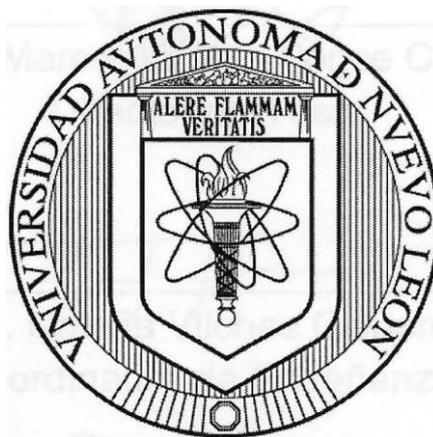


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN FACULTAD DE
MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO "DR. JOSÉ
ELEUTERIO GONZÁLEZ"

SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y CITOPATOLOGÍA



PERFIL DE EXPRESIÓN DE P53 Y CASPASA-3 EN LA CAPA
GRANULAR EXTERNA DEL CEREBELO NEONATAL HUMANO.

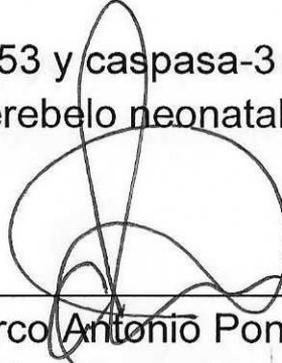
TRABAJO DE TESIS PRESENTADO POR:
DR. EDUARDO RUIZ HOLGUÍN

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN ANATOMÍA PATOLÓGICA

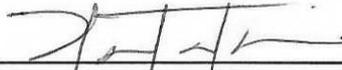
MONTERREY, NUEVO LEÓN. FEBRERO DEL 2018

APROBACIÓN DE TESIS

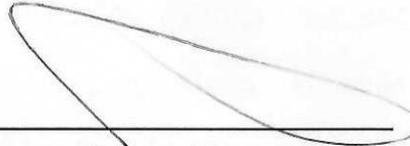
Perfil de expresión de p53 y caspasa-3 en la capa granular externa del cerebelo neonatal humano.



Dr. med. Marco Antonio Ponce Camacho
Director de Tesis



Dra. Natalia Vilches Cisneros
Coordinador de Enseñanza



Dr. med. Juan Pablo Flores Gutiérrez
Coordinador de Investigación



Dra. med. Oralia Barboza Quintana
Jefe de Servicio o Departamento



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por el apoyo incondicional y a la vida por las lecciones otorgadas.

TITULO DE LA TESIS:

"Perfil de expresión de p53 y caspasa-3 en la capa granular externa del cerebelo neonatal humano."

PRESENTADO POR:

Dr. Eduardo Ruiz Holguín

Este trabajo fue realizado en el Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección del Dr. med. Marco Antonio Ponce Camacho y la codirección del Dr. med. Luis Ángel Ceceñas Falcón.

APÍTULO VII: MATERIALES Y MÉTODOS 25
APÍTULO VIII: RESULTADOS 30
APÍTULO IX: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES 35
APÍTULO X: BIBLIOGRAFÍA 40



Dra. med. Oralia Barboza Quintana
Jefe de Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología

MONTERREY, NUEVO LEÓN, FEBRERO DEL 2018

TABLA DE CONTENIDO

	Página
APROBACIÓN DE TESIS	2
TITULO DE LA TESIS	3
AGRADECIMIENTOS	4
TABLA DE CONTENIDO	5
LISTA DE ABREVIATURAS DE USO COMÚN	6
CAPÍTULO 1: RESUMEN	7
CAPÍTULO 11: INTRODUCCIÓN	9
CAPÍTULO 111: OBJETIVOS	17
CAPÍTULO IV: JUSTIFICACIÓN	19
CAPÍTULO V: HIPÓTESIS	21
CAPÍTULO VI: HIPÓTESIS NULA.	23
CAPÍTULO VII: MATERIALES Y MÉTODOS	25
CAPÍTULO VIII: RESULTADOS	30
CAPÍTULO IX: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	38
CAPÍTULO X: BIBLIOGRAFÍA	40

LISTA DE ABREVIATURAS DE USO COMÚN

TNF: Tumor necrosis factor

FADO: Factor associated death domain

Bcl-2: 8-cell lymphoma 2

TMA: Tissue Micro Array

P53: Tumor protein p53

I. RESUMEN

I. RESUMEN

INTRODUCCIÓN. La muerte de las neuronas de la capa granular externa ha sido ampliamente estudiada tanto in vivo como in vitro. Se han demostrado 2 fases de muerte celular consecutivas que afectan a las células granulares cerebelosas: pre y post migratoria. La fase premigratoria afecta a la célula progenitora de la capa granular externa.

No se ha dilucidado cual vía apoptótica se activa durante el proceso de muerte neuronal.

JUSTIFICACIÓN. Debido a que la relación entre los eventos apoptóticos presentes durante la neurogénesis y la maduración de la corteza cerebelosa posnatal en el humano no están completamente dilucidados, es necesario realizar más estudios para conocer el papel de otras vías de apoptosis además de la vía de p53.

HIPÓTESIS. Las células granulares de la capa granular externa de la corteza cerebelosa neonatal del humano expresan predominantemente Caspasa 3.

MATERIALES Y MÉTODOS. Se pretende determinar la vía de apoptosis de la corteza cerebelosa neonatal del humano utilizando marcaje inmunohistoquímico con caspasa-3 y p53 en 50 casos de autopsias pediátricas realizadas en el Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario UANL para posteriormente evaluar la inmunoreacción de forma cuantitativa y cualitativa para estas moléculas.

CONCLUSIÓN: p53 resultó negativo en todos los casos. Caspasa-3 resultó positiva en la capa granular externa de 49 de los 50 casos estudiados. Esta positividad fue más intensa en individuos de edad gestacional más avanzada (prematuros tardíos y a término). La capa granular externa expresó Caspasa-3 de forma predominante y con mayor intensidad en comparación con el resto de las capas de la corteza cerebelosa.

II. INTRODUCCIÓN

II. INTRODUCCIÓN

Durante la historia, la muerte celular fisiológica ha sido conocida por varios nombres. Virchow, en 1858, fue el primer investigador en describir los procesos de muerte celular y, basándose sólo en parámetros macroscópicos, los definió como degeneración, mortificación y necrosis.

En 1879, utilizando observaciones microscópicas se introducen los términos Karyorhesis y Karyolysis, que hacen referencia a la desintegración y desaparición del núcleo. Diez años más tarde, Arnheim, propone los términos piknosis y marginación de la cromatina. Flemming, estudiando los folículos de los ovarios de los mamíferos, observó y describió la desaparición de células, denominando a este proceso chromatolisis, término que fue reutilizado por Graper, en 1914, como antónimo de los procesos de mitosis. Pero no fue hasta 1972 cuando Kerr, Wyllie y Currie implantan el término «apoptosis», ampliamente utilizado en nuestros días, que evoca a la caída de las hojas desde los árboles en otoño o la de los pétalos de las flores.

En la última década, hemos sido testigos de un crecimiento exponencial de los trabajos de investigación realizados sobre los procesos que rodean a la muerte celular y parece que se ha llegado al consenso de englobarlos en dos grandes grupos: necrosis y apoptosis.

