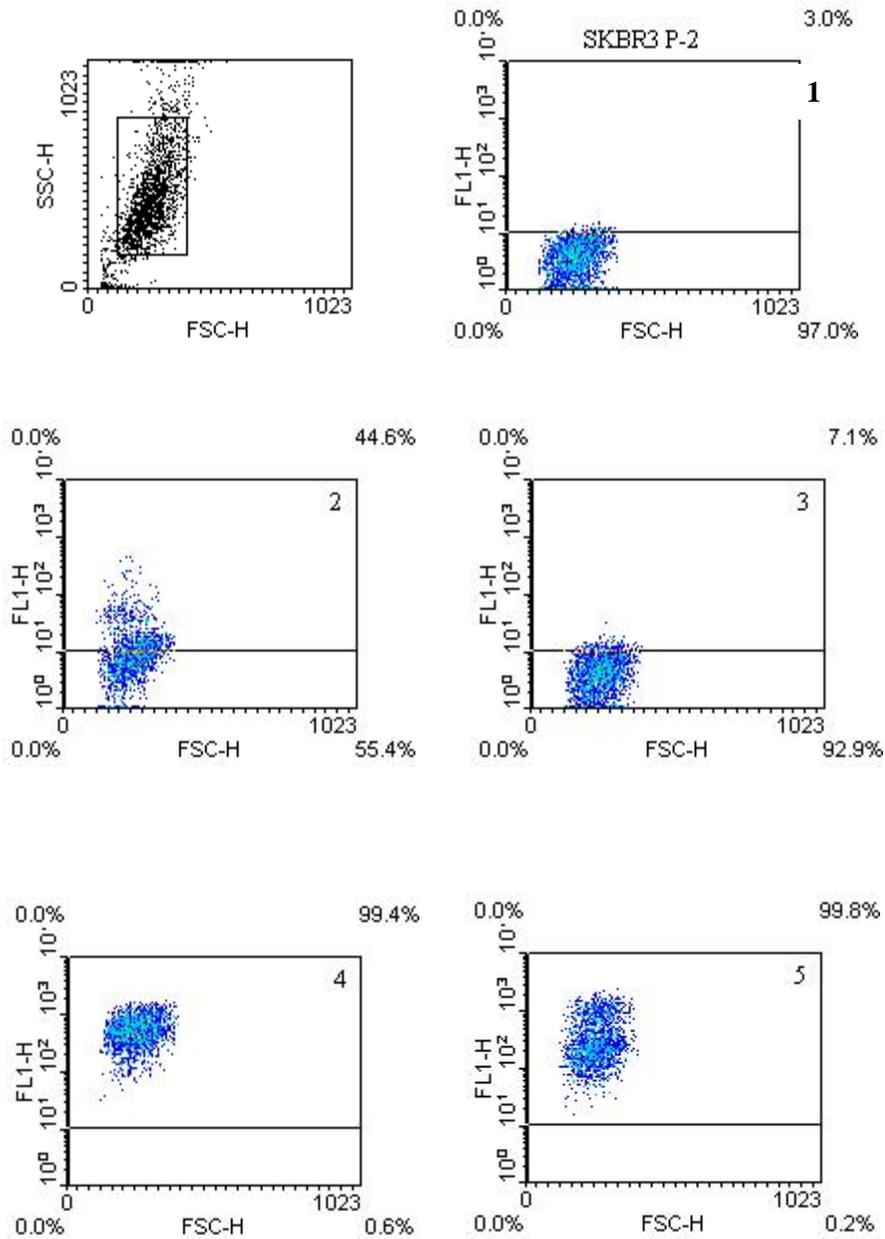
Muertas: 2

Viabilidad: 95,12%

Concentración = $(41/4) \times 5 = 51,25 \times 10^4 = 0,51 \times 10^6 \times 15 \text{ mL} = 7,65 \text{ MT}$

Sistemas basales en anticuerpos aviares y mamíferos para la detección por Inmunohistoquímica del marcador tumoral Her2.

Anexos



Sistemas basados en anticuerpos aviares y mamíferos para la detección por Inmunohistoquímica del marcador tumoral Her2.

Anexos

