

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019



## COMPARACIÓN DEL FINE-FIX CON EL FORMOL EN TÉCNICA LA DE INMUNOHISTOQUIMICA

**Michelle Valentina Arias Celi  
Nicol Natalia García Vargas**

**FUNDACIÓN UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD-FUCS  
PROGRAMA CITOLOGÍA  
BOGOTA, D.C 2021**

DIVISION DE INVESTIGACIONES

Página

1 de 97

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

**COMPARACIÓN DEL FINE-FIX CON EL FORMOL EN LA TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUIMICA**

**Nicol Natalia García Vargas  
Michelle Valentina Arias Celi**

**ASESORES**

**Martha Patricia Isaza Cortes  
José Fernando Polo Nieto**

**ASESOR METODOLÓGICO  
Andrés Daniel Gallego Ardila**

**FUNDACIÓN UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD-FUCS  
PROGRAMA CITOLOGÍA  
BOGOTA, D.C 2021**

DIVISION DE INVESTIGACIONES

Página

2 de 97

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

<b>Título: COMPARACIÓN DEL FINE FIX CON EL FORMOL EN LA TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA. Estudio piloto</b>	
<b>Investigador Principal:</b> Martha Patricia Isaza Cortes* Dr. José Fernando Polo Nieto*	<b>Filiación Institucional:</b> Docentes
<b>Correo electrónico:</b> mpisaza@fucsalud.edu.co jfpolo@fucsalud.edu.co	<b>Teléfono Celular:</b> 3006988383 3016433695
<b>Dirección de correspondencia:</b> mpisaza@fucsalud.edu.co	
<b>Co investigadores:</b>  Michelle Valentina Arias Celi Correo electrónico: mvarias@fucsalud.edu.co Teléfono celular: 3196599050  Nicol Natalia García Vargas Correo electrónico: nngarcia@fucsalud.edu.co Teléfono celular: 3213919011 Filiación Institucional: Estudiantes	

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

<b>Dirección de correspondencia:</b> mvarias@fucsalud.edu.co	
<b>* Nombre del Grupo de Investigación: Grupo LAC</b>	<b>Total de Investigadores: 4</b>
<b>**Semillero de Investigación que presenta la propuesta</b>	Total de semilleros vinculados. 1
<b>Línea de Investigación:</b> Célula y Tejido- Histología	
<b>Programa Cito histología</b>	
<b>Asesor Metodológico:</b> Dr. Andrés Daniel Gallego	
<b>Área o Servicio:</b> Coordinador de Pregrado y Semilleros de Investigación. División Investigación Fundación Universitaria Ciencias de la Salud.	
Duración: 12 meses	
Costo Total: Desembolsable: No desembolsable	
El proyecto será presentado a convocatoria interna: Si: x	
<b>Descriptor / Palabras claves:</b> Inmunohistoquímica, sustrato - cromógeno, enzima, marcador tumoral, Formol, FINE- FIX.	
<b>Fecha de Radicación:</b> 07-10-21	

	<b>FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD</b>	<b>VERSIÓN 02</b>
	<b>FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>CODIGO: F-PI-FEP-03</b>
	<b>GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>FECHA 02-05-2019</b>

## TABLA DE CONTENIDO

1. Presentacion.....	11
1.1 Fecha de revisión .....	11
1.2 Propósito .....	11
2. Tabla de contenido.....	12
3. Resumen del proyecto.....	12
4. Palabras claves.....	15
5. Descripción del proyecto.....	17
6. Marco teorico.....	17
6.1 Anticuerpos monoclonales.....	20
6.1.1 Inmunización repetida al ratón .....	21
6.1.2 Obtención del bazo.....	21
6.1.3 Generación del Hibridoma .....	23
6.1.4 Selección y cultivo del Hibridoma .....	23
6.1.5 Obtención del Hibridoma específico .....	23
6.1.6 Producción de Anticuerpos monoclonales .....	23
6.1.7 Obtención de Anticuerpos monoclonales .....	24
6.2 Anticuerpos Policlonales.....	25
6, 2,1 Preparación de Ag.....	25
6.2.2 Selección del animal a inmunizar .....	25
6.2.3 Vía de inoculación.....	26
6.2.4 Protocolo de inmunización .....	26
6.3 Ventajas e inconvenientes de los anticuerpos monoclonales.....	28
6.4 Ventajas de los anticuerpos policlonales .....	28
6.5 Técnica de la inmunohistoquímica.....	29
6.5.1 Peroxidasa.....	29
6.5.2 Fosfatasa alcalina .....	30
6.6 Pasos clave a seguir.....	32
6.6.1 Preparación de la muestra .....	32
6.6.2 Recuperación de epítomos .....	34
6.6.3 Permeabilización .....	35
6.6.4 Bloqueo .....	36
6.7 Escoger el anticuerpo primario .....	37
6.8 Detección .....	39

DIVISION DE INVESTIGACIONES

Página

5 de 97

	<b>FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD</b>	<b>VERSIÓN 02</b>
	<b>FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>CODIGO: F-PI-FEP-03</b>
	<b>GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>FECHA 02-05-2019</b>

6.8.1	Método indirecto con peroxidasa-antiperoxidasa.....	40
6.8.2	Sistema ABC: Avidina-Biotina .....	41
6.8.3	Sistema LSAB (labeled streptavidin-biotin) .....	42
6.8.4	Sistema de aplicación de polímeros de dextrano .....	42
6.9	Controles .....	43
6.10	Sistema de lectura .....	46
6.10.1	Sistema de puntuación y evaluación .....	46
6.10.2	Sistema de puntuación por ER, PR .....	47
6.11	Marcadores de <u>Inmunohistoquímica</u> .....	49
6.11.1	Clasificación de los marcadores tumorales .....	49
6.11.1.1	Clasificación según su origen.....	50
6.11.1.2	Por su utilidad clínica.....	50
6.12	ACL, CD 45.....	54
6.13	AE1/AE3.....	54
6.14	TF1.....	55
6.15	CD 20.....	56
6.16	CD 3.....	56
6.17	Ki 67.....	57
6.18	ACTINA.....	58
6.19	DESMINA.....	59
6.20	S-100.....	60
6.21	PAX 8.....	61
7.	Objetivos generales.....	62
8.	Objetivos específicos.....	62
9.	Metodología.....	6.2
10.	Criterios de selección.....	63
10.1	Criterios de inclusión.....	63
10.2	Criterios de exclusión.....	63
11	Muestreo.....	65

	<b>FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD</b>	<b>VERSIÓN 02</b>
	<b>FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>CODIGO: F-PI-FEP-03</b>
	<b>GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>FECHA 02-05-2019</b>

13. Estrategia de reclutamiento.....	66
14. Definición de variables.....	67
15. Criterios de calidad.....	72
16. Seguimiento.....	73
17. Sesgos.....	73
17.1 En caso de perder una muestra .....	75
17.2 En caso de realizar inadecuadamente la Inmunohistoquímica .....	76
18. Ventajas y desventajas de la técnica.....	77
19. Beneficios.....	77
20. Instrumentos de medición.....	78
21. Plan de análisis.....	78
22. Consideraciones éticas.....	79
23. Criterios de investigación.....	83
24. Resultados esperados ,,.....	83
24.1 Productos.....	83
24.2 Potenciales beneficiarios.....	84
25. Impactos esperados .....	84
26. Grupo de investigación.....	85
27. Cronograma.....	86
28. Presupuesto .....	87
Bibliografía	
Anexos	

	<b>FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD</b>	<b>VERSIÓN 02</b>
	<b>FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>CODIGO: F-PI-FEP-03</b>
	<b>GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>FECHA 02-05-2019</b>

## LISTA DE GRAFICAS

1. Grafica 1: historia de la inmunohistoquímica.....	19
2. Grafica 2: reacción peroxidasa-peróxido.....	31
3. Grafica 3: fosfatasa alcalina.....	32
4. Grafica 4: epítipo enmascarado con una red, tras la fijación.....	36
5. Grafica 5: Recuperación.....	36
6. Grafica 6: permeabilización celular.....	37
7. Grafica 7: proceso bloqueo peroxidasa endógena .....	39
8. Grafica 8: titulación de anticuerpos .....	41
9. Grafica 9: complejo de detección .....	43
10. Grafica 10: complejo avidina biotina .....	44
11. Grafica 11: complejo streptavidina-biotina (LSAB).....	44
12. Grafica 12: sistema de revelado en polímero de dextrano.....	45

## LISTA DE IMÁGENES

1. Imagen 1: epítipo específico .....	22
2. Imagen 2: inoculación intraperitoneal .....	22
3. Imagen 3: activación de linfocitos B por un antígeno .....	22
4. Imagen 4: generación de anticuerpos monoclonales.....	24
5. Imagen 5: virus covid-19(escogencia de AG) .....	25
6. Imagen 6: generación de anticuerpos policlonales .....	27
7. Imagen 7: enzima peroxidasa .....	31
8. Imagen 8: fosfatasa alcalina .....	32
9. Imagen 9: linfoma cutáneo.....	36

DIVISION DE INVESTIGACIONES

Página

8 de 97

	<b>FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD</b>	<b>VERSIÓN 02</b>
	<b>FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>CODIGO: F-PI-FEP-03</b>
	<b>GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>FECHA 02-05-2019</b>

<b>10.</b>	Imagen 10: Sustancia amiloide .....	38
<b>11.</b>	Imagen 11: ACL-CD45 positivo.....	56
<b>12.</b>	Imagen 12: ACL-CD45 negativo.....	56
<b>13.</b>	Imagen 13: AE1/AE3 positivo.....	57
<b>14.</b>	Imagen 14: AE1/AE3 negativo .....	57
<b>15.</b>	Imagen 15: TTF1 positivo.....	58
<b>16.</b>	Imagen 16: TTF1 negativo.....	58
<b>17.</b>	Imagen 17: CD20 positivo.....	59
<b>18.</b>	Imagen 18: CD20 negativo.....	59
<b>19.</b>	Imagen 19: CD3 positivo .....	60
<b>20.</b>	Imagen 20: CD3 negativo.....	60
<b>21.</b>	Imagen 21: Ki67 positivo.....	61
<b>22.</b>	Imagen 22: Ki67 negativo.....	61
<b>23.</b>	Imagen 23: Actina positivo.....	62
<b>24.</b>	Imagen 24: Actina negativa.....	62
<b>25.</b>	Imagen 25: Desmina positivo.....	63
<b>26.</b>	Imagen 26: Desmina negativo .....	63
<b>27.</b>	Imagen 27: S100 positivo .....	63
<b>28.</b>	Imagen 28: S100 negativo .....	63
<b>29.</b>	Imagen 29: PAX 8 positivo .....	64
<b>30.</b>	Imagen 30: PAX8 negativo.....	64
<b>31.</b>	Imagen 31: patrones de la inmunotensión celular .....	73

	<b>FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD</b>	<b>VERSIÓN 02</b>
	<b>FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>CODIGO: F-PI-FEP-03</b>
	<b>GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>FECHA 02-05-2019</b>

### LISTA DE TABLAS

1. Tabla 1: protocolo de inmunización .....	26
2. Tabla 2: ventajas e inconvenientes de los anticuerpos monoclonales.....	28
3. Tabla 3: ventajas e inconvenientes de los anticuerpos policlonales .....	29
4. Tabla 4: anticuerpos tejidos y su localización .....	55
5. Tabla 5: definición de grupos .....	66
6. Tabla 6: tejidos a procesar .....	67
7. Tabla 7: marcadores utilizados .....	67
8. Tabla 8: variables .....	71
9. Tabla 9: sesgos .....	76
10. Tabla 10: ventajas y desventajas de la técnica Inmunohistoquímica .....	78
11. Tabla 11: cronograma de actividades y los responsables .....	87
12. Tabla 12: presupuesto global .....	89
13. Tabla 13: presupuestos detallados por rubros.....	90

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

## 1. PRESENTACIÓN

### 1.1 FECHA DE REVISIÓN DE VERSIÓN:

### 1.2 PROPÓSITO

El formaldehído es un fijador económico y de fácil acceso, con característica bioquímica reductora para tejidos, evitando el choque osmótico, autólisis por auto digestión enzimática y la putrefacción del tejido, es altamente tóxico e irritante para ojos, nariz y garganta, (a partir de concentraciones de entre 0,4 y 3 ppm), también puede producirse degeneración y necrosis de las capas mucosas y epiteliales de las células, posee propiedades genotóxicas en humanos y en animales de laboratorio produciendo aberraciones en los Cromosomas. (6). Se utiliza al 10%, pH 7,0 (10ml de la solución de formol a 90 ml de solución tamponada de fosfato de Soresen) a pH 7.

Por esto se han realizado estudios con el ánimo de cambiar el formol por el sustituto FINE-FIX (Milestone), que cumple con las mismas características de fijación, conservación celular y excelente calidad del material genético sin ser tóxico, está constituido por Alcohol de polivinilo + Glicol de polipropileno + D-Sorbitol + etanol.

El propósito de este proyecto es sustituir el formol, se pretende demostrar la utilidad y características fisicoquímicas del sustituto FINE-FIX® (Milestone), en la tóxico determinación de marcadores antigénicos y proteínas específicas, reflejadas en la claridad y sensibilidad de la técnica, para cada tejido. Estos parámetros serán

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

evaluados en forma paralela con los resultados obtenidos en tejidos fijados con formol y procesados bajo las mismas condiciones, demostrando así la viabilidad del sustituto utilizado. (3).

## 2. TABLA DE CONTENIDO:

3. Resumen del proyecto.
4. Palabras claves.
5. Descripción del proyecto.
6. Marco teórico.

## 3. RESUMEN DEL PROYECTO

La técnica de Inmunohistoquímica nació en el año 1940, a lo largo de los años, ha adquirido un gran valor en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de diversas patologías, por identificar detalladamente inmunofenotipos de las alteraciones moleculares hasta su morfología; esta facilidad, para visualizar in-situ estos cambios a nivel genético, permite identificar estructuras celulares, proteínas receptoras en la superficie de las células cancerosas, facilitando un diagnóstico utilizando marcadores pronóstico y predictivos en circunstancias como :

- Clasificación de carcinomas, linfomas, de acuerdo a su linaje u origen.
- Diferenciación de un tumor maligno o benigno.
- Establecer si el tumor es primario o si son secundarios metastásicos.
- Tipificación de tumores en su estirpe: epitelial (carcinomas), tejidos blandos (sarcomas), hemolinfoides (linfomas).
- Determinar si una lesión está localizada o es invasora.