El término necrosis reúne los procesos violentos y catastróficos, donde la degeneración celular es pasiva sin un requerimiento de energía en forma de ATP. Aparece frecuentemente como consecuencia de un daño traumático o por la exposición a toxinas.

El segundo tipo de muerte celular es conocido como apoptosis o muerte celular programada. En este proceso las células se autodestruyen sin desencadenar reacciones de inflamación ni dejar cicatrices en los tejidos. La apoptosis es por tanto considerada como una muerte natural fisiológica, resultando en un mecanismo de eliminación de células no deseadas, dañadas o desconocidas y que desempeña un papel protector frente a posibles enfermedades.

Las rutas apoptóticas, por tanto, intervienen en algunos procesos fisiológicos:

1. Las etapas de desarrollo donde se producen células en exceso. En el refinamiento de la inervación al retirar aquellas neuronas menos capacitadas, a modo de selección celular darwiniana en el sistema nervioso, en la apertura de los orificios en el tubo digestivo, en la formación de órganos como los riñones o en la remodelación de los huesos y cartílagos y durante la morfogénesis de los dedos en la eliminación de las áreas interdigitales.

2. La selección de linfocitos. Al mediar en la eliminación de aquellos que reconocen antígenos propios y en la eliminación de células infectadas o tumorales por histólisis y también, en los mecanismos de defensa frente a tumores en que intervienen células que incluyen los linfocitos T citolíticos, las natural killer y los macrófagos.

Los procesos apoptóticos se caracterizan por cambios morfológicos como:

1. Aumento brusco de la densidad intracelular. El retículo endoplasmático se dilata, formando vesículas y fusionándose con la membrana plasmática, eliminando así su contenido al medio extracelular. Esta rápida, pero selectiva, salida de fluidos e iones

intracelulares se encuentra mediada por transportadores iónicos (cotransportador cloro-potasio-sodio, que inhibe la pérdida de agua y sodio de las células afectadas).

2. Incremento moderado, pero sostenido, de la concentración de calcio libre citoplasmática ($[Ca^{2+}]_i$), diferencia clara frente a los procesos de necrosis, donde su aumento es drástico.

3. Cambios en la composición de la membrana celular. Translocación de grupos glicanos a la superficie celular que van a actuar como señal de reconocimiento, permitiendo la unión de fagocitos y, de esta manera, evitando la liberación del contenido celular y la posible reacción de inflamación.

4. Alteración en la conformación de elementos del citoesqueleto. Como consecuencia aparece una deformación, resultado de la actividad de las proteasas, modificándose el transporte intracelular retrógrado de factores de crecimiento y de proteínas.

5. Aumento y activación de la síntesis de determinadas proteínas necesarias en las rutas metabólicas de los procesos de muerte celular.

6. Condensación y fragmentación de la cromatina, por acción de endonucleasas endógenas, en fragmentos denominados oligonucleosomas.

Durante los procesos de muerte celular se pueden distinguir tres etapas: **activación, propagación y ejecución.**

Fase de activación

Los procesos apoptóticos pueden ser activados bien por una inducción negativa (como la pérdida de una actividad supresora, la falta de factores de crecimiento o la disminución de los contactos con las células que la rodean) o por una inducción positiva como es el resultado de la unión de un ligando a un receptor o la recepción de señales conflictivas.

Receptores

Localizados preferentemente en la membrana citoplasmática, se pueden clasificar en dos grupos: aquellos cuya activación siempre conduce a la muerte de la célula, conocidos como «receptores de muerte» -receptor Fas y receptor del factor de necrosis tumoral (TNF)- y aquellos que desempeñan una función fisiológica, pero su sobreactivación puede conducir también a la muerte.

Se caracterizan por presentar un dominio extracelular, rico en cisteína y un segundo dominio de localización citoplasmática conocido como el «dominio de la muerte».

La proteína transmembrana Fas, en su porción intracelular, enlaza con FADD (factor associated death domain), activando las caspasas 8 y 10.

El receptor para el TNF conecta con complejos como el TRADD (TNFR-associated death domain) que actúa como una plataforma de adaptación para reclutar moléculas de señalización, como la proteína de interacción con el receptor, y activa factores de transcripción (NF- κ B y el JNK/AP-1). A diferencia de Fas, el receptor de TNF raramente activa procesos de apoptosis, a menos que la síntesis de proteínas se encuentre bloqueada, sugiriendo la existencia de factores celulares que suprimen los estímulos apoptóticos generados por el TNF.

Rutas de señalización

Entre los segundos mensajeros que participan en los procesos de muerte celular más estudiados se encuentran el calcio y las especies reactivas del oxígeno, aunque recientemente están adquiriendo gran importancia otros como la ceramida y algunas proteínas tales como factores de transcripción (p53) y oncogenes (c-myc, familia de bcl).

La proteína p53 es un factor de transcripción que es activado en respuesta al daño en el ADN. Aumentos en los valores p53 conducen a la inducción en la transcripción de otros genes como p21/WAF1/Cip 1, un inhibidor de proteínas cinasas reguladas por ciclinas, inhibiendo la entrada en fase S del ciclo celular. El resultado neto de estas

interacciones es una parada en fase G1, la cual provee de una barrera cinética en la replicación de un genoma potencialmente dañado. Si la célula no puede reparar el daño genético, p53 induce la muerte celular por un mecanismo que todavía no se conoce. Se ha postulado que este proceso puede estar mediado por aumentos en la síntesis de Bax, una proteína de la familia de Bcl-2 con propiedades proapoptóticas. De esta manera, p53 se convierte en el guardián del genoma y, por extensión, del organismo, vigilando la correcta reparación de las alteraciones genéticas originadas por diversos factores externos. Un mal funcionamiento del gen p53 puede promover el desarrollo de tumores al permitir la proliferación de células que no han completado la reparación del ADN.

Fase de decisión

Una vez que la célula recibe una señal de muerte, debe decidir si debe sobrevivir o desencadenar los procesos de muerte. En esta fase de decisión se ha situado a la mitocondria como organelo fundamental. Uno de los acontecimientos principales que tienen lugar en la mitocondria es la alteración de la permeabilidad de sus membranas debido a la formación de un complejo multiproteico (poro de permeabilidad transitoria mitocondrial) que conduce a la liberación del contenido intramitocondrial como el citocromo C, el factor inductor de apoptosis y miembros de la familia de caspasas.

Fase de ejecución

Una vez que la célula ha tomado la decisión de morir, en su interior se produce una serie de procesos bioquímicos que conducen a la degradación de proteínas y de la cromatina. La proteólisis, a diferencia de la mayoría de las modificaciones postranslacionales, es irreversible y quizás por ello es altamente específica.

La mayoría de las proteasas son sintetizadas como precursores de muy baja actividad catalítica que son activados por procesamiento proteolítico mediado por la unión a un cofactor o por la retirada de un inhibidor.

Entre las proteasas implicadas en los procesos de muerte celular se encuentran las caspasas, las calpaínas, la granzima B y el complejo multiproteico denominado

proteosoma. Las caspasas son una familia de cisteína-proteasas que han sido reconocidas como los homólogos en mamíferos del producto del gen proapoptótico ced- 3 del nematodo *C. elegans*. Éstas se engloban en tres grupos: caspasas implicadas en la producción de citocinas (caspasas 1, 4, 5 y 13), caspasas de señalización o de activación de otras caspasas (caspasas 2, 8, 9 y 10) y caspasas efectoras de muerte o ejecutoras (caspasas 3, 6 y 7) las cuales hidrolizan sustratos selectivos.

La activación de las caspasas puede tener lugar en respuesta a estímulos tanto extracelulares como intracelulares. Éstas hidrolizan secuencias específicas de tetrapéptidos que contienen un residuo aspartato. Entre sus sustratos se encuentran: elementos del citoesqueleto (actina, fodrina, proteína Tau y catenina), enzimas encargadas de reparar (PARP) o degradar (ADNasa) el ADN celular, factores de transcripción (retinoblastoma, HDM2), proteínas reguladoras (proteína cinasa C, fosfatasa 2A, cinasas de adhesión focal), así como miembros de la familia del oncogén Bcl-2 (Bid).

El estudio de los procesos de muerte celular nos permite también poder activarla en poblaciones de células no deseadas, como es el caso del cáncer.

Apoptosis de neuronas cerebelares *in vivo*

Generalmente se asume que la mitad de las neuronas producidas durante la neurogénesis mueren antes de la maduración del Sistema nervioso central. Todos los diferentes tipos de neuronas son producidas en exceso durante este periodo de desarrollo.

Existen dos periodos apoptóticos en estas poblaciones:

- 1 . Al inicio de la neurogénesis y no se relaciona a la formación de sinapsis.
2. Relacionado a las neuronas postmitóticas.

La muerte de las neuronas de la capa granular externa ha sido ampliamente estudiada tanto *in vivo* como *in vitro*. Se han demostrado 2 fases de muerte celular consecutivas que afectan a las células granulares cerebelosas: pre y post migratoria.

La fase premigratoria afecta a la célula progenitora de la capa granular externa.

No se ha dilucidado cual via apoptótica se activa durante el proceso de muerte neuronal.

Estudios hechos en primates demostraron que las caspasas 3 y 9 se expresan en la zona ventricular telencefálica y que la activación experimental de caspasa 3 es responsable de la muerte de células progenitoras. Esto demuestra que las células progenitoras neuronales pueden utilizar la vía dependiente de caspasas. Aun así, algunos experimentos *in vitro* evidenciaron que los inhibidores de caspasas eran incapaces de impedir la muerte de células granulares.

Esto formula una interrogante: ¿El bloqueo de la apoptosis por inhibidores transcripcionales está relacionado con la activación de ciertos componentes de la maquinaria del ciclo celular?

III. OBJETIVOS

III.I OBJETIVO PRINCIPAL

Determinar la vía apoptótica involucrada en la maduración de la corteza cerebelosa neonatal del humano.

III.II OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Determinar la expresión de caspasa-3 y p53 en las capas de la corteza cerebelar neonatal del humano con énfasis especial en la capa gr~mular externa.
2. Relacionar la expresión de caspasa-3 y p53 con la edad gestacional de los neonatos.

IV. JUSTIFICACIÓN

IV. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la relación entre los eventos apoptóticos presentes durante la neurogenesis y la maduración de la corteza cerebelosa posnatal en el humano no están completamente dilucidados, es necesario realizar más estudios para conocer el papel de otras vías de apoptosis además de la vía de p53.

V. HIPÓTESIS

V. HIPÓTESIS

Las células granulares de la capa granular externa de la corteza cerebelosa neonatal del humano mostrarán predominantemente una activación de caspasa-3.

VI HIPÓTESIS NULA

VI. HIPÓTESIS NULA

Las células granulares de la capa granular externa de la corteza cerebelosa neonatal del humano no mostrarán una activación de caspasa-3.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

VII.I MATERIALES

Realizamos un estudio observacional, retrospectivo, descriptivo y transversal. Se identificaron y seleccionaron 50 bloques de parafina y las laminillas de cerebelos de autopsias de neonatos del archivo del Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario "José E. González", UANL.

La búsqueda de casos se realizó a través de los diarios de autopsias pediátricas. Como criterios de búsqueda se utilizaron: autopsias pediátricas de pacientes neonatos independientemente de su grado de prematurez, evitando ¹ seleccionar casos diagnosticados como "autolisis masiva" ya que no eran candidatos a ser sujetos de análisis por método de inmunohistoquímica. Los casos incluidos corresponden a los que pertenecen al periodo comprendido entre Enero del 2012 a Diciembre 2016. Se elaboró una base de datos en Excel especificando: sexo, edad gestacional y folio.

Los mecanismos de confidencialidad del estudio fueron los siguientes:

- El primero tiene que ver con el acceso a la información de los diarios de autopsias pediátricas el cual solo está disponible para el investigador principal y 2 de los co-investigadores; personas ajenas a este estudio no conocieron la identidad de los sujetos que fueron estudiados.
- El segundo comprende al acceso a los resultados del estudio los cuales solo fueron discutidos entre el investigador principal y uno de los co-investigadores (tesista), exclusivamente.

Las instalaciones donde se llevarán a cabo los experimentos comprenden el laboratorio central y el laboratorio de inmunohistoquímica del Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario "José Eleuterio González" de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Dicho esto, se buscaron y recolectaron las laminillas de cortes histológicos teñidos con la técnica de H y E de cada uno de los casos.

Paso seguido, con ayuda del director de tesis se seleccionaron las áreas correspondientes a la corteza cerebelosa neonatal en las cuales se pudiera determinar

e identificar. capa granular externa, capa molecular, capa de neuronas de Purkinje y capa granular interna.

VII.II CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Inclusión:

- Contar con bloques de parafina y laminillas de cerebelos producto de autopsia de pacientes neonatos en buen estado.

Exclusión:

- No contar con bloques de parafina y laminillas de cerebelos producto de autopsia de pacientes neonatos.
- Material en mal estado.

VII.III METODOLOGÍA

Preparación de matrices de tejido

Utilizando una aguja por sacabocado se extrajo de los bloques de parafina de los casos seleccionados las áreas que fueron sometidas a estudio inmunohistoquímico. Se agregaron a cada matriz de tejido un control positivo (amígdala palatina) y uno negativo (páncreas).

Método de corte con microtomo y tinción histológica

Una vez realizados los bloques de parafina, se obtuvieron cortes seriados de 5 μ m de espesor, mediante un microtomo de la marca Leica®. Las secciones se desparafinizaron en xilol, se hidrataron en alcoholes de concentraciones decrecientes y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (H&E), siguiendo los métodos histológicos habituales. Las preparaciones de H&E recién teñidas se aclararon en agua destilada.

Como método de montaje para todas las técnicas histológicas se utilizó la resina sintética Entellan Merck®.