	<b>FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD</b>	<b>VERSIÓN 02</b>
	<b>FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>CODIGO: F-PI-FEP-03</b>
	<b>GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>FECHA 02-05-2019</b>

La Inmunohistoquímica comprende técnicas histológicas e inmunológicas, se basa en el uso de anticuerpos primarios, específicos, monoclonales (Reconocen y se ligan a un único epítipo del antígeno en el tejido) y secundarios o policlonales (Reconocen y se unen a diferentes epítipos de un mismo antígeno en la reacción), ésta reacción antígeno-anticuerpo es revelada por medio de un sistema de detección enzimática, permitiendo identificar proteínas o marcadores antigénicos en tejidos en fresco o fijados e incluidos en parafina, para luego ser observados como precipitados coloreados en el microscopio óptico. (7)

Generalmente en esta técnica, los anticuerpos monoclonales o policlonales utilizados son clase IgG, por medio de sus parátomos se ligan a los epítipos por medio de enlaces no covalentes (Cargas electrostáticas positivas presentes en el anticuerpo y cargas negativas presentes en el antígeno), fuerzas de Vander Waals, puentes de Hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, también durante el procedimiento se ligan entre sí los mismos anticuerpos utilizados, esta unión se realiza con el parátomo del primer anticuerpo al Fc del segundo, es de tipo reversible y durante el desarrollo de la técnica estas uniones se pueden disociar al realizar los procesos indispensables de lavado.

Es un procedimiento complejo, en el cual influyen múltiples parámetros para la obtención de resultados óptimos, a continuación, se mencionan algunos de ellos:

- Obtención óptima de la muestra o tejido.
- Tiempo de isquemia: es el tiempo que transcurre entre la interrupción del flujo sanguíneo al inicio de la fijación, si este tiempo se prolonga el tejido se acidifica, disminuyendo su inmunoreacción. (7).

	<b>FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD</b>	<b>VERSIÓN 02</b>
	<b>FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>CODIGO: F-PI-FEP-03</b>
	<b>GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>FECHA 02-05-2019</b>

- Fijación: proceso utilizado para preservar tejidos de la autólisis y putrefacción al inactivar las enzimas lisosomales e inhibir el crecimiento de bacterias y hongos, de esta forma permite conservar la morfología celular, pero este proceso altera la composición química y física de los tejidos, el formol, puede producir aldehídos que enmascaran el sitio de reacción Ag-Ac, si esta fijación con formol es muy prolongada al tratar los tejidos con enzimas proteolíticas como tripsina o pepsina se puede evidenciar los sitios antigénicos. El FINE-FIX es un fijador que preserva determinantes antigénicos. (7)
- Tiempos, temperaturas, pH, son factores relacionados con la calidad de los reactivos durante su almacenamiento y durante el desarrollo del proceso.
- Recuperación antigénica: durante la fijación, ocurre la reticulación intramolecular con formación de complejos de calcio que enmascaran los epítomos, al colocar el tejido en buffer de citrato y a temperaturas entre 95-120°C se rompen las cadenas de calcio y se desenmascara el antígeno permitiendo su localización con los anticuerpos específicos. (13)
- Bloqueo de enzimas endógenas utilizando Peróxido de Hidrógeno.
- Detección antigénica: por método directo se utilizan anticuerpos monoclonales y en la indirecta se utilizan anticuerpos monoclonales y secundarios conjugados, dependiendo de su selección y concentración inadecuada, por exceso o por defecto, pueden mostrar una variabilidad en el resultado en el rango de negativo a positivo o a la inversa, falseando la determinación del antígeno específico. (1).

	<b>FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD</b>	<b>VERSIÓN 02</b>
	<b>FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>CODIGO: F-PI-FEP-03</b>
	<b>GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>FECHA 02-05-2019</b>

Durante el proceso de fijación dependiendo del fijador que se emplee, se puede evidenciar la pérdida de proteínas, material genético o conservación de las mismas según se utilice Formol o FINE-FIX.

Se ha observado que el formol al 10% y a un pH 7-7.4, es un fijador de tipo reticulante, que desnaturaliza las proteínas al romper los puentes de hidrogeno, creando uniones o puentes entrecruzados “cross-linking” al reaccionar con grupos funcionales (amino, sulfridilos, guaridilos, hidroxilos alifáticos, etc.) de los aminoácidos, en especial lisina, tirosina, arginina, fenilalanina y triptófano, además los grupos hidroximetileno reaccionan con grupos funcionales de otra o de la misma proteína formando puentes cruzados de metileno, dando origen a una red que enmascara los epítomos, también hidroliza los enlaces fosfodiéster del ADN, disminuyendo su cantidad y calidad y finalmente por su alto contenido de ácido fórmico aumenta la fuerza y acelera la velocidad de fijación, brindando resistencia a la acción del calor, enzimas, ácidos y álcalis, dificultando su extracción. (4).

El FINE-FIX es un fijador constituido por Alcohol de Polivinilo, Glicol de Polipropileno, D-Sorbitol y Etanol, su acción coagulante desnaturaliza de forma reversible las proteínas, manteniendo la morfología citoplasmática, permitiendo la recuperación de antígenos tisulares, nucleares e incluso se obtiene excelentes resultados desde el punto de vista morfológico al disminuir la vacuolización y picnosis nuclear. (2).

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

Se puede concluir, que para la realización exitosa de estudios histológicos y moleculares, basados en técnicas de biología molecular utilizando tejidos incluidos en bloques de parafina, es fundamental el proceso de fijación, por esta razón, en este proyecto se quiere realizar la comparación del fijador FINE-FIX con el Formol en la realización de la técnica de Inmunohistoquímica, identificando cuál es más eficaz para la conservación de las proteínas y material genético, utilizados para el diagnóstico de diferentes patologías.

#### 4. PALABRAS CLAVES

Inmunohistoquímica, sustrato - cromógeno, enzima, marcador tumoral, Formol, FINE- FIX.

#### 5. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO:

##### Formulación del problema de investigación:

Se ha observado que al realizar esta técnica en tejidos fijados con formol el grupo aldehído del formol se combina con el nitrógeno presente en las proteínas, formando un puente de metileno o "Cross Licking", (Feldman,1973), enlaces cruzados con la citosina, removiendo los átomos de hidrógeno de la proteína, haciéndola más resistente a la acción del calor, enzimas, químicos y álcalis, dificultando la extracción del ADN, sin dejar de lado que los carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos son inmovilizados en la matriz proteica quedando insolubilizados y dificultando estudios genéticos y moleculares, además hidroliza los enlaces fosfodiéster del ADN (Douglas y Rogers,1998), disminuyendo la cantidad y calidad del ADN, sin dejar de lado que el ácido fórmico contenido en el formol (aumenta la fuerza y acelera la velocidad de fijación) contribuye a la desnaturalización de las proteínas y el ADN,

DIVISION DE INVESTIGACIONES

Página

16 de 97

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

esto genera hipoxia prolongada del tejido, reduciendo el pH y disminuyendo el rendimiento en la extracción de los ácidos nucleicos, (Tokuda y cols.,1990), interfiriendo así con el estudio molecular, necesario para el diagnóstico, seguimiento y prevención de una patología, (4), lo observado en los tejidos fijados con FINE FIX es una desnaturalización reversible de las proteínas, permitiendo la recuperación del antígenos tisulares, nucleares, la morfología citoplasmática y de membrana, indispensables para el montaje de las técnicas de inmunohistoquímica. (7).

Con el desarrollo de este proyecto se quiere sustituir el formol, se pretende demostrar la utilidad y características fisicoquímicas del sustituto FINE-FIX® (Milestone), en la realización de la técnica Inmunohistoquímica, observar la calidad en la determinación de marcadores antigénicos y proteínas específicas, reflejadas en la claridad y sensibilidad de la técnica para cada tejido. Estos parámetros serán evaluados en forma paralela con los resultados obtenidos en tejidos fijados con formol y procesados bajo las mismas condiciones, demostrando así la viabilidad del sustituto utilizad

**De acuerdo con lo anterior surge la siguiente pregunta de investigación:**

*¿Cuál la efectividad del FINE-FIX comparado con el formol para el procesamiento de la técnica de Inmunohistoquímica?*

## 6. MARCO TEÓRICO

En el año 1940, se observa que los agentes tisulares, pueden identificarse a través de un anticuerpo; en 1941, realizan el montaje de la prueba con un fluorocromo

	<b>FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD</b>	<b>VERSIÓN 02</b>
	<b>FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>CODIGO: F-PI-FEP-03</b>
	<b>GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>FECHA 02-05-2019</b>

unido a un anticuerpo primario y por medio de un microscopio de inmunofluorescencia, se observó esta reacción de Ag-Ac; en 1954, Weller y Coons introducen la técnica de Inmunohistoquímica indirecta brindando mayor especificidad y avidez en las reacciones de Ag-Ac, permitiendo así identificar diferentes estructuras celulares específicas; en 1969, Mason introduce el método anticuerpo puente entre el anticuerpo primario y el anticuerpo anti-peroxidasa, juntos anticuerpos obtenidos en animales de la misma especie animal.

A partir de 1970 Stern Berger, introduce la utilidad de la enzima peroxidasa en el desarrollo su técnica Peroxidasa anti peroxidasa (PAP), en 1971 Engvall y Perlman, hablan del marcaje de anticuerpos con la enzima fosfatasa alcalina, en 1984 Cordellet describe esta técnica utilizando Fosfatasa alcalina en el marcaje (APAAP). En 1977 Heggeness, Ash introduce el uso de la Avidina y biotina, reemplazándose en 1981 por Estreptavidina-biotina, convirtiéndose en la técnica Gold-estándar.

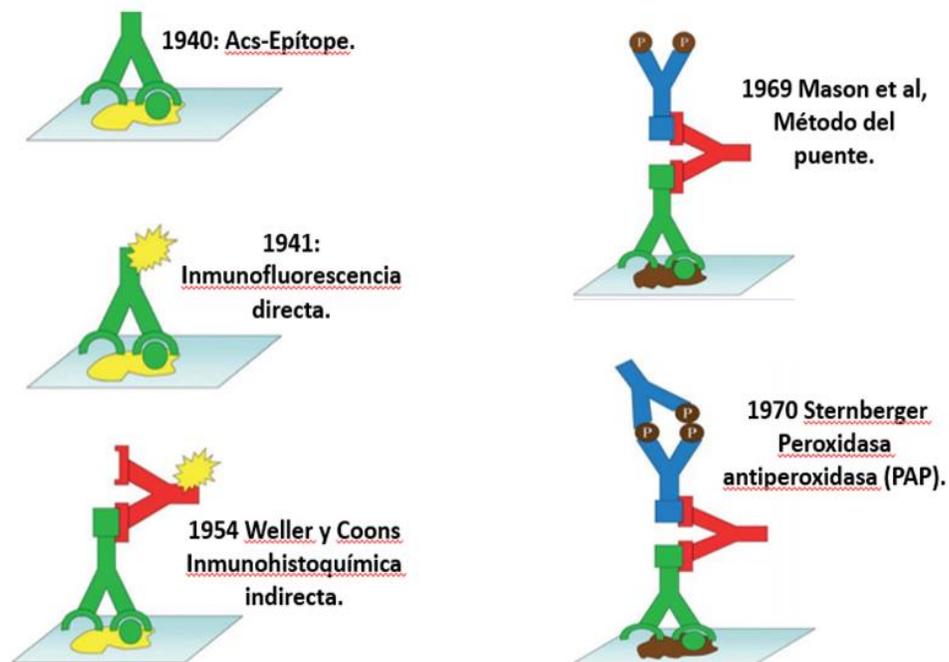
Por mucho tiempo, durante la ejecución de la técnica se observó pérdida de los epítopos a detectar en el tejido, debido a su enmascaramiento durante el proceso de fijación, por ello, se introduce en la técnica un paso en el que se recuperan estos antígenos, por diferentes métodos como: Calor con buffer Citrato pH 6.0, Tris HCl pH 8.0, EDTA pH 8.0, observándose una excelente recuperación antigénica.

Otro gran avance en la técnica, fue el observar que la peroxidasa endógena presente en las células, intervenía indirectamente en el desarrollo exitoso de la técnica, al brindar reacciones cruzadas o falsamente positivas, siendo así indispensable su bloqueo utilizando peróxido de Hidrógeno al 3%. (7, 13).

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

Durante este recorrido histórico de la técnica de la Inmunohistoquímica, también identifica la formación de puentes con anticuerpos específicos, generando mayores sitios de unión, aumentando de esta forma su sensibilidad y especificidad.

En la siguiente gráfica, se muestran los principales avances en la técnica de Inmunohistoquímica.



GRÁFICA N°1: HISTORIA DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA  
REF: ATLAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA (13)

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

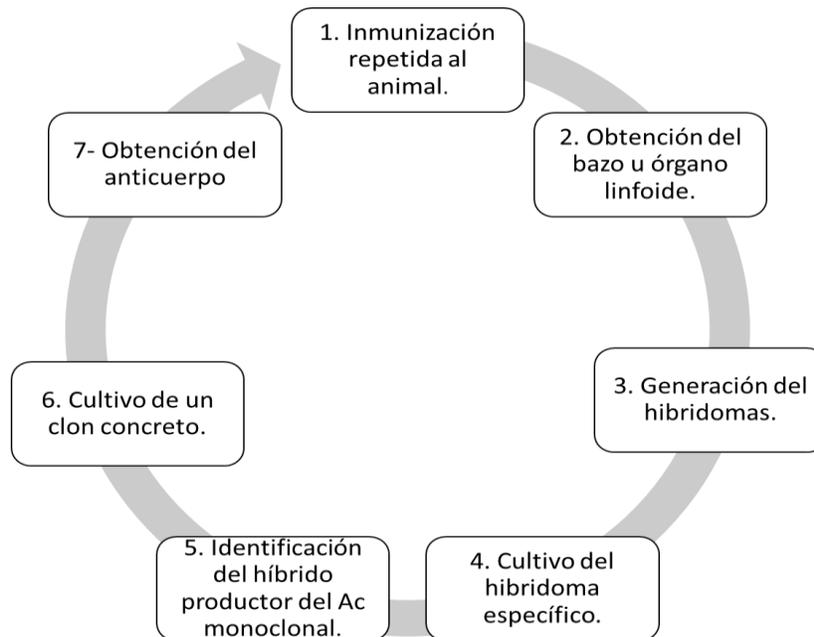
En la realización de la Inmunohistoquímica, juega un papel primordial el uso de anticuerpos monoclonales y policlonales (Glucoproteínas), brindando mayor especificidad o selección hacia un único o diferentes epítomos de un único antígeno. Los anticuerpos monoclonales se han convertido en herramientas indispensables en el diagnóstico y tratamiento de diferentes enfermedades infecciosas, inmunológicas, neoplásicas, identificación fenotípica, diagnóstico y tratamiento de tumores específicos. (7, 13, 15).