Método inmunohistoquímico

Se utilizó el método inmunohistoquímico de Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa para evaluar la expresión de las moléculas de manera cuantitativa y cualitativa. En la Técnica Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (EBP) se obtienen cortes de 5 µm de grosor del material incluido en parafina y se colocan en portaobjetos tratados previamente con L-polilisina (Sigma, St Louis) durante 24 horas con el fin de adherir mejor el corte al portaobjetos. Las secciones se procesan con el método de Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (Complejo EBP), siguiendo el método general inmunohistoquímico, descrito por Hsu et al., con las modificaciones habituales de nuestro laboratorio, que se especifican a continuación: se realiza la desparafinación completa de las secciones, seguido de la hidratación en alcoholes decrecientes hasta el agua destilada. A continuación se procede a la inhibición de la peroxidasa endógena de los tejidos mediante peróxido de hidrógeno al 3% a temperatura ambiente durante diez minutos. Los cortes se lavan en buffer fosfato (PBS) a temperatura ambiente, pH 7,4, durante 5 minutos. Se procede al desenmascaramiento del epitopo mediante tratamiento por calor; para ello, las preparaciones se introducen en buffer citrato a pH 7,6 y se realiza el tratamiento con microondas en dos pases de 2,5 minutos, procurando que las preparaciones no lleguen a hervir, y enfriando las mismas entre cada uno de los pases. Posteriormente, las preparaciones se dejan reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación se realiza un lavado rápido, dos minutos, en H₂O destilada para retirar el sobrenadante de buffer citrato. Lavamos las preparaciones en dos pases de 5 minutos en buffer PBS, pH 7,4. Seguidamente realizamos el bloqueo de las inmunoglobulinas inespecíficas de los tejidos con suero bovino normal durante 20 minutos a temperatura ambiente. Extraemos el sobrenadante del suero bovino, sin lavar nunca entre este paso y el siguiente. A continuación añadimos el anticuerpo primario anti-PCPH, diluido a 1 :2000, en una solución de PBS+ BSA al 1 %. El anticuerpo primario se incuba durante toda la noche a 4 ° C en cámara húmeda. Las secciones se lavan en

tres pases de PBS, de 5 minutos cada uno, a temperatura ambiente. Se añade a las secciones, el complejo biotinilado anti-conejo, con una dilución 1 :200, durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación se lavan las preparaciones en tres pases de PBS, durante 5 minutos cada pase y a temperatura ambiente. Se incuban las preparaciones en el complejo Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (EBP) (Zymet, Ca) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Realizamos tres lavados en PBS durante 5 minutos. La inmunorreacción se revela con diaminobencidina (Sigma, St. Louis) (30 mg. de diaminobencidina en 10 ml. de buffer tris-HCl, a pH 7.4 y con H₂O₂ al 0.015 %). El tiempo de revelado con diaminobencidina es de 3 minutos. A continuación se hace una ¹ tinción nuclear con hematoxilina de Harris. Las preparaciones se lavan con abundante agua destilada, se deshidratan en etanol en concentraciones crecientes, y se montan en la resina sintética DePex. Se utilizaron los siguientes anticuerpos:

- SignalStain Apoptosis (**cleaved caspase-3**) IHC Detection Kit Cat. #12692 Cell Signalling Technology.

- **Anti-p53** (phospho 546) Antibody [EP42Y] Cat. ab76242 ABCam.

VII.IV VALORACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ANTICUERPOS

Se valoraron las inmunorreacciones para cada uno de los marcadores determinando por medio de un sistema de puntaje su intensidad:

3+ = fuerte

2+ = media

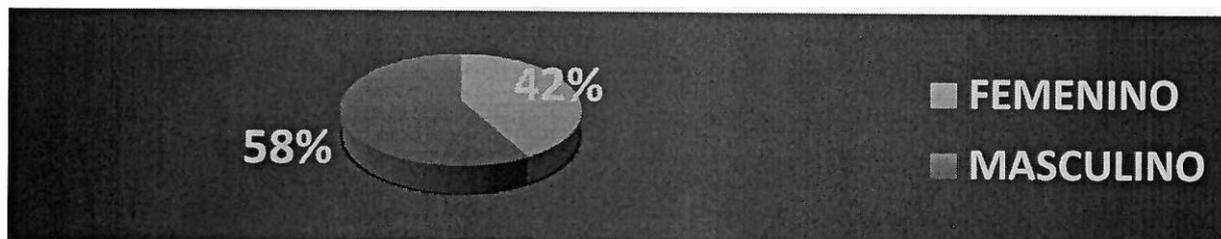
1+ = débil

Se valoró la expresión de los marcadores en las 4 capas de la corteza cerebelosa. Estos resultados se consignaron en la base de datos creada para su análisis.

VIII. RESULTADOS

VIII. RESULTADOS

De los 50 casos incluidos 29 fueron masculinos y 21 fueron femeninos.



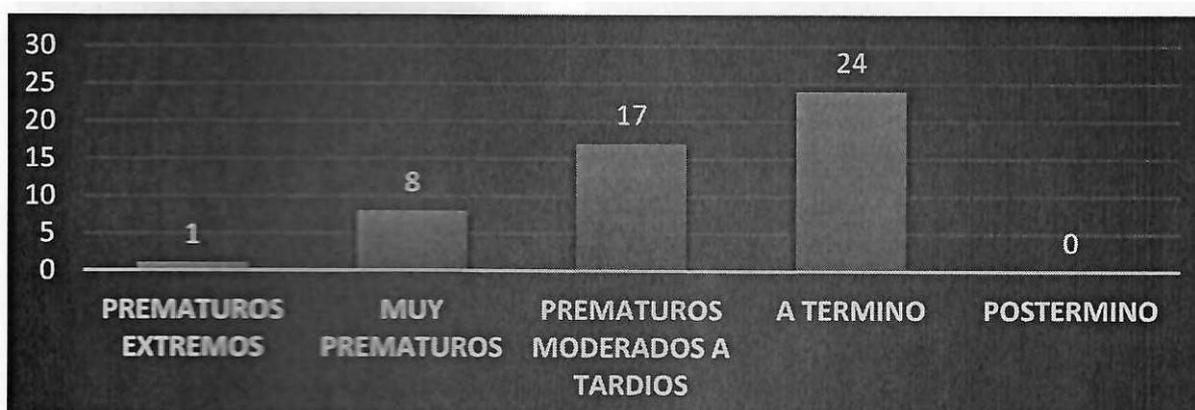
Según el grado de prematurez establecido por la OMS: <28

semanas de gestación = Prematuros extremos = 2%

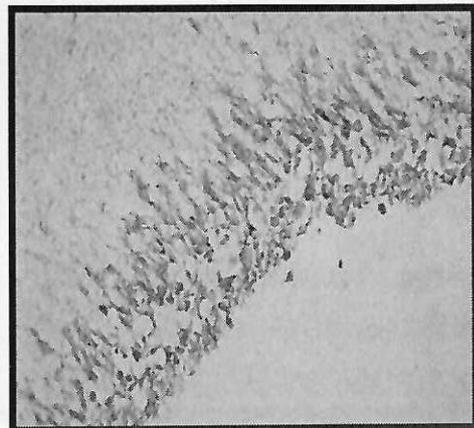
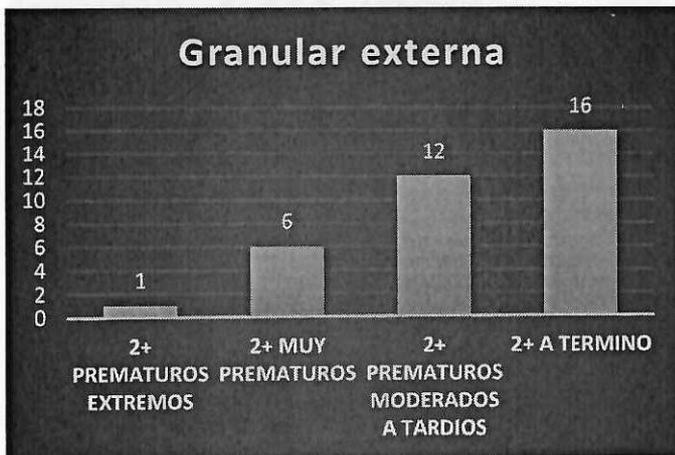
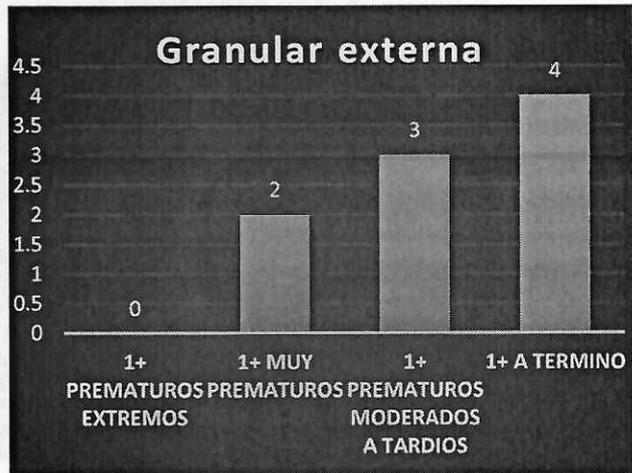
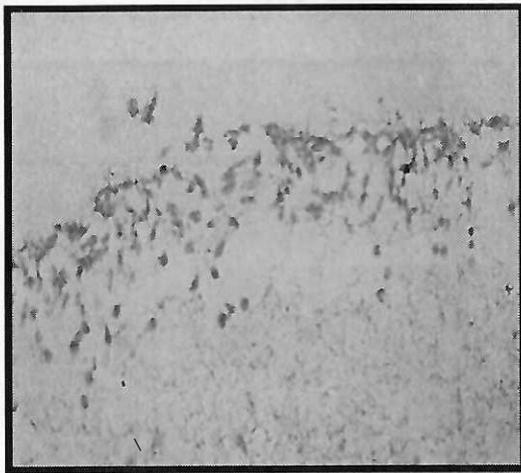
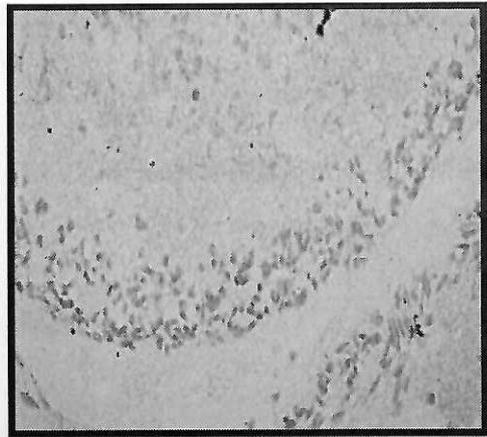
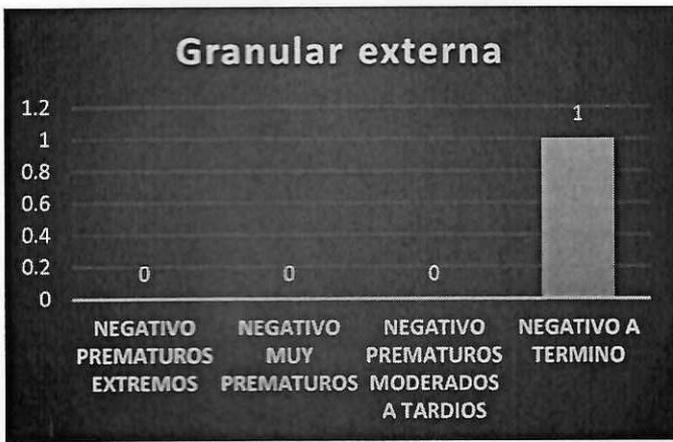
<32 semanas de gestación = Muy prematuros = 16%

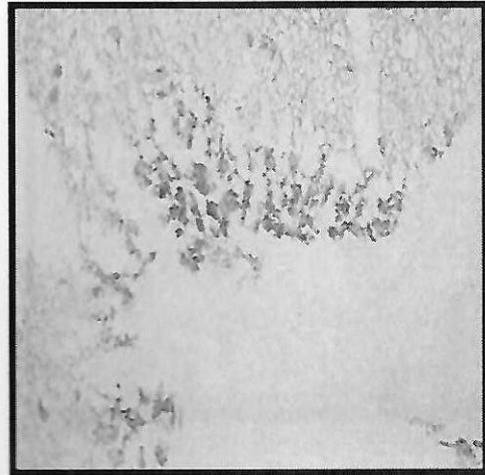
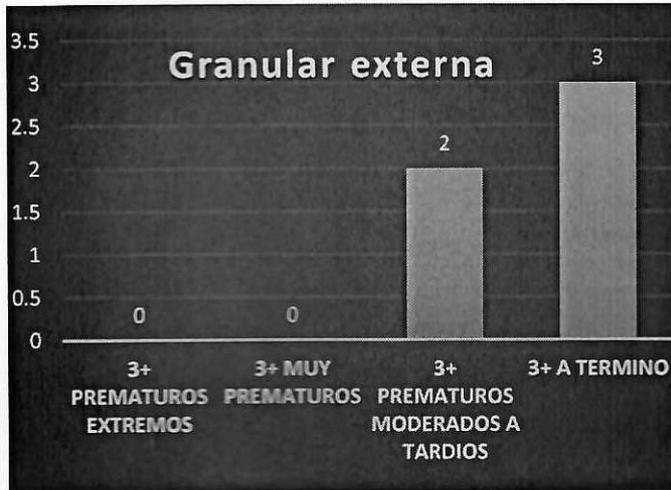
32 a <37 semanas de gestación = Prematuros moderados a tardíos = 34%