Para la obtención de estos anticuerpos se han descrito técnicas como la hibridación, quimerización, humanización y producción de anticuerpos monoclonales totalmente humanos. (13, 14, 15). Una de las técnicas más utilizadas para la producción de estos anticuerpos monoclonales, consiste en realizar una fusión celular entre un Linfocito B específico y una célula tumoral, (Célula del mieloma múltiple no secretor), obteniendo una célula híbrida inmortal o hibridoma, encargada de secretar grandes cantidades de anticuerpos específicos.

### **6.1 ANTICUERPOS MONOCLONALES**

Esta técnica fue desarrollada por George Kohler y César Milstein, los pasos específicos para generar estos anticuerpos son: (13, 14, 15)

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019



CUADRO N°1: GENERACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES (REF: 3-14)  
CREACIÓN DEL AUTOR

### 6.1.1 Inmunización repetida al ratón:

Al repetir una inmunización con un epítipo específico, emulsionado en adyuvante de Freud generalmente y en diferentes ocasiones con intervalos de 3 a 4 semanas, se activa el sistema inmunitario del ratón, obteniendo anticuerpos que reconozcan con mayor fuerza (afinidad) al epítipo inmunizante.

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019



IMAGEN N°1: Epítipo específico



IMAGEN N°2: Inoculación intraperitoneal

- REF: [https://www.freepik.es/vector-premium/secuencia-codigo-adn-celulas-virus-infeccion-covid-19-coronavirus-2019-ncov-resumen-novela-bacterias-coronavirus\\_8408427.htm](https://www.freepik.es/vector-premium/secuencia-codigo-adn-celulas-virus-infeccion-covid-19-coronavirus-2019-ncov-resumen-novela-bacterias-coronavirus_8408427.htm)
- REF: <https://www.ibyme.org.ar/archivos/laboratorios/adjuntos/poe-vias-de-inoculacion.pdf>

**6.1. 2 Obtención del bazo u otro órgano linfoide:** Se sacrifica al ratón y se extrae su bazo, se separan las células plasmáticas productoras de los anticuerpos específicos.

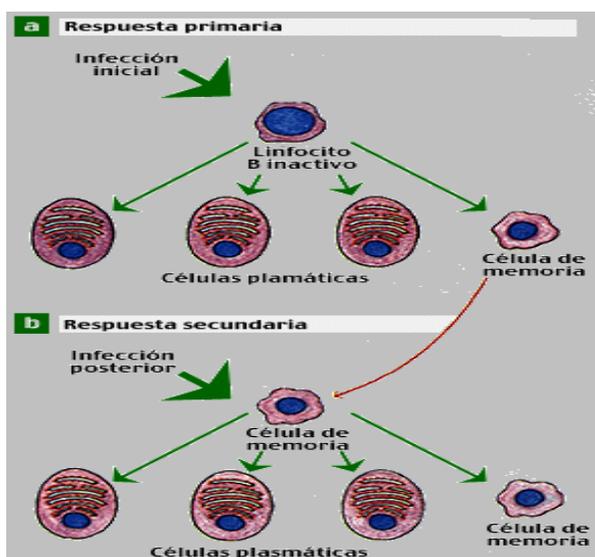


IMAGEN N°3: Activación de linfocitos B por un antígeno y posterior diferenciación a células plasmáticas

REF: [http://www7.uc.cl/sw\\_educ/biologia/bio100/html/portadaMlval9.2.html](http://www7.uc.cl/sw_educ/biologia/bio100/html/portadaMlval9.2.html)

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

**6.1.3 Generación del hibridoma** por la fusión de las células plasmáticas con células tumorales del mieloma múltiple no secretor de anticuerpos, (célula inmortal), generalmente de la línea celular SP2/0 Ag14 ATCC deficiente en la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil transferasa (HGPRT), por su capacidad semiadherente y de fácil crecimiento o división ilimitada para los hibridomas o secretora de anticuerpos.

**6.1.4 Selección y cultivo del hibridoma específico** utilizando un medio selectivo (HAT) con hipoxantina (Precursor para la síntesis de guanina y adenina), amino pterina (Acción similar a la del ácido fólico, inhibidor de la síntesis de Novo de guanina y adenina) y timidina (Nucleósido enlazado a un anillo de desoxirribosa mediante un enlace glucosídico  $\beta$ -N<sub>3</sub>), este medio permite la supervivencia de las células híbridas, las células que no se fusionan mueren a los pocos días. La célula híbrida posee las características de las células parentales: una célula productora de anticuerpos específicos e inmortales.

**6.1.5 Obtención del híbrido específico productor del anticuerpo monoclonal específico**, por medio de técnicas como ELISA, Inmunofluorescencia, Western Blot se analiza el sobrenadante del cultivo del híbrido específico que secreta los anticuerpos con la especificidad que se requiere.

**6.1.6 Cultivo de un clon concreto** en un pocillo mediante la dilución límite o clonación en agar, con el fin de asegurar la progenie celular secretora idéntica, estas células se deben mantener en medio de cultivo y congeladas.

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

**6.1.7 Obtención de los anticuerpos monoclonales** después de 48 a 72 horas, tiempo suficiente para que las células produzcan anticuerpos clase IgG, suficientes en una proporción de 100 µg/mL a 2 mg/mL. dispuestos en el sobrenadante de los hibridomas. (13, 14, 15).

En la siguiente imagen se observa la inoculación antigénica, la extracción de células plasmáticas y su fusión con las células del mieloma múltiple hasta la proliferación celular y obtención de anticuerpos monoclonales.

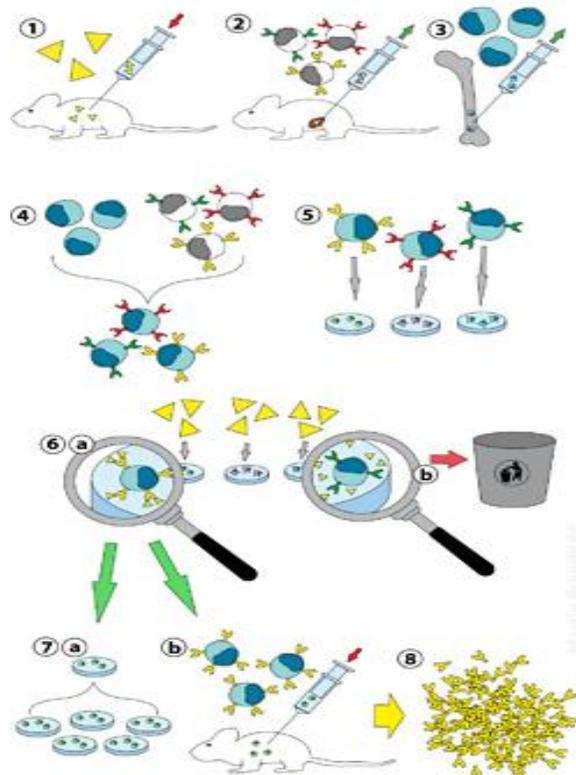


IMAGEN N°4: GENERACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES  
REF: <https://es.wikipedia.org/wiki/Hibridoma>

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

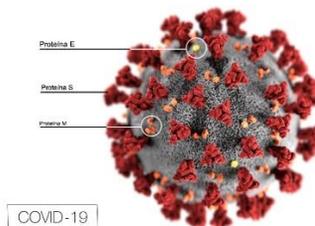
## 6.2 ANTICUERPOS POLICLONALES:

Los anticuerpos policlonales son producidos por diferentes clones de células B en plasma y se unen a los diferentes epítopos en el mismo antígeno.

Para la obtención de anticuerpos policlonales se requieren diferentes pasos: (13, 14, 15)

### 6.2.1 Preparación del antígeno:

Para inducir una respuesta inmune se requiere de proteínas, azúcares, lisados celulares de algas, de larvas, etc., de un determinado tamaño, si es pequeño, debe conjugarse a una proteína o adyuvante de Freud, la dosis del antígeno purificado debe ser adecuada, sin impurezas que estimulen la producción fallida de anticuerpos no deseados.



**IMAGEN N°5: EJEMPLO DE ANTÍGENO A UTILIZAR: VIRUS COVID-19**  
Una plataforma gratuita con las zonas de mayor riesgo de coronavirus | CNN

**6.2.2 Seleccionar el animal a inmunizar:** suele emplearse cabras, ovejos, conejos, caballos por su gran tamaño, facilidad de manejo y capacidad para producir títulos altos de anticuerpos de alta afinidad, últimamente se utilizan gallinas ponedoras, lo que permite la obtención de anticuerpos a partir de los huevos, permitiendo eludir la etapa de sangrado.

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

Es importante tener en cuenta la distancia filogénica entre el animal que se inmuniza y la fuente del antígeno, entre mayor sea la respuesta inmune será más óptima la producción de anticuerpos.

**6.2.3 Vía de inoculación:** depende del tipo de antígeno que se inocule, las vías utilizadas son subcutánea, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal e intravenosa. (13)

**6.2.4 Protocolo de inmunización:** depende del tipo de Anticuerpo policlonal que se requiera:

AC POLICLONAL	DÍAS	DOSIS
Anti-proteína	51	4 inyecciones
Anti-péptido	70	5 inyecciones
Anti-proteína	28	Adyuvante

**TABLA N°1: PROTOCOLO DE INMUNIZACIÓN CREACIÓN PROPIA DEL AUTOR**  
FUENTE: Inés Martín, La cave Tomás García, Caballero. Atlas de Inmunohistoquímica

La siguiente imagen muestra los pasos consecutivos necesarios para la obtención de anticuerpos policlonales.

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

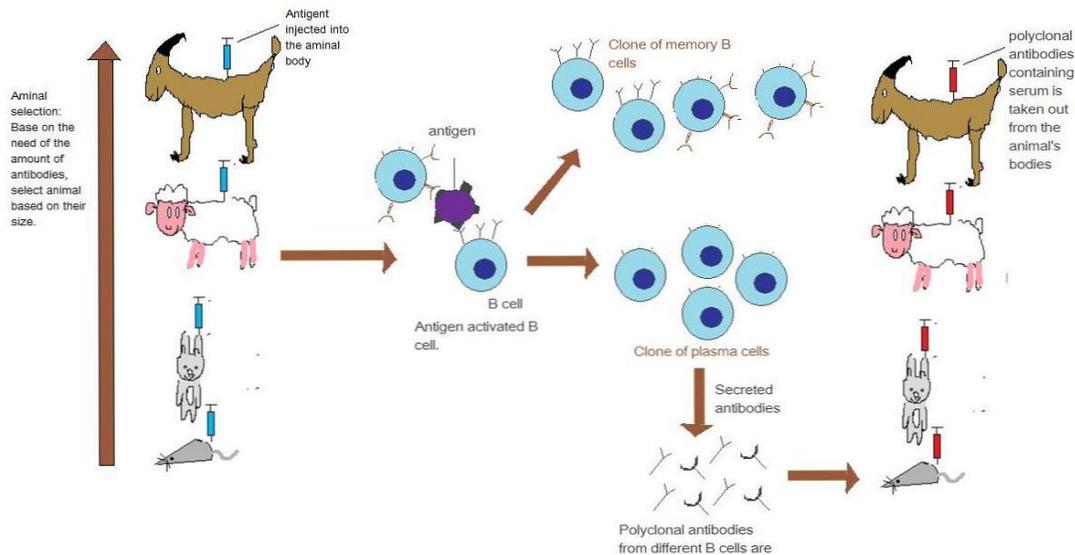


IMAGEN N°6: GENERACIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES

REF: <https://es.sawakinome.com/articles/science/difference-between-monoclonal-and-polyclonal-antibodies.html>

### 6.3 VENTAJAS-INCONVENIENTES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES (15)

VENTAJAS	INCONVENIENTES
<b>Especificidad:</b> reconoce un único epítopo, reduciendo reacciones cruzadas y ruido de fondo en los ensayos	<b>Producción:</b> tecnología compleja que implica personal especializado y mayor costo.
<b>Reproducibilidad:</b> si las condiciones de los ensayos son constantes, los resultados son reproducibles.	<b>Intolerancia a cambios en el antígeno:</b> si hay modificación en la muestra, se pierde el reconocimiento de la proteína diana.
<b>Cantidad:</b> al ser sus líneas celulares inmortales, se obtienen grandes cantidades de anticuerpos.	<b>Especificidad:</b> no permite reconocer diferentes proteínas así su homología sea similar.

TABLA N°2: VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

REF: <https://www.abynetek.com/diferencias-anticuerpos-monoclonales-y-policlonales/>

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

#### 6.4 VENTAJAS E INCONVENIENTES DE ANTICUERPOS POLICLONALES (15)

VENTAJAS	INCONVENIENTES
<b>Afinidad:</b> al ser una mezcla de anticuerpos que reconocen diferentes epítomos de una misma proteína, permite amplificar la señal,	<b>Reproducibilidad:</b> el uso de diferentes animales en la producción de lotes puede generar variabilidad que se evidencia en la reproducibilidad de los ensayos.
<b>Tolerancia:</b> a cambios en el antígeno por polimorfismo, desnaturalización.	<b>Especificidad:</b> al ser menos específicos, generan reacciones cruzadas e incremento en la señal de fondo
<b>Robustez:</b> por su capacidad para unirse a diferentes epítomos de la proteína diana.	
<b>Producción:</b> este proceso es más rápido, sencillo y económico.	

TABLA N°3: VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LOS ANTICUERPOS POLICLONALES

REF: <https://www.abynstek.com/diferencias-anticuerpos-monoclonales-y-policlonales/>

#### 6.5 TÉCNICA DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA

Para su realización, se utilizan anticuerpos monoclonales o policlonales, marcados con enzimas, que reaccionan con los epítomos de un antígeno específico presente en el tejido en parafina o en cortes por congelación, evidenciando esta reacción antígeno-anticuerpo al revelarlo con su sustrato-cromogénico específico para la enzima, produciendo un precipitado insoluble de color definido, al observar una oxidación en el sitio donde se encuentran presentes los antígenos que se están

	<b>FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD</b>	<b>VERSIÓN 02</b>
	<b>FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>CODIGO: F-PI-FEP-03</b>
	<b>GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>FECHA 02-05-2019</b>

detectando, esta actividad enzimática puede alterarse al modificar su temperatura, pH, concentración enzimática o del sustrato, pH y luz.