37 a <42 semanas de gestación = A término = 48%

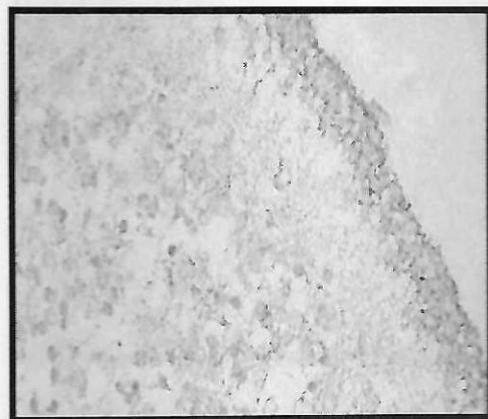
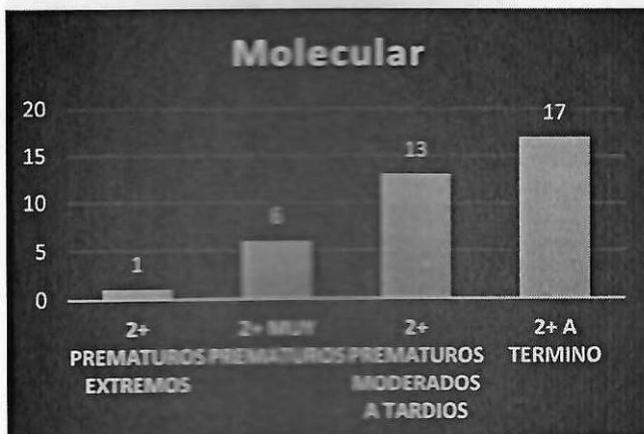
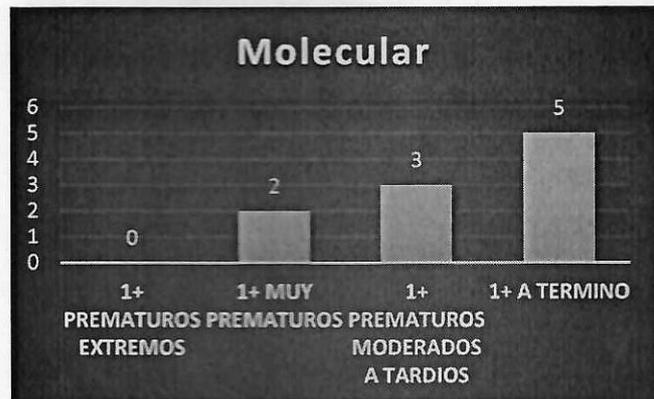
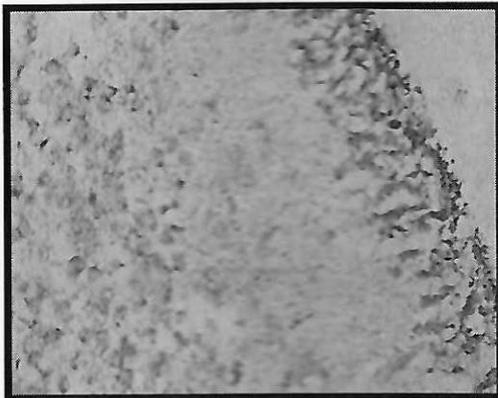


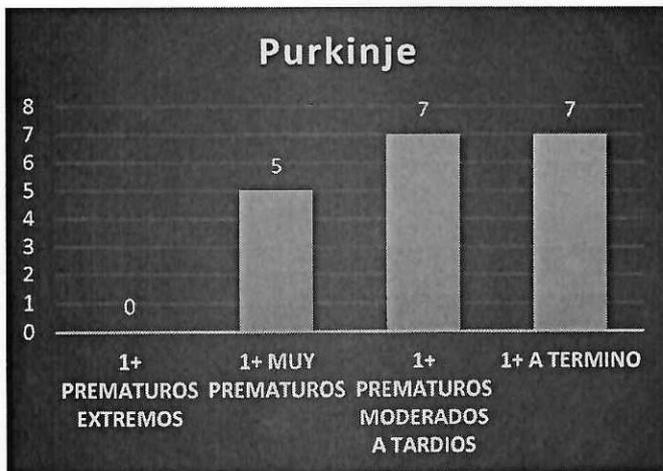
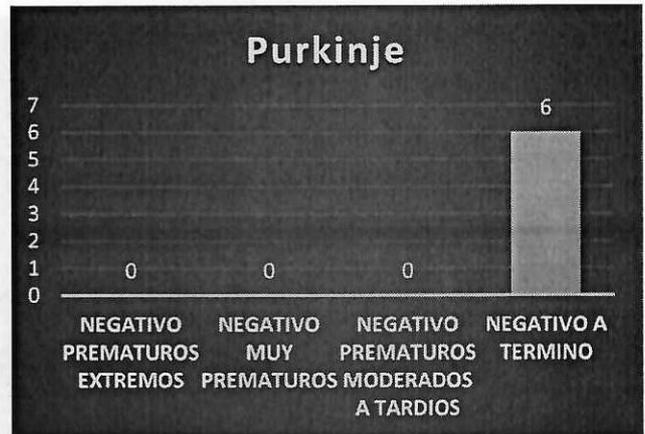
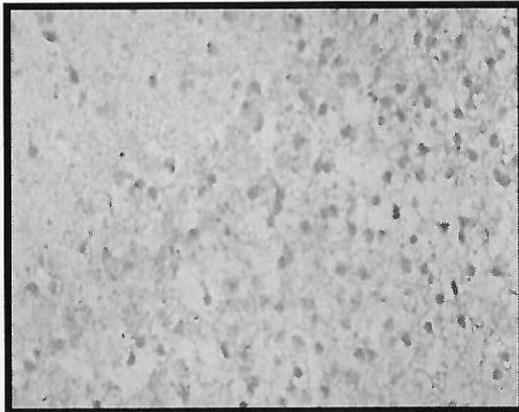
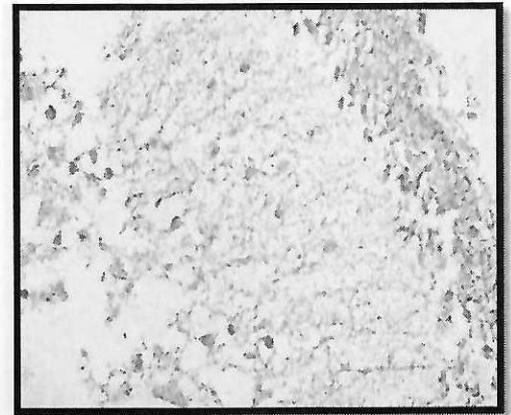
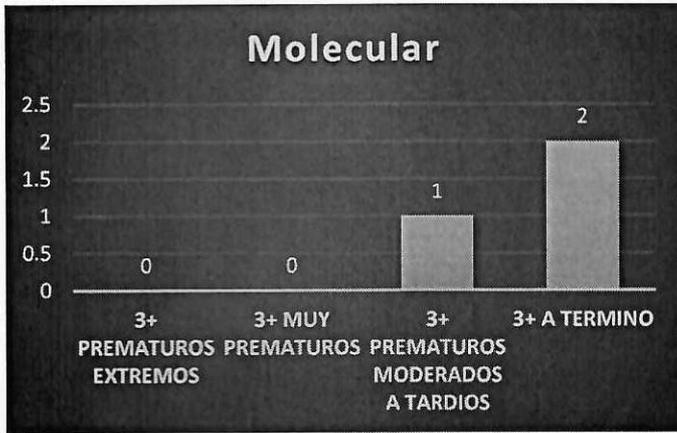
La expresión de caspasa-3 fue de intensidad variable y en todas las capas de la corteza cerebelosa con un patrón granular y citoplásmico. En los siguientes gráficos se muestran las frecuencias e intensidad de tinción para cada grupo de edad gestacional.