La reacción general cuando interviene una enzima es:



La enzima que se escoge para la realización de esta técnica debe cumplir los siguientes parámetros:

- Estar disponible en una forma altamente purificada.
- Ligada por unión no covalente al anticuerpo o a la biotina.
- No debe alterar la actividad enzimática, es decir ser estable.
- No debe estar presente de forma endógena en el tejido en estudio.
- Los productos obtenidos deben detectables y estables. (36)

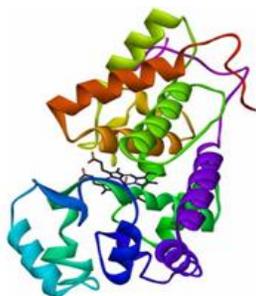
Las enzimas más utilizadas para ligarlas a los anticuerpos específicos y formar el conjugado son:

### 6.5.1 PEROXIDASA

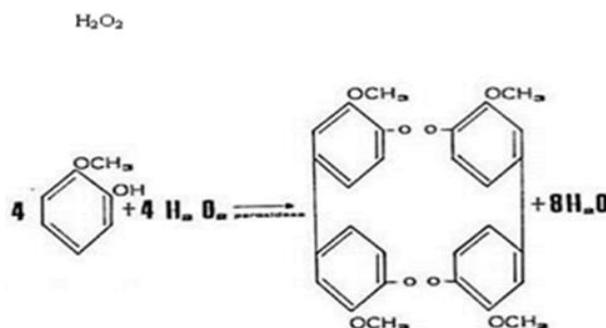
Enzima extraída de la membrana celular de la raíz del rábano, cataliza la oxidación de ciertos compuestos dadores de hidrogeno, su sitio activo es el HRP que le proporciona el color al desnaturalizarse por la activación del peróxido de hidrógeno.

El sustrato de la peroxidasa es el peróxido de hidrógeno y su cromógeno es el Diaminobenzidina (DAB). (13).

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019



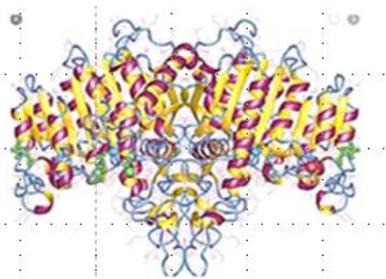
**IMAGEN N°7: ENZIMA PEROXIDASA**  
 REF: [https://es.wikipedia.org/wiki/Peroxidsa\\_searchfosfataaalcalina&tbn=isch](https://es.wikipedia.org/wiki/Peroxidsa_searchfosfataaalcalina&tbn=isch)



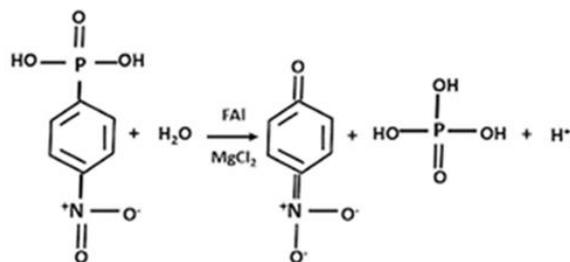
**GRÁFICA N°2: REACCIÓN PEROXIDASA-PERÓXIDO**  
 REF: <https://www.google.com/searchfosfataaalcalina&tbn=isch>

## 6.5.2 FOSFATASA ALCALINA

Enzima hidrolítica, pertenece al grupo de las fosfomonoesterasas, actúa sobre los mono ésteres del ácido fosfórico, hidrolizándolos, produciendo hidrólisis de substratos y liberando productos intermedios. Su sustrato es el p-Nitrofenil-fosfato, por su grupo fosfato y su cromógeno 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitro azul de tetrazolium (BCP/NBT). (13).



**IMAGEN N°8 FOSFATASA ALCALINA**  
[https://es.wikipedia.org/wiki/Fosfatasa\\_alcalina](https://es.wikipedia.org/wiki/Fosfatasa_alcalina)



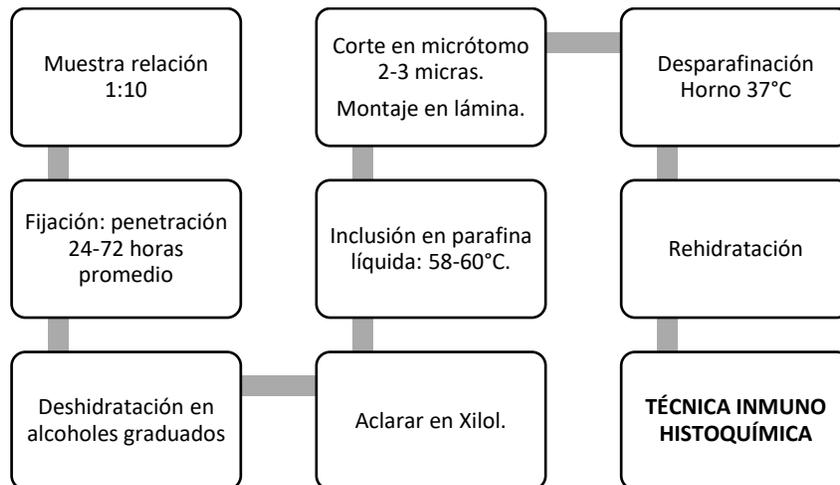
**GRÁFICA N°3: FOSFATASA ALCALINA**  
<https://www.google.com/search?q=fosfatasa+alcalina&tbn=isch&chips=q:fosfatasa+alcalina:1:estructura:D6mxib19ks%3D&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjUxZuwypfAhWecDABHX-zAkQ4IyoB3oECAEQJw&biw=1884&bih=950#imgrc=YLrFRp2HcoNL-M>

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

Para esta técnica, pueda ser de máxima utilidad y el resultado sea sensible, reproducible y confiable, es imprescindible la estandarización de cada una de las etapas del proceso, iniciando por la óptima obtención de la muestra, fijación de los tejidos, recuperación antigénica, bloqueo, realización de la técnica, lectura y correlación de los resultados obtenidos, sin dejar de lado la importancia de la visualización e interpretación de los controles de calidad internos y externos.

Esta técnica tiene un protocolo estandarizado, sin embargo, contiene pasos que requieren una optimización inicial para asegurar que el anticuerpo se ligue al antígeno de forma específica, al eliminar factores que lo imposibiliten. (2, 13)

El siguiente cuadro indica la secuencia de los pasos a seguir en un tejido, (Técnica Histológica) antes de realizar la técnica de inmunohistoquímica.



CUADRO N°2: TÉCNICA HISTOLÓGICA  
CREACIÓN DEL AUTOR

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

## 6.6 PASOS CLAVE A SEGUIR EN LA TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA

### 6.6.1 PREPARACION DE LA MUESTRA

Antes de realizar la técnica de Inmunohistoquímica los tejidos de un paciente, deben ser fijados con FINE-FIX o formol, para detener la auto digestión enzimática celular, los cambios proteínicos y microbiológicos relacionados con la putrefacción garantizando la conservación o estabilidad de las proteínas tisulares, ya fijados se deshidratan para retirar los excesos del agua no miscible con el medio de inclusión, se aclaran para generar una interacción química entre los espacios desprovistos de líquidos y el medio de inclusión quedando ocupados, finalmente se incluyen en parafina la cual ocupa los espacios intracelulares y el material extracelular del tejido conservando la morfología celular y brindando firmeza y homogeneidad durante el corte en el micrótopo, (2-3 micras de espesor). La temperatura de la parafina debe ser de 60°C para evitar la desnaturalización de los epítomos. (2), (13).

Los cortes se dejan a 45°C, durante la noche para secar el tejido y evitar su desprendimiento durante la recuperación antigénica, se des parafina con dos pases de xilol, cada uno de cinco minutos, se deben hidrata en etanol en concentraciones de 100°, 96° y 70° cada uno tres minutos. (2), (13)

### 6.6.2 RECUPERACIÓN DEL EPÍTOPO

En la fijación con formaldehido se observa el proceso de reticulación de las proteínas y calcio en el tejido, brindando como ventaja mantener la estructura del tejido para su visualización, pero a la vez disminuye la reactividad de los epítomos

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

presentes en las células del tejido, dificultando así su reconocimiento por los anticuerpos específicos, por esto es indispensable efectuar la recuperación de este antígeno, antes de realizar su detección; existen básicamente dos formas para esta fase: la primera es aumentar la temperatura colocando el tejido en buffer Citrato pH 6.0, Tris HCl pH 8.0 o EDTA pH 8.0, y la segunda es hacer un tratamiento enzimático.

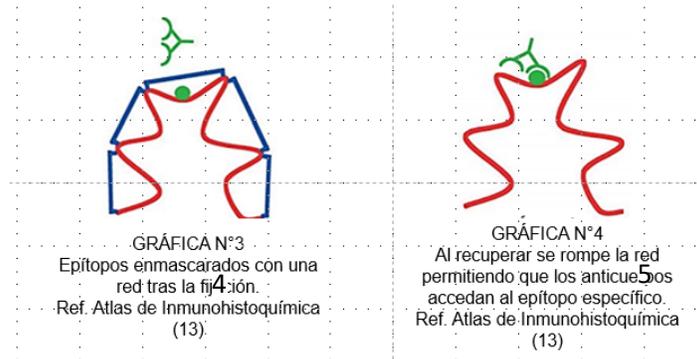
De esta manera, se dispone de diferentes tratamientos, se escoge el que permita mayor disponibilidad de los epítomos del antígeno, para asegurar una mayor detección por el anticuerpo específico. (2), (13)

EQUIPO	VENTAJAS	INCONVENIENTES	TEMPERATURA Y TIEMPO
MICROONDAS	Comodidad. No hay que estar pendiente del T ni la T.	Recuperación desigual. Inherente al principio de calentamiento del MO. Recuperación variable según el modelo de MO y el número de vidrios.	100°C. 20 minutos.
OLLA A PRESIÓN	Rapidez. Se toma el T a partir del momento en que la válvula alcanza la segunda marca.	Alteración morfológica. Hay que estar muy pendiente de tiempo. Manipulación de la olla peligrosa.	120°C. 2-5 minutos.
BAÑO TÉRMICO	Reproducibilidad. Condiciones fácilmente estandarizables.	Requiere más tiempo. Si no es digital hay que controlar la temperatura permanentemente.	95-99°C 20-40 minutos.
CÁMARA DE PRESIÓN PASCAL	Fiabilidad. Parámetros de presión y calor controlados automáticamente y confirmables mediante bandas reactivas.	Posible desprendimiento y/o rotura de los cortes.	125°C 1-5 minutos.

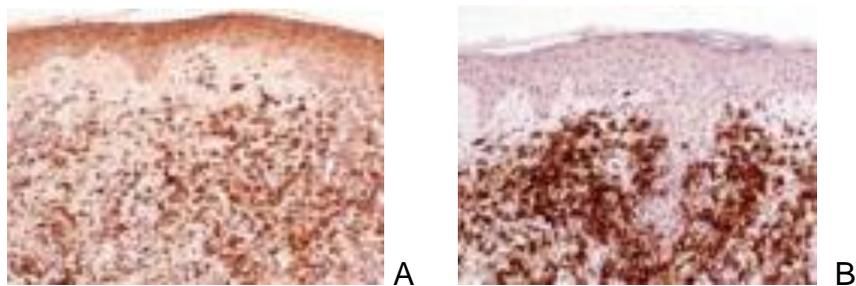
CUADRO N°3: MÉTODOS RECUPERACIÓN ANTIGÉNICA  
REF: ATLAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA (13)

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

Las siguientes son gráficas comparativas de un tejido con sus epítomos enmascarados con un tejido libre de proteínas que dificultan la detección del epítopo.



En la siguiente imagen, se comparan los resultados de la técnica de Inmunohistoquímica en un tejido sin el proceso de recuperación antigénica (A) vs tejido con recuperación antigénica (B), en el que se aprecia alta definición de los epítomos.



**IMAGEN N°9 LINFOMA CUTÁNEO**  
A: tejido sin recuperación      B: tejido con recuperación antigénica  
ref. Atlas de inmunohistoquímica (13)

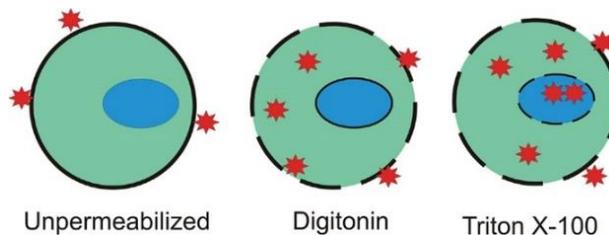
	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

Durante el desarrollo de la técnica los buffers como el TBS, pH 7.0 - 7.2, y con albúmina sérica bovina al 1% son utilizadas para evitar reacciones inespecíficas al unirse con la fracción C1q del complemento, con ellas se diluyen los anticuerpos primarios y secundarios y los buffers de lavado como el fosfato salino, el buffer Tris salino o el Tween 20, se utilizan para eliminar los residuos de moléculas que no intervienen positivamente en las reacciones pero que si pueden falsear los resultados o la calidad de la técnica. (7)

### 6.6.3 PERMEABILIZACIÓN

Considerando que la técnica de Inmunohistoquímica permite detectar proteínas individuales ubicadas en la superficie celular, en el citoplasma, en el núcleo o en un mismo proceso detectar diferentes proteínas de membrana y citoplasma o citoplasma, membrana y núcleo, conviene agregar sobre el tejido en estudio, un detergente químico como el Triton-X100 o Digitonina a bajas concentraciones, para producir permeabilización en las membranas celulares y así facilitar el paso de los anticuerpos primarios y secundarios a través de ellas. (2), (13).

La siguiente gráfica señala la permeabilización.



**GRÁFICA N°6: PERMEABILIZACIÓN CELULAR**

Ref.:

[https://www.google.com/search?q=permeabilizacion+inmunohistoquimica&sxsrf=ALeKk02ZiDCu0PmgVSwhNm\\_GcQriBkKrg:1619304531884&source=lnms&tm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwiGrZ75fwAhXQneAKHRONDWkQ\\_AUoAXoECAEQAw&biw=1920&bih=969#imgsrc=vmC7xWxjHV11nM&imgdii=krsVVr8VoY-YdM](https://www.google.com/search?q=permeabilizacion+inmunohistoquimica&sxsrf=ALeKk02ZiDCu0PmgVSwhNm_GcQriBkKrg:1619304531884&source=lnms&tm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwiGrZ75fwAhXQneAKHRONDWkQ_AUoAXoECAEQAw&biw=1920&bih=969#imgsrc=vmC7xWxjHV11nM&imgdii=krsVVr8VoY-YdM)

DIVISION DE INVESTIGACIONES

Página

35 de 97

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

#### 6.6.4 BLOQUEO

Es importante mencionar qué existen factores que generan positividad de fondo, en las tinciones citoplasmáticas pueden observarse falsos positivos por la presencia de biotina endógena (neutralizada si se coloca avidina después del anticuerpo primario), fosfatasa endógena (bloqueadas con levamisol).

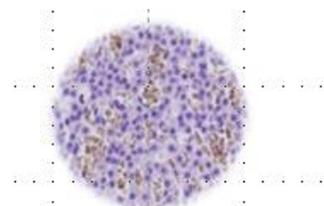
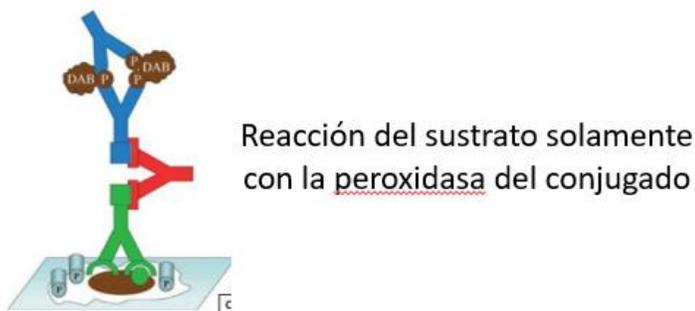
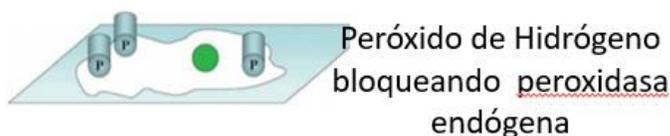
Los tejidos por naturaleza, presentan peroxidasa endógena, enzima propia de los eritrocitos, es importante eliminarla antes de realizar la unión de los epítomos del tejido con los anticuerpos específicos, para evitar reacciones cruzadas.

En este paso, se coloca peróxido de Hidrógeno 1/10, sobre los cortes del tejido, una cantidad suficiente que cubra todo el tejido, durante 15 minutos, tiempo suficiente para que reaccione con la peroxidasa presente en las células tisulares y la bloquee. (2), (13).

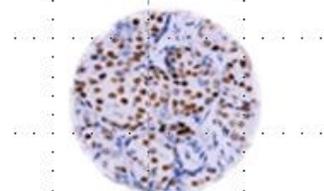
También se utiliza soluciones de bloqueo proteicas con albúmina AL 3% (BSA), para prevenir uniones no específicas de los anticuerpos primarios o secundarios.

La siguiente gráfica muestra el resultado de la técnica realizada en un tejido no bloqueado vs técnica realizada en un tejido bloqueado.

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019



Técnica con pseudoperoxidasa en hematíes



Técnica con peroxidasa endógena bloqueada

#### GRÁFICA N°7 PROCESO BLOQUEO PEROXIDASA ENDÓGENA

REF: ATLAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA (13)

Fotos: <https://www.labclinics.com/decalogo-para-principiantes-en-inmunohistoquimica/>

## 6.7 ESCOGER EL ANTICUERPO PRIMARIO

Al escoger el anticuerpo más específico y sensible para la detección de epítomos en la muestra, se debe tener en cuenta factores muy importantes como:

- Los niveles de concentración y expresión de la proteína de interés en el tejido.
- El origen de los anticuerpos secundarios debe ser de diferente especie animal, en relación con los anticuerpos primarios.

DIVISION DE INVESTIGACIONES

Página

37 de 97

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

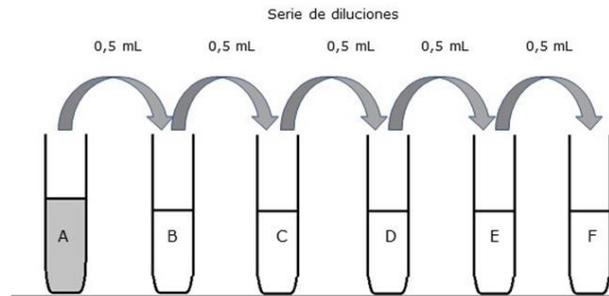
- Escoger el anticuerpo monoclonal o policlonal, según las características y necesidades del tejido y procedimiento.
- Utilizar tejidos control para verificar la especificidad del anticuerpo primario, se requiere de un tejido que no contenga la proteína de interés, es decir la que se quiere detectar en el corte problema, como, por ejemplo, el tejido de un ratón.
- La especificidad del anticuerpo se puede observar mediante la pre-incubación del anticuerpo primario con el péptido antigénico del tejido (test de adsorción).
- Dilución del anticuerpo: la concentración del anticuerpo primario se expresa en mg/ml, la dilución óptima de este anticuerpo será aquella que muestre la máxima tinción específica y la mínima tinción inespecífica, se realizan diluciones que son aplicadas sobre los tejidos control, se elige la dilución del anticuerpo, en la que el control negativo se evidencie totalmente negativo y el control positivo marque únicamente los antígenos solicitados, la dilución escogida será la utilizada en los ensayos venideros, realizados con este mismo reactivo. (2), (13).

Antisuero policlonal: se recomendaría diluciones 1:100-1:20.000

Anticuerpo monoclonal obtenido de cultivos celulares: 1:10-1:1.000. (36)

La siguiente gráfica muestra un tejido procesado con una dilución inadecuada de los anticuerpos primarios, con abundante ruido de fondo, vs un corte procesado con la dilución ideal, observando claramente el antígeno o proteína identificada.

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019



### TITULACIÓN DE ANTICUERPOS



DILUCIÓN CON EXCESO ACS



DILUCIÓN DE ACS APROPIADA

**GRÁFICA N° 8 TITULACIÓN DE ANTICUERPOS  
PROPIA DEL AUTOR**

REF FOTOS: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1690-32932015000100009](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-32932015000100009)

## 6.8 DETECCIÓN

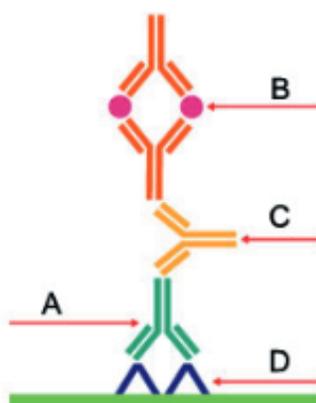
Para la detección del anticuerpo primario ligado al epítipo, se utilizan anticuerpos secundarios dirigidos contra los anticuerpos primarios.

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

Estos anticuerpos secundarios se obtienen en especies diferentes a las utilizadas en la fabricación de los anticuerpos primarios, ejemplo si el primario se fabricó en conejo, el anticuerpo secundario será fabricado en cabra, es decir, será un anticuerpo anti conejo, estos anticuerpos secundarios están conjugados a las enzimas mencionadas anteriormente o con complejos Avidina-Biotina. (2), (13). Existen diferentes métodos indirectos de detección, entre los principales están:

#### 6.8.1. Método indirecto Peroxidasa-Antiperoxidasa (PAP).

Se utiliza un anticuerpo primario específico que se liga al antígeno del tejido, un anticuerpo secundario contra la especie del anticuerpo primario, por esto hace puente entre el primario y el complejo peroxidasa antiperoxidasa, obtenido en la misma especie del anticuerpo primario. (7-36)



Método indirecto Peroxidasa-Antiperoxidasa (PAP)

A: Anticuerpo primario  
 B: Complejo Peroxidasa-Antiperoxidasa  
 C: Anticuerpo secundario  
 D: Antígeno tisular

GRÁFICA N°9 COMPLEJO DE DETECCIÓN  
 Ref. <https://docplayer.es/90378124-Inmunohistoquimica-avanzada.html> (36)

DIVISION DE INVESTIGACIONES

Página  
 40 de 97

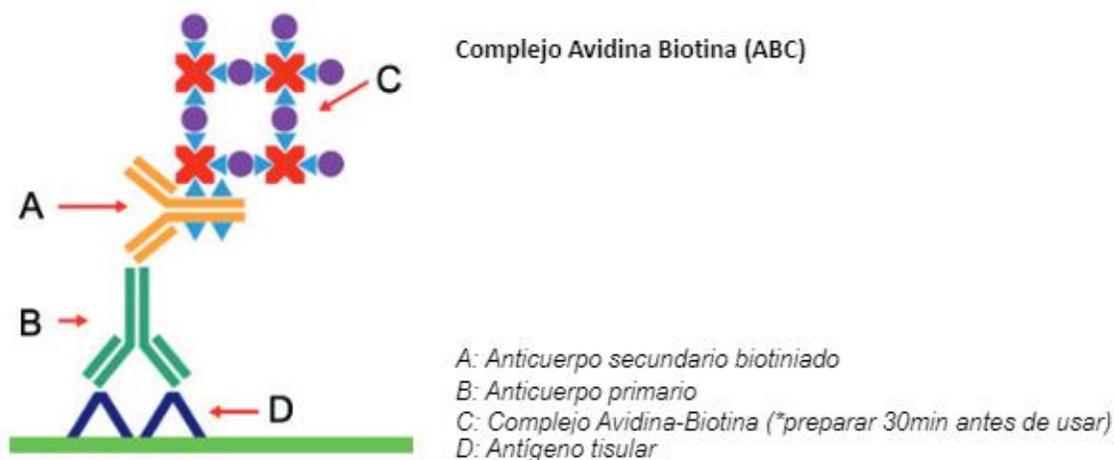
	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

### 6.8.2 Sistema ABC: Avidina-Biotina.

En la clara del huevo se encuentra una glucoproteína de alto peso molecular, con regiones hidrofóbicas llamada avidina, con afinidad hacia la vitamina del complejo B la Biotina cuya característica primordial es su fácil conjugación con anticuerpos y enzimas,

Este sistema implica un anticuerpo primario sin marcar ligado al antígeno, un anticuerpo secundario biotinilado y el complejo de avidina o estreptoavidina unido a la enzima (peroxidasa (HRP) o fosfatasa alcalina (AP)) y finalmente para su visualización el cromógeno.

La presencia de biotina endógena en el tejido puede brindar tinción inespecífica de fondo. (7-36)



GRÁFICA N°10 COMPLEJO DE DETECCIÓN  
 Ref. <https://docplayer.es/90378124-Inmunohistoquimica-avanzada.html> (36)

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

### 6.8.3 Sistema LSAB (labeled streptavidin-biotin).

Utiliza un anticuerpo primario que se liga al antígeno, un anticuerpo secundario biotilado acoplado a un complejo streptavidina-peroxidasa, (streptavidina carece de dominios carbohidrato, brindando uniones más específicas al tejido). (7-36)



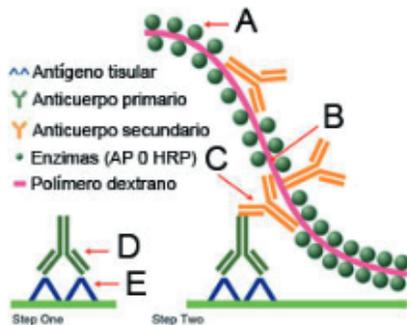
GRÁFICA N°11 COMPLEJO DE DETECCIÓN  
 Ref. <https://docplayer.es/90378124-Inmunohistoquimica-avanzada.html> (36)

### 6.8.4 Sistemas con la aplicación de polímeros de dextrano libres de biotina.

Se utiliza polímero conjugado a anticuerpos secundarios (10 moléculas) más enzimas (70 moléculas).

Se utiliza un anticuerpo primario que se liga al antígeno, anticuerpos secundarios ligados a un polímero de dextrano marcado con el enzima y el sustrato-cromógeno, este polímero aumenta la sensibilidad y disminuye el fondo.

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019



Sistema de revelado basado en polímero de dextrano

A: Enzimas (AP o HRP)  
 B: Polímero de dextrano  
 C: Anticuerpo secundario  
 D: Anticuerpo primario  
 E: Antígeno tisular

GRÁFICA N°12 COMPLEJO DE DETECCIÓN

Ref. <https://docplayer.es/90378124-Inmunohistoquimica-avanzada.html> (36)

## 6.9 CONTROLES

Existen diferentes factores que interfieren en los resultados de la técnica, algunos de ellos son:

- Clase de fijador y tiempo de fijación.
- Temperatura y humedad.
- Pérdida de la reactividad.

Para verificar la calidad del montaje, especialidad y sensibilidad de los resultados, se procesan tejidos control y reactivo control

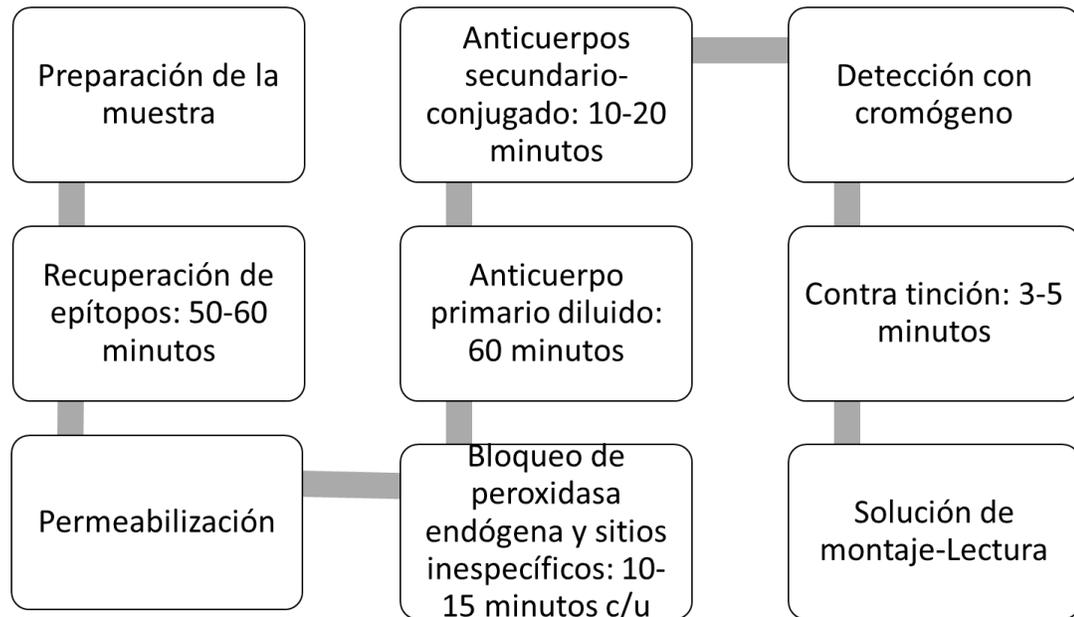
Reactivo control: al sintetizar un anticuerpo primario se confirma su especificidad por técnicas como electroforesis, Western Blot y su reactividad cruzada con células transgénicas y al ser utilizado en la técnica se analiza su reactividad teniendo en cuenta diluciones, reactivos tiempos de incubación, lavados que siempre serán constantes.