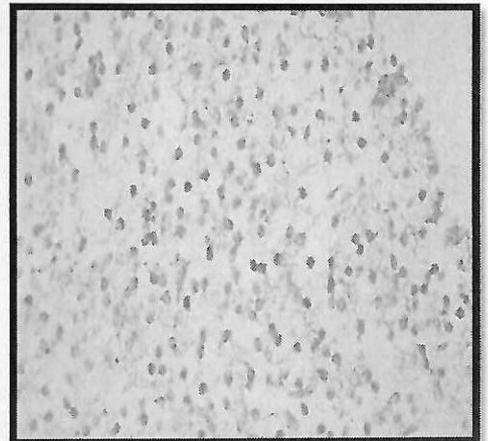
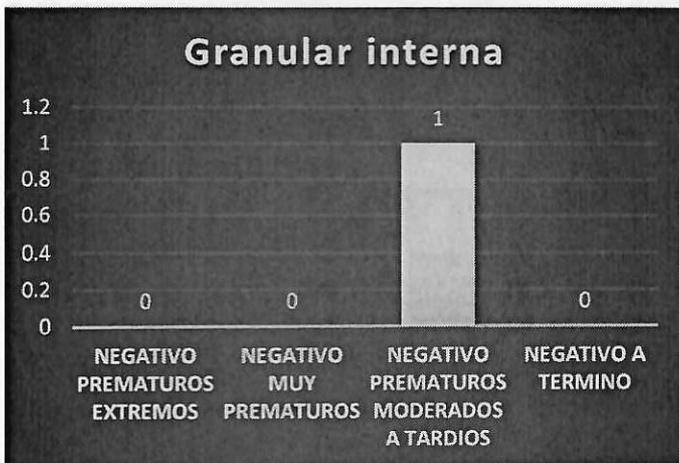
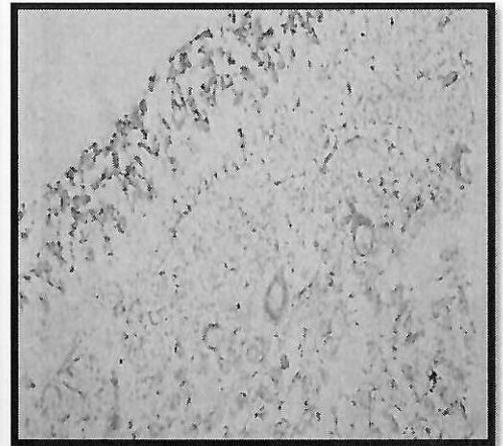
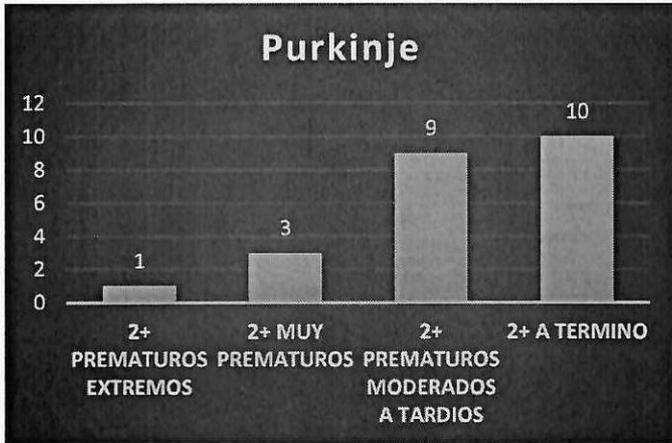


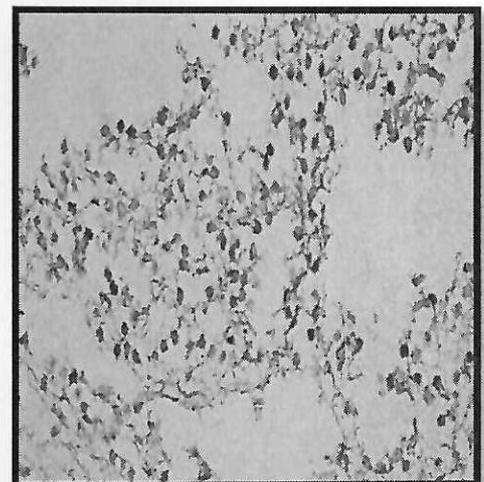
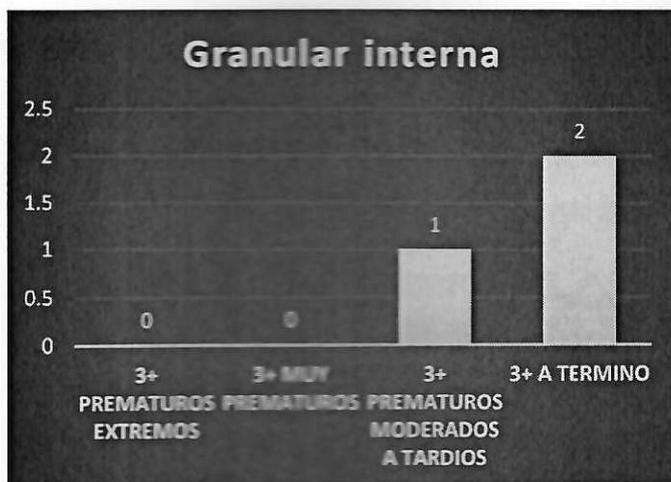
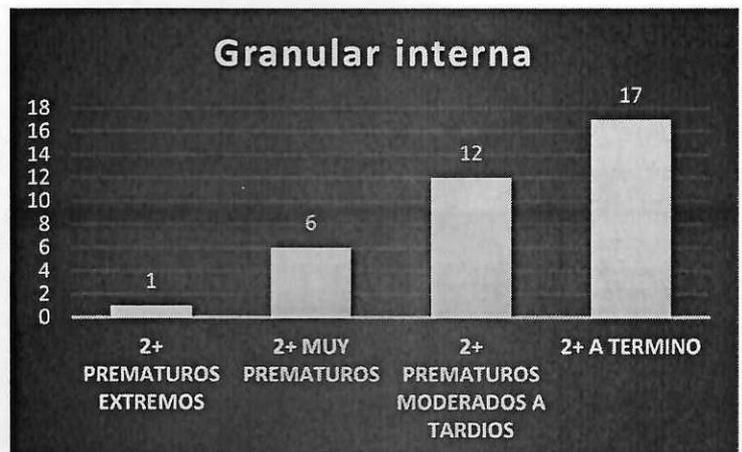
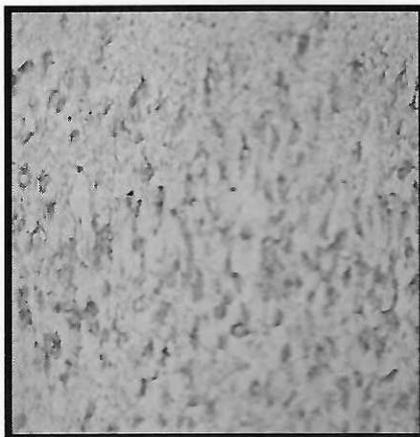
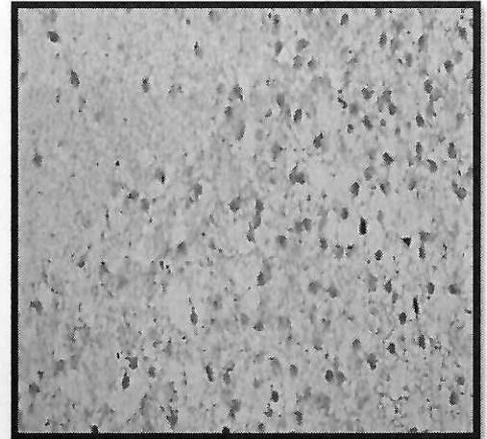


En la capa molecular todos los casos presentaron positividad para caspasa-3.