	<b>FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD</b>	<b>VERSIÓN 02</b>
	<b>FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>CODIGO: F-PI-FEP-03</b>
	<b>GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>FECHA 02-05-2019</b>

- Control positivo: casos control estandarizado con resultados positivos para antígenos específicos, para evaluar los procedimientos, se corre paralelamente e igual con los tejidos muestra.
- El mejor control positivo es el control interno, células o componentes del tejido normal/no patológico, en el que se evidencia el antígeno a estudiar.
- Control negativo: su proceso asegura la ausencia de reacciones inespecíficas o contaminación de reactivos, se coloca suero no inmunizado o tampón de lavado, al leerlo no debe presentar precipitados coloreados.
- Control para los anticuerpos monoclonales: puede usarse anticuerpos del mismo isotipo a la misma concentración y con el mismo diluyente o se puede utilizar una mezcla de subtipos de IgG.
- Indicador control de procesamiento: puede realizarse con la vimentina como indicador que refleja un excelente procesamiento/fijación del tejido, reconoce al epítipo sensible a la fijación adecuada brinda una tinción uniforme, si se observa tinción heterogénea la fijación no es óptima. (36).

El siguiente cuadro identifica el paso a paso que se realizan durante el proceso de la técnica de Inmunohistoquímica.

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019



CUADRO N°4: TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA  
PROPIA DEL AUTOR

Es importante, resaltar que los tejidos con marcaje positivo muestran células de tono marrón, si como marcador se utiliza la enzima peroxidasa, pero si se utiliza la enzima fosfatasa alcalina se observa un tono rojizo, como se ilustra en la siguiente imagen.

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

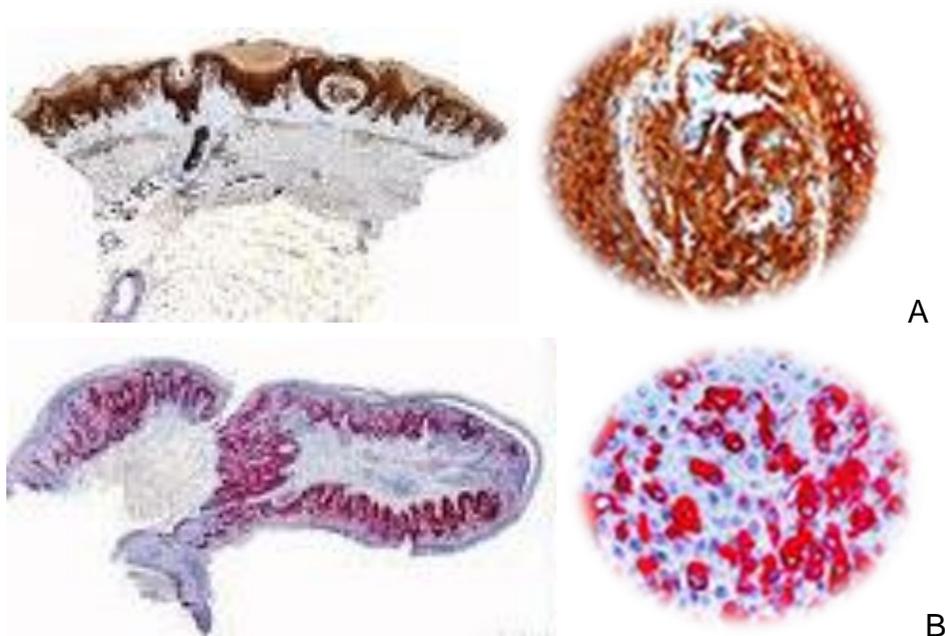


IMAGEN N°10

REF: <https://www.actasdermo.org/es-inmunohistoquimica-dermatopatologia-revision-los-anticuerpos-articulo-resumen-S0001731012002773>

**A:** Detalle sustancia amiloide en dermis papilar con positividad de la citoqueratina 903 (x200), y marcador peroxidasa

**B.** Positividad para la citoqueratina CAM5.2 de las células neoplásicas, con marcador fosfatasa alcalina.

## 6.10 SISTEMA DE LECTURA

### 6.10.1 Sistema de puntuación y evaluación por el estado de HER2

- Puntuación (de los marcadores de HercepTest™)
- (0) - una o poca tinción en < 10% de células
- (1+) - tinción débil, parcial en > 10% de células
- (2+) - débil a moderada, tinción completa en > 10% de células
- (3+) - fuerte, tinción completa en la membrana > 10% de células

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

- Evaluación de tinción (De acuerdo con el NCCN)
- Muestras con 3+ (No 2+/3+ limítrofe) son elegibles por Herceptin™
- Muestras con resultado de 2+ deben ser reevaluados con FISH
- Muestras con resultado de 0/1+ son negativos por HER2

### 6.10.2 Sistema de puntuación y evaluación por estado de ER, PR

Evaluación de la tinción

- Método de puntuación de J-puntuación
- (0) - sin células teñidas
- (1+) - células teñidas  $\leq 1\%$
- (2+) -  $1\% < \text{células teñidas} < 10\%$
- (3+) - células teñidas  $\geq 10\%$
- Negativo - puntuación de 0
- Indeterminado - puntuación de 1 o 2
- Positivo - puntuación de 3
- Método de tinción Alfred
- (0) - sin células teñidas
- (1) - células teñidas  $< 1/100$
- (2) -  $1/100 \leq \text{células teñidas} < 1/10$
- (3) -  $1/10 \leq \text{células teñidas} < 1/3$
- (4) - células teñidas =  $1/3 < 2/3$
- (5) - células teñidas  $> 2/3$
- Intensidad
- 0 = ningún

	<b>FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD</b>	<b>VERSIÓN 02</b>
	<b>FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>CODIGO: F-PI-FEP-03</b>
	<b>GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>FECHA 02-05-2019</b>

- 1 = débil
- 2 = intermedio
- 3 = fuerte
- Puntuación
- Para obtener la puntuación complete suma la puntuación de tinción y la puntuación de intensidad. Cualquier puntuación entre 0-2 es considerado negativo por ER o PR, cualquier puntuación sobre 2 es considerado positivo por ER o PR. (33).

Según J Histocho 2005; 28:89, se cuantifica el resultado en los que los porcentajes y su significado pueden variar:

- Negativo (-): total negatividad o menos del 50% de las células “diana” con menor intensidad que el control.
- Positividad débil (+/-): más del 50% de las células “diana” con menor intensidad que el control.
- Positivo (+): más del 50% de las células “diana” con igual o mayor intensidad que el control.

El límite de intensidades entre negativo y positividad débil o positivo se hace por comparación con un control interno existente u otro externo. (33)

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

## MARCADORES EN LA INMUNOHISTOQUÍMICA

Los marcadores tumorales son moléculas generalmente de naturaleza glucoproteína, pueden estar presentes en células normales o hacerse evidentes en algunos procesos y se manifiestan o incrementan sus niveles como respuesta del huésped o como producto propio del proceso patológico o benigno.

Los marcadores tumorales pueden encontrarse en fluidos biológicos sangre, líquidos corporales y en tejidos, teniendo en cuenta que un mismo tipo de tumor no siempre expresa los mismos marcadores, también se ha observado que los niveles de un mismo marcador varían en un mismo cáncer.

En la inmunohistoquímica los marcadores tumorales se utilizan para poder detectar, diagnosticar, estadificar o clasificar patologías como el cáncer, linfomas, neoplasias, enfermedades dérmicas, identificación de marcadores hormonales, detección de agentes infecciosos en las células o tejidos, se utiliza en el pronóstico y seguimiento de diferentes patologías, en la elección de tratamientos adecuados, etc.

Para detectar su presencia en los tejidos se utilizan anticuerpos monoclonales o policlonales, su utilidad es determinada por la sensibilidad y especificidad de cada uno, es importante aclarar que los marcadores tumorales de forma aislada no son útiles en el diagnóstico precoz de neoplasias en poblaciones asintomáticas. (30)

### 6.11.1 CLASIFICACIÓN DE LOS MARCADORES TUMORALES

Los marcadores tumorales se agrupan por los siguientes criterios:

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

- Por su origen.
- Por su utilidad clínica expresada según la sensibilidad y especificidad.  
Según epidemiología se define como Sensibilidad el porcentaje de pacientes portadores de un determinado tumor, con valores patológicos, superiores a la normalidad, de un determinado marcador (su opuesto serían los falsos negativos). (30).  
Y como Especificidad el porcentaje de pacientes sin un tumor maligno, con valores normales de un determinado marcador (su opuesto serían los falsos positivos). (30).

#### 6.11.1.1 Clasificación según su origen:

- Producidos por las células tumorales, denominados "derivados del tumor", algunos de estos marcadores son: antígeno carcinoembrionario (CEA), alfa-feto proteína (AFP), antígeno prostático específico (PSA), la subunidad beta de la hormona gonadotrofina coriónica humana (beta-HCG). (31)
- Inducidos por la presencia del mismo y producidos por el huésped, denominados "asociados al tumor", algunos de estos marcadores son: proteínas de fase aguda (PCR, ferritina). (31).

#### 6.11.1.2 Por su utilidad clínica expresada según la sensibilidad y especificidad: (30-31).

- Marcadores tumorales de muy elevada especificidad y sensibilidad: se presentan en situaciones fisiológicas o en tumores malignos, como ejemplo la beta-HCG y la calcitonina.

	<b>FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD</b>	<b>VERSIÓN 02</b>
	<b>FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>CODIGO: F-PI-FEP-03</b>
	<b>GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>FECHA 02-05-2019</b>

- Marcadores tumorales de especificidad y sensibilidad variable: son bajas en los estadios iniciales, se incrementan en estadios avanzados, utilizados en el diagnóstico de tumores malignos. Algunos de estos marcadores son: PSA, AFP, CEA, CA 125, CA 15.3, la enolasa neuronal específica (NSE) entre otros
- Marcadores tumorales de baja especificidad con una sensibilidad dependiente del estadio, su especificidad es baja, incluso en fases avanzadas de la enfermedad. Algunos de estos marcadores son: lactato deshidrogenasa (LDH), cito queratina 19 (CYFRA 21).

Las siguientes tablas hacen referencia a algunos anticuerpos relacionado su presencia en tejidos y sitio específico de localización

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

Anticuerpos	Tejidos	Localización
Actina músculo-específica	Colon, bazo	Citoplasma
AE1/AE3	Colon, piel, páncreas	Citoplasma
AFP	Hígado fetal	Citoplasma
ALK	Linfoma anaplásico	Variable nuclear/citopl
Beta amiloide	Cerebro Alzheimer	Citoplasma
Beta Catenina	Ductos, ductulos biliares	Núcleos
BerEP4	Mama, colon	Citoplasma
CD (varios), bcl-2/bcl-6	Amígdala	Membrana
CD15	Hodgkin	Membrana-Golgi
CD30	Hodgkin, páncreas	Membrana/Golgi
CD99	Timo	Membrana
CD117	Piel, cerebro, pulmón, bazo	
CEA (monoclonal)	Colon	Membrana/citoplasma
CK AE1-AE3	Colon, piel, páncreas	Citoplasma
CK7	Mama, pulmón	Citoplasma
CK20	Colon, páncreas	Citoplasma
Caldesmon	Músculo liso	Citoplasma
Calretinina	Mesotelio, timo teste, cerebelo	Núcleo-citoplasma
COX2	Colon, riñón	
Cromogranina A	Páncreas, adrenal, ovario	Granular citoplasma
Desmina	Colon, bazo	Citoplasma
E-Cadherina	Mama	Citoplasma
EGF R	Placenta	Membrana
EMA	Amígdala, riñón	Membrana
Estrogeno R	Mama, útero	Nuclear
Fosfatasa alc placentaria	Placenta	Citoplasma
Hepar 1	Hígado normal	Citoplasma
hCG	Placenta	Citoplasma
HMB-45	Melanoma	Citoplasma

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

hCG	Placenta	Citoplasma
HMB-45	Melanoma	Citoplasma
Inmunoglobulinas	Amígdala	Citoplasma
Inhibina	Ovario	Citoplasma
Ki-67 (MIB1)	Piel, timo, amígdala	Nuclear
Lactógeno placentario	Placenta, amígdala	
Melan A	Melanoma	Citoplasma
Mieloperoxidasa	Médula ósea	Citoplasma granular

Anticuerpos	Tejidos	Localización
Pax-5	Hodgkin nodular linf	Núcleo
p53	Ca seroso, Ca mama	Nuclear
p63	Mama	Nuclear
PDGF R	Mama	Membrana
Progesterona R	Mama, útero	Nuclear
Proteína Glial fibrilar	Cerebelo	citoplasma
PSA	Próstata	Citoplasma
Racemasa	Próstata	Citoplasma
S-100	Piel	Núcleo + citoplasma
Sinaptofisina	Cerebro, adrenal	Citoplasma
Tau	Alzheimer	Citoplasma
TdT	Timo	Núcleo
Tiroglobulina	Tiroides	Citoplasma
TTF-1	Tiroides	Nuclear
Triptasa	Médula ósea	Citoplasma
Vimentina	Ca de colon	Citoplasma
WT-1	Riñón	Nuclear

TABLA N°4 Anticuerpos –tejidos y su localización.

REF. (36)

A continuación, se hará un enfoque de los marcadores que se utilizarán para la realización de este trabajo.

DIVISION DE INVESTIGACIONES

Página

53 de 97

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

## 6.12 ACL – CD45

Marcador glicoproteico de membrana de los leucocitos, útil en el diagnóstico diferencial de tumores de células pequeñas o polimórficas puede estar en neoplasias hematológicas como la leucemia linfocítica crónica y linfoma maligno, así como neoplasias viscerales como colon rectal, renal, pancreático, meningiomas etc. (16)

### LECTURA POSITIVA

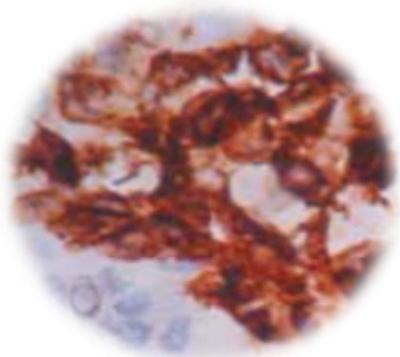


IMAGEN N°11

<https://docplayer.es/21487134-Linfoma-primario-de-celulas-t-del-pancreas-presentacion-de-un-caso-clinico.html>

[http://www.conganat.org/6congreso/index-324.htm#Fig\\_1](http://www.conganat.org/6congreso/index-324.htm#Fig_1)

### LECTURA NEGATIVA

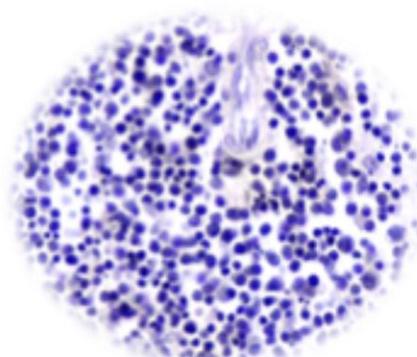


IMAGEN N°12

## 6.13 AE1/AE3

Identifica dos epítomos presentes en la mayoría de cito queratinas epiteliales, es una mezcla de dos anticuerpos monoclonales obtenidos en ratones por inmunizaciones con queratinas callosas humanas, por lo que, puede ser usado como herramienta para la identificación IHC positiva de células de origen epitelial estratificado y simple.

DIVISION DE INVESTIGACIONES

Página

54 de 97

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

### RESULTADO POSITIVO

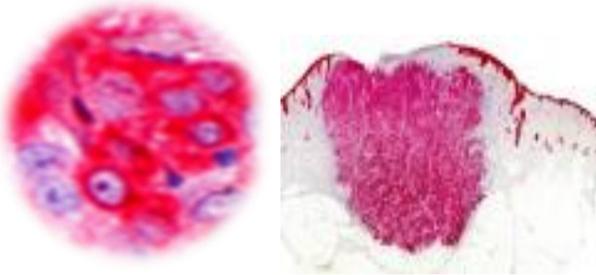


IMAGEN Nº13

### RESULTADO NEGATIVO

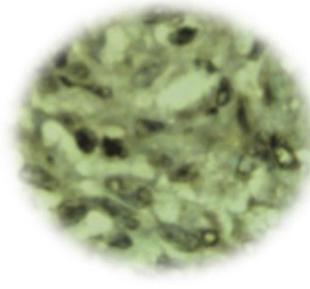


IMAGEN Nº14

file:///C:/Users/mvari/Downloads/66336\_Fuertes\_de\_Veg%C3%A1%20\_Laura%20(10).pdf  
[https://www.researchgate.net/figure/Figura-3-Marcadores-inmunohistoquimicos-negativos-en-EAML-A-ACE-40-B-AE1-AE3\\_fig3\\_312148742](https://www.researchgate.net/figure/Figura-3-Marcadores-inmunohistoquimicos-negativos-en-EAML-A-ACE-40-B-AE1-AE3_fig3_312148742)

## 6.14 TTF1

Proteína de transcripción nuclear, se expresa selectivamente durante la embriogénesis en tiroides, di encéfalo y epitelio respiratorio, donde juega un importante papel en la activación transcripcional, se ha utilizado con fines diagnósticos en carcinomas de la tiroides y del pulmón, hiperplasias, así como en la mayoría de carcinomas medulares derivados de éstas, determina el tiempo de muerte del tejido en estado de putrefacción. (18)

### RESULTADO POSITIVO

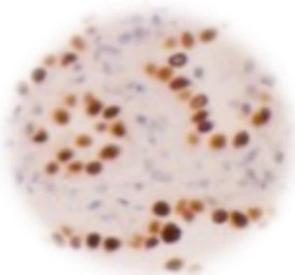


IMAGEN Nº15

### RESULTADO NEGATIVO

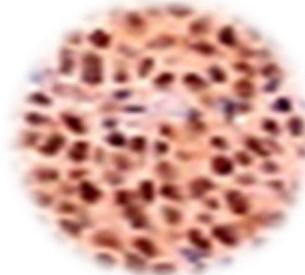


IMAGEN Nº16

DIVISION DE INVESTIGACIONES

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

<https://www.scielo.sa.cr/img/revistas/mlcr/v28n2/art4i2.jpg>  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0210480617300098>

## 6.15 CD20

Es un receptor de membrana que los linfocitos B adquieren en su desarrollo fisiológico, empleado en el diagnóstico de los linfomas B, también es una diana molecular del anticuerpo monoclonal rituximab y del radio inmunoisótopos utilizados en el tratamiento de los linfomas B, es un tipo de marcador tumoral en ciertos tipos de linfomas y leucemias de células, igualmente puede ayudar a diagnosticar el cáncer o planificar el tratamiento de cáncer. (3-19)

### RESULTADO POSITIVO



IMAGEN N°17

### RESULTADO NEGATIVO

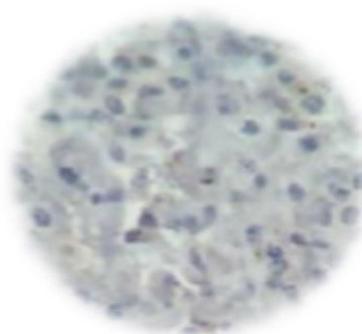


IMAGEN N°18

<https://www.elsevier.es/es-revista-revista-colombiana-cancerologia-361-avance-resumen-linfoma-zona-gris-con-caracteristicas-S0123901518300386>

<http://www.conganat.org/linfo.tortosa/8curso/CD3/S5C2.htm>

## 6.16 CD3

Es una glicoproteína componente del complejo receptor antigénico. La estructura del este consiste en 3-5 cadenas peptídicas con una porción, extendida dentro del

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

citoplasma, a la que se une la tirosina quinasa, es un antígeno de membrana expresado en los linfocitos T maduros. Inicialmente expresado en citoplasma, Adicionalmente puede encontrarse en algunos casos de histiocitosis maligna y enfermedad de Hodgkin.

Transmite las señales recibidas del antígeno al interior celular para finalmente se desencadene una cascada de reacciones en el citoplasma de la célula. (20-35)

#### RESULTADO POSITIVO

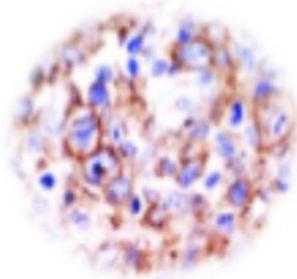


IMAGEN N°19

#### RESULTADO NEGATIVO

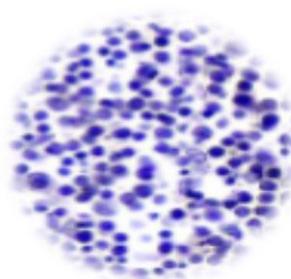


IMAGEN N°20

[https://www.researchgate.net/figure/figura-4-Por-inmunohistoquimica-los-LACG-son-positivos-a-CD30-a-y-EMA-B-y-a\\_fig4\\_321584032](https://www.researchgate.net/figure/figura-4-Por-inmunohistoquimica-los-LACG-son-positivos-a-CD30-a-y-EMA-B-y-a_fig4_321584032)

#### 6.17 Ki67

Marcador de proliferación celular cuya expresión en tumores mamarios se ha relacionado con uno de los peores pronóstico y buena respuesta al tratamiento con quimioterapia, es una proteína de las células cuyo nivel aumenta a medida que estas se preparan para dividirse y formar células nuevas. Mediante un procedimiento de coloración es posible medir el porcentaje de células tumorales que contienen, es una manera de medir qué tan rápido crecen y se dividen las células cancerosas. (20-34).

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

### RESULTADO POSITIVO

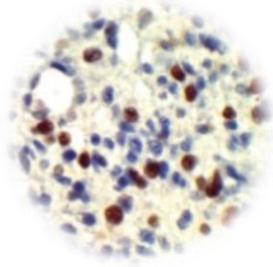


IMAGEN N°21

### RESULTADO NEGATIVO

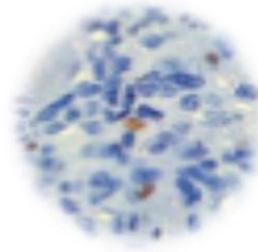


IMAGEN N°22

[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-55522014000300002](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-55522014000300002)  
[https://www.researchgate.net/figure/Figura-7-Tincion-de-inmunohistoquimica-Ki-67-negativo\\_fig5\\_275954211](https://www.researchgate.net/figure/Figura-7-Tincion-de-inmunohistoquimica-Ki-67-negativo_fig5_275954211)

## 6.18 ACTINA

Marcador proteico constituyen microfilamentos de 6 nm de diámetro, está presente en todas las células (Lazarides y Weber, 1984), presentes en las células musculares, las beta que están presentes en las células no musculares y las gamma que pueden presentarse en ambas, su expresión en células musculares estriadas y lisas es diferente, se utiliza para diagnosticar tumores de tipo muscular sino también para especificar si es de fibras estriadas o lisas (Tsukada y col., 1987a; Tsukada y col., 1987b).

Estas células se pueden identificar en la pared de los vasos, muscular y mucosa y propia de pared intestinal y en células estromales de diferentes tejidos, es la primera que da positividad en las células redondas y fusiformes indiferenciadas, reacciona con las células mioepiteliales de diferentes glándulas, sobre todo con las salivares

	<b>FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD</b>	<b>VERSIÓN 02</b>
	<b>FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>CODIGO: F-PI-FEP-03</b>
	<b>GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>FECHA 02-05-2019</b>

y mama, la mayoría de publicaciones se ha hecho sobre la diferencia entre tumores de tipo basal o de tipo no basal. (21)

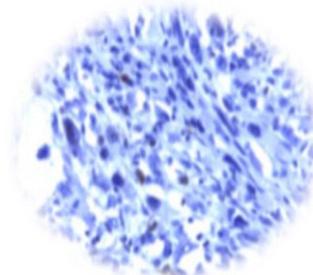
Dentro de las principales actinas se encuentran las actinas alfa.

### **RESULTADO POSITIVO**

### **CONTROL NEGATIVO**



**IMAGEN N°23**



**IMAGEN N° 24**

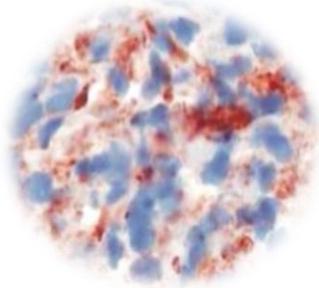
[https://www.researchgate.net/figure/Figura-2-Marcadores-inmunohistoquimicos-positivos-en-EAML-A-B-Actina-de-musculo-liso\\_fig2\\_312148742](https://www.researchgate.net/figure/Figura-2-Marcadores-inmunohistoquimicos-positivos-en-EAML-A-B-Actina-de-musculo-liso_fig2_312148742)

## **6.19 DESMINA**

Marcador proteico de 53 Kd, forma el cito esqueleto de las células musculares lisas no vascular y en músculo estriado esquelético y cardiaco permitiendo la inserción e integración mecánica de las proteínas contráctiles (Osborn y Weber, 1983; Fawcett, 1992), se utiliza como marcador en el diagnóstico de los rhabdomiosarcomas, aunque su especificidad se observa disminuida por la presencia el acto miosina presente en el cito esqueleto de las células. (22).

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

### RESULTADO POSITIVO



MAGEN N°25

<http://www.conganat.org/6congreso/index-324.htm>  
51292016000100010

### RESULTADO NEGATIVO

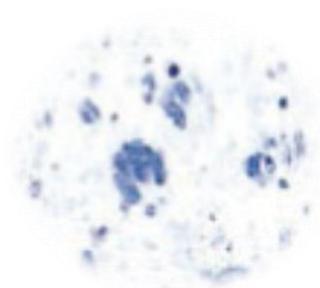


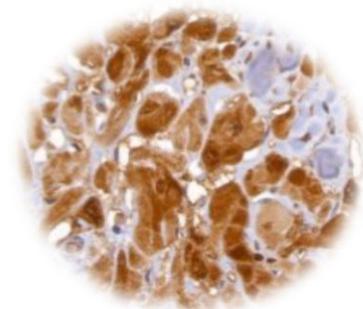
IMAGEN N°26

[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1022-](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-)

## 6.20 S100

Marcador tumoral de naturaleza proteica fijadora de calcio, se expresa células del sistema nervioso central y tejidos derivados de la cresta neural, utilizado en tumores de melanocitos malignos y en el diagnóstico precoz y marcador pronóstico de daño cerebral (hipoxia, traumatismo), tumores indiferenciados. (23)

### RESULTADO POSITIVO



MAGEN N°27

### RESULTADO NEGATIVO

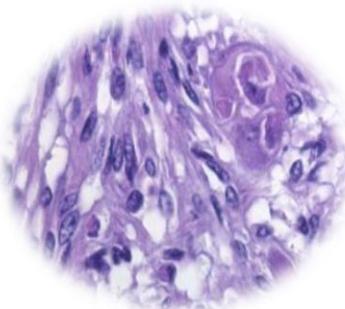


IMAGEN N°28

REF: <http://www.cresa.cat/blogs/sesc/tumor-de-beina-nerviosa-al-cor-duna-vedella/?lang=es>

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

## 6.21 PAX 8

Este es un factor de transcripción y sirve como marcador sensible y específico para los tumores de origen tiroideo, renal y mülleriano por lo tanto los primarios como metastásicos. La expresión de PAX8 en la metástasis es importante para la determinación del linaje celular especialmente en aquellos con tumor primario desconocido o en el contexto de múltiples tumores primarios, se caracteriza por ser un marcado en la inmunohistoquímica (24).

### RESULTADO POSITIVO

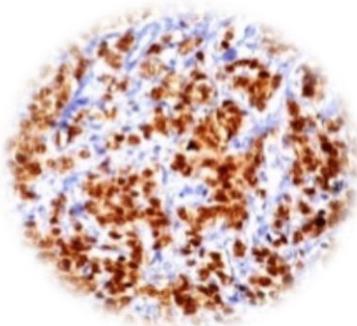


IMAGEN N°29

### RESULTADO NEGATIVO

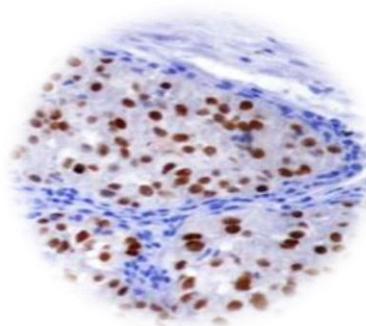


IMAGEN N°30

<https://www.histopat.es/2013/07/paired-box-gene-8-protein-pax8/>  
<https://www.histopat.es/2013/07/paired-box-gene-8-protein-pax8/>

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

## 7 OBJETIVO GENERAL

Determinar la efectividad, sensibilidad y viabilidad del FINE FIX, comparado con el Formol, para el procesamiento de tejidos en la técnica de Inmunohistoquímica.

## 8 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Comparar la afinidad del FINE FIX y del Formol, al observar estructuras celulares, proteínas y/o marcadores específicos en la técnica de Inmunohistoquímica.
- Observar la sensibilidad y especificidad en la técnica Inmunohistoquímica, realizada en tejidos fijados con FINE-FIX, comparada con la observada en los tejidos fijados con Formol.
- Concluir la efectividad, sensibilidad y viabilidad del FINE-FIX, conforme a la evaluación brindada por los patólogos internos y externos del Hospital de San José y el Hospital Infantil Universitario de San José.

## 9. METODOLOGIA PROPUESTA

Diseño de Investigación: Estudio experimental.

Población: Tejidos obtenidos a partir de necropsias realizadas en el Hospital de San José y en el Hospital Infantil Universitario de San José.

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

## 10. CRITERIOS DE SELECCIÓN:

### 10.1 Criterios de inclusión:

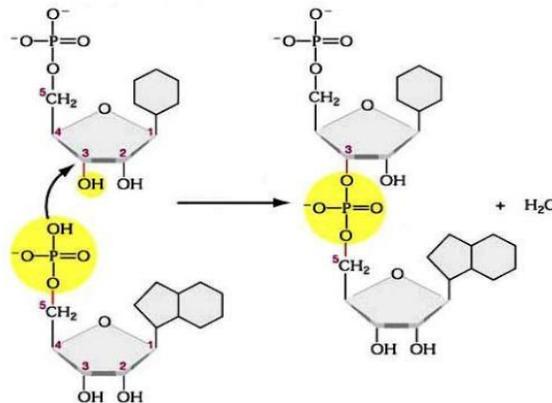
Tejidos provenientes de cadáveres sometidos a necropsia clínica fijados con FINE-FIX y con formol, provenientes de cadáveres sometidos a necropsia clínica: piel, glándula salival, lengua, laringe, ganglio, mama, esófago, estómago, hígado, intestino, corazón, pulmón, riñón, testículo, próstata, útero, trompa, ovario, placenta, tejidos blandos, tiroides, timo, bazo, paratiroides y hueso.

### 10.2 Criterios de exclusión:

- Necropsias realizadas en cadáveres con más de 24 horas de muerte, conlleva a la acidosis tisular, desnaturalización de enzimas y material genético, produciendo alteración en su Inmunoreactividad.
- Autopsias realizadas en cadáveres que han fallecido como consecuencia de infecciones con alto riesgo o sepsis e intoxicaciones, evidencian agotamiento del oxígeno produciendo en el cerebro una baja actividad, hipoperfusión e hipoxia tisular, iniciándose un proceso de descomposición y aumento del dióxido de carbono y del pH en los tejidos, ocasionando lisis celular, sin dejar de lado, que cerca de 100 billones de microorganismos y bacterias anaerobias presentes en el tracto gastrointestinal, destruyen los órganos abdominales.
- Cadáveres preservados en formol, por su acción al hidrolizar los enlaces fosfodiéster del ADN (Douglas y Rogers 1998), además el ácido fórmico contribuye a la desnaturalización de las proteínas y ADN, generando hipoxia prolongada en el tejido y reducción del pH, esto conlleva a obtener menor

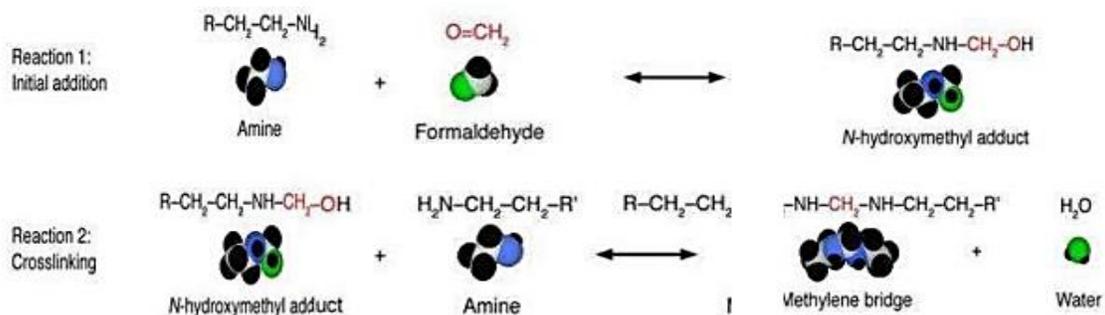
	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

cantidad y calidad en su extracción (Tokuda y cols., 1990), interfiriendo de esta manera en los estudios moleculares, indispensables para el diagnóstico, seguimiento o prevención de una patología.



GRÁFICA N°9: Enlace Fosfodiéster

<http://mariadoloresbio.blogspot.com/2011/11/enlace-fosfodiester.html>



GRÁFICA N°10: Interacción de la molécula de formol con los grupos amino de la célula.

<http://mriuc.bc.uc.edu.ve/bitstream/handle/123456789/6410/lubrice%C3%B1o.pdf?sequence=1>

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

### 11. MUESTREO:

En este estudio no se realizará un cálculo del tamaño muestra, teniendo en cuenta que es un estudio piloto, por lo cual los investigadores definieron hacer una selección por conveniencia de tejidos para un total de 25 muestras, las cuales serán recolectadas consecutivamente de acuerdo a la disponibilidad de la muestra patológica.

### 12. DEFINICIÓN DE GRUPOS:

TEJIDOS FIJADOS CON FINE-FIX	TEJIDOS FIJADOS CON FORMOL
Técnica histológica.	Técnica histológica.
Técnica inmunohistoquímica.	Técnica inmunohistoquímica.
Lectura e interpretación de resultados.	Lectura e interpretación de resultados.

TABLA N°5 DEFINICIÓN DE GRUPOS  
Propia del autor

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

### 13. ESTRATEGIA DE RECLUTAMIENTO:

Se obtendrán los tejidos procedentes de necropsia, realizadas en la morgue del Hospital de San José y Hospital Infantil Universitario de San José, realizando un registro consecutivo

Ejemplo:

**FORMOL: 1-001.** (Para especificar el tejido piel fijada con formol)

**FINE-FIX: 2-001.** (Para especificar el tejido piel fijada con FINE-FIX)

Después de realizar correctamente la técnica histológica, se realizará el proceso de la técnica de Inmunohistoquímica con los diferentes marcadores.

1. Piel	9. Hígado	17. Trompa
2. Glándula salival	10. Intestino	18. Ovario
3. Lengua	11. Corazón	19. Placenta
4. Laringe	12. Pulmón	20. Tejidos blandos
5. Ganglio	13. Riñón	21. Tiroides
6. Mama	14. Testículo	22. Timo
7. Esófago	15. Próstata	23. Bazo
8. Estómago	16. Útero	24. Paratiroides
		25. Hueso

TABLA N°6. TEJIDOS A PROCESAR  
REF: CREADA POR EL AUTOR

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

MARCADORES TUMORALES	INMUNOTINCIÓN
CA-125	Cáncer de ovario
CA 15-3 y CA 27-29	Cáncer de próstata
CEA	Cáncer color rectal, pulmón, estómago, tiroides, páncreas, seno y ovario
AFP	Cáncer de hígado, ovario y testículos
EMA	Linfomas de grandes Linfocitos B y T
PROTEÍNA S-100	Leucemias mieloides, algunos linfomas T, histiocitos, tumores neurales, melanoma, sarcomas y carcinomas de mama
CITOKERATINAS	Carcinomas epidermoides, nasofaríngeos, de tiroides, células renales, embrionarias, adenocarcinomas, sarcomas epiteloide y sinovial
DESMINA	Tumores de partes blandas no musculares, óseos, melanomas, linfomas, adenocarcinomas de mama, pulmón, riñón, endometrio.
ACL	Linfomas no Hodgkin

**TABLA N°7 MARCADORES UTILIZADOS**

<https://medlineplus.gov/spanish/pruebasdelaboratorio/marcadores-tumorales/>

#### **14. DEFINICIÓN DE VARIABLES:**

Obtención de los tejidos, seguimiento de los procesos de fijación, técnica histológica y vigilancia del manejo y procesamiento en la técnica de inmunohistoquímica hasta la entrega de los marcadores anteriormente relacionados a analizar (láminas procesadas), recuperación de los resultados y generación de las conclusiones.

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

Nombre Variable	Definición Operativa	Relación	Naturaleza, nivel de medición	Nivel Operativo
<b>Tejidos: Con criterios de inclusión, identificación.</b>	Identificación extracción, separación, corte y rotulado.	Identificación de las variables reconocibles entre los dos procesos de fijación a relacionar o comparar. (*)	Cualitativa nominal.	Esófago, ganglios linfáticos, timo, bazo, intestino (yeyuno, íleon, colon), corazón vasos sanguíneos, riñón y glándula suprarrenal, laringe, hígado, vesícula biliar, apéndice cecal, pulmón, ovario y trompa de Falopio, próstata, glándulas salivales, piel, tejidos blandos, estómago, testigo, tiroides y glándulas paratiroides, útero y placenta, hueso, mama, sistema nervioso.
<b>Fijación.</b>	<b>Con formol</b> Tiempo  Calidad	(*)	Cuantitativa continua  Cualitativa nominal	Tiempo de fijación: 1 hora por cada mm de la muestra. Apreciación macroscópica post fijación.
	<b>Con FINE-FIX</b>	(*)	Cuantitativa continua	1 hora por cada mm de la muestra

	<b>FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD</b>	<b>VERSIÓN 02</b>
	<b>FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>CODIGO: F-PI-FEP-03</b>
	<b>GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>FECHA 02-05-2019</b>

	Tiempo Calidad		Cualitativa nominal	Apreciación macroscópica post fijación.
<b>Volumen.</b>	<b>Con formol</b>	(*)	Cuantitativo continuo	20 veces el volumen según la masa del tejido.
	<b>Con FINE- FIX</b>	(*)	Cuantitativo continuo	20 veces el volumen según la masa del tejido.
<b>Calidad</b>	<b>Con formol</b>	(*)	Cualitativa nominal	Proceso adecuado de inclusión, corte y técnica de Inmunohistoquímica para la lectura con criterios abalados por el patólogo.
	<b>Con FINE- FIX</b>	(*)	Cualitativa nominal	Proceso adecuado de inclusión, corte y coloración para la lectura con criterios abalados por el patólogo.
<b>Técnica Histológica</b>	<b>Con formol Con FINE- FIX</b>	(*)	Cualitativa nominal	Proceso adecuado de inclusión, corte, desparafinar, deshidratar, hidratar cada tejido.

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

<b>Técnica Inmuno histoquímica</b>	<b>Con formol Con FINE-FIX</b>	(*) Identificación de las variables reconocibles en la técnica de Inmuno histoquímica, relacionar o comparar.	Cualitativa nominal y cuantitativa  Factores Intrínsecos  Factores Extrínsecos	Proceso adecuado de la técnica como se describió anteriormente, lectura con criterios abalados por el patólogo, realizada e interpretada por los patólogos.  Fijación, procesamiento de tejidos, niveles de expresión del antígeno y preservación del mismo.  Recuperación antigénica, tipo y concentración del buffer utilizado para la dilución y lavado de las placas, Anticuerpo y dilución, sistema de detección y cromógeno, interpretación y nivel del umbral.
------------------------------------	--------------------------------	--	--	---

**TABLA N8: VARIABLES**  
Creada por el autor

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

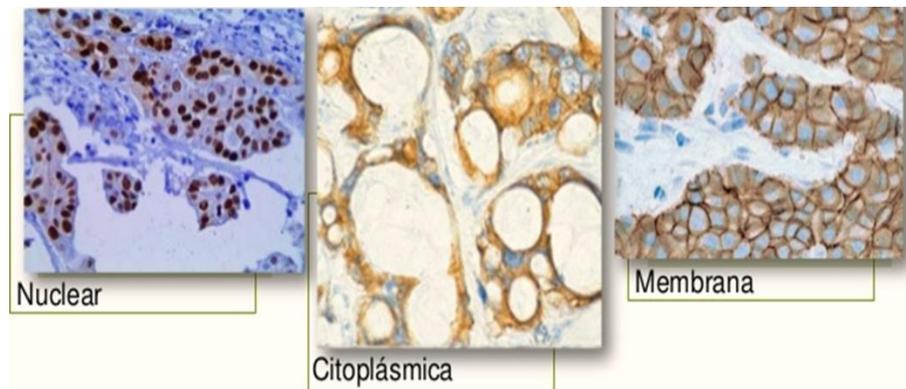
## 15. CRITERIOS DE CALIDAD

Para validar la técnica de Inmunohistoquímica y hacer de sus resultados un soporte valedero en el diagnóstico de diferentes patologías, en este trabajo se tendrá en cuenta los siguientes criterios de calidad:

- Calidad del corte.
- Relación núcleo citoplasma.
- No visualización de artefactos de fijación o proceso de Inmunohistoquímica.
- Morfología celular adecuada para el diagnóstico.
- Diferenciación, nitidez y contraste de la Hematoxilina de Harris.
- Ausencia de positividad o ruido de fondo causado por la presencia de sustancias endógenas como la peroxidasa, fosfatasa y biotina.
- Identificación de los patrones de inmunotinción:
- Patrones celulares: distribución del antígeno dentro de las células, se clasifican:
- **Patrones nucleares**, citoplasmáticos, de membrana, mixtos.
- **Patrones de inmunotinción celular nuclear**: Receptor de estrógeno (RE), Receptor de progesterona (RP), Ki67, P53, entre otros. Leica Biosistema. Advanced Staining Catalog. USA Edition. 2014.
- **Patrones de inmunotinción celular Citoplasmático**: Filamentos intermedios, vimentina, micro túbulos, microfilamentos, entre otros. Leica Biosystem. Advanced Staining Catalog. USA Edition. 2014.

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

- **Patrones de inmunotinción celular Membrana:** CD4, CD8, CD20, HER-2, entre otros. Leica Biosystem. Advanced Staining Catalog. USA Edition. 2014.
- **Catalog.** USA