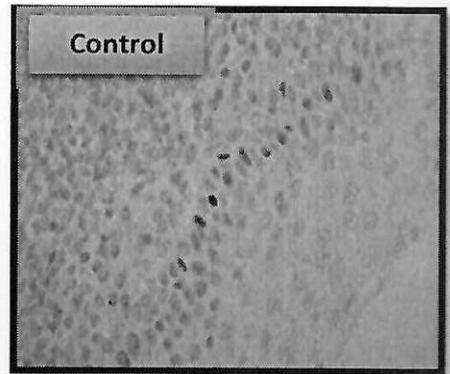
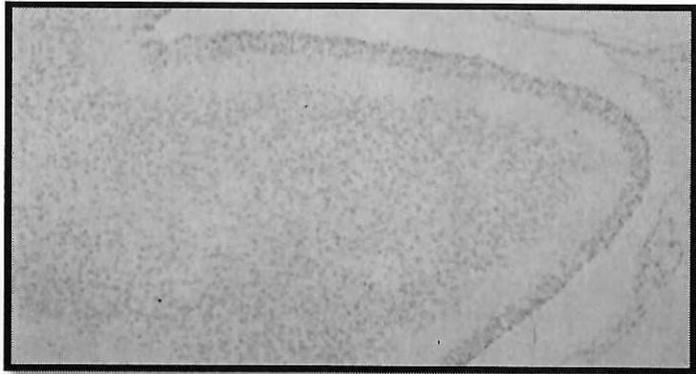








P53 resultó negativa en todos los casos.



IX. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

IX.1 DISCUSIÓN

La expresión de la Caspasa-3 fue de intensidad fuerte (3+) y moderada (2+) en las capas granular externa (18 casos, 36%) y molecular (19 casos, 38%) en los individuos a término. Los individuos con prematuridad extrema y muy prematuros (8 casos, 16%) expresaron de forma moderada (2+) y débil (1+) caspasa-3.

La expresión de la caspasa-3 fue diversa a través de las 4 capas de la corteza cerebelosa lo cual apunta a una relación estrecha entre la actividad de esta proteasa con la apoptosis neuronal.

Parte de los mecanismos de acción de p53 se relacionan con el arresto del ciclo celular, la senescencia celular y a poptosis. La negatividad para p53 pudiera estar relacionada con inactivación de esta vía ya que en condiciones de homeostasis se encuentra reprimida para sus controladores principlaes que son *MDM2* y *MDM4*.

p53 se activa en estados de estrés celular y pareciera no tener relación estrecha con las neurogénesis de las células granulares del cerebelo humano y su apoptosis.

IX.II CONCLUSIONES

1. p53 resultó negativo en todos los casos.
2. Caspasa-3 resultó porsitiva en la capa granular externa de 49 de los 50 casos estudiados.
3. Esta positividad fue más intensa en individuos de edad gestacional más avanzada (prematuros tardíos y a término) .
4. La capa granular externa expresó Caspasa-3 de forma predominante y con mayor intensidad en comparación con el resto de las capas de la corteza cerebelosa.

Esta vía apoptótica tiene un vínculo estrecho en la patogénesis molecular del meduloblastoma, de tal forma que pudiera ser una vía molecular candidata a un blanco terapéutico.

X. BIBLIOGRAFIA

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Apoptosis: muerte celular programada OFFARM VOI. 22 NUM. 6 JUNIO2013
2. Apoptosis of the cerebellar neurons. Lossi and Gambino *Histol Histopathol* (2008) 23: 367-380
3. Cerebellum Development and Tumorigenesis: A p53-Centric Perspective. *Trend Mol Med.* 2016 May;22(5): 404-13.
4. Increased apoptosis, p53 up-regulation, and cerebellar neuronal degeneration in repair-deficient Cockayne syndrome mice_ *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007 Jan 23;104(4):1389-94. Epub 2007 Jan 17.
5. Lack of Rb and p53 Delays Cerebellar Development and Predisposes to Large Cell Anaplastic Medulloblastoma through Amplification of N-Myc and Ptch2. *Cancer Res.* 2006 May 15;66(10):5190-200.
6. Mdm4 and dm2 cooperate to inhibit p53 activity in proliferating and quiescent cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Feb 28;103(9):3232-7. Epub 2006 Feb 21.
7. p53 in the CNS: Perspectives on Development, Stem Cells, and Cancer. *Genes Cancer.* 2011 Apr;2(4):431- 42.
8. The p53 Inhibitor MDM2 Facilitates Sonic Hedgehog-Mediated Tumorigenesis and Influences Cerebellar Foliation. *PLoS One.* 2011 Mar 18;6(3):e17884.
9. Activation of a caspase 3-related cysteine protease is required for glutamate-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Oct 14; 94(21):11657-62.
10. Caspase-3 Expression by Cerebellar Granule Neurons Is Regulated by Calcium and Cyclic AMP. *J Neurochem.* 1999 Aug; 73(2):568-77.
11. Death without caspases, caspases without death. *TRENDS in Cell Biology Vol.14 No.4 April 2004.*
12. Ex vivo imaging of active caspase 3 by a FRET-based molecular probe demonstrates the cellular dynamics and localization of the protease in cerebellar granule cells and its regulation by the apoptosis-inhibiting protein survivin. *Mol Neurodegener.* 2016 Apr 28; 11 :34.
13. Improved Detection of Apoptotic Cells in Archived Paraffin Sections: Immunohistochemistry Using Antibodies to Cleaved Caspase 3. *J Histochem Cytochem.* 2002 Apr;50(4):449-54.
14. In situ immunodetection of activated caspase-3 in apoptotic neurons in the developing nervous system. *Cell Death and Differentiation* (1998) 5, 1004 ± 1016.
15. Interleukin-10 Prevents Glutamate-Mediated Cerebellar Granule Cell Death by Blocking Caspase-3-Like Activity. *The Journal of Neuroscience,* May 1, 2001, 21(9):3104-3112.
16. Involvement of a Caspase-3-Like Cysteine Protease in 1-Methyl-4-Phenylpyridinium-Mediated Apoptosis of Cultured Cerebellar Granule Neurons. *J Neurochem.* 1997 Oct;69(4):1382-8.
17. Neuronal Apoptosis in the Developing Cerebellum. *Anal. Histol. Embryol.* 40 (2011) 21-27.
18. Non-apoptotic expression of active caspase-3 during rat cerebellar development.
19. Programmed Cell Death of Developing Mammalian Neurons after Genetic Deletion of Caspases. *The Journal of Neuroscience,* July 1, 2001, 21 (13):4752-4760.
20. The role of Bax and caspase-3 in doppel-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *Prion.* 2012 Jul 1 ;6(3):309-16.
21. A Time to Kill: Targeting Apoptosis in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 2942-2955.
22. APOPTOSIS (PROGRAMMED CELL DEATH) -A REVIEW. Anita et al. *World Journal of Pharmaceutical Research.*
23. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4): 495-516.
24. Apoptosis in Cancer - An Update. *Asian Pacific J Cancer Prev,* 13 (10), 4873-4878.
25. Apoptosis of the cerebellar neurons. *Histol Histopathol* (2008) 23: 367-380.
26. Cellular Commitment in the Developing Cerebellum. *Front Cell Neurosci.* 2015 Jan 12;8:450.
27. Cerebellar granule cells: Insights into proliferation, differentiation, and role in medulloblastoma **pathogen** .. , *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41 (2009) 435-445.
28. Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signaling Pathway Review. *Cell Death Dis.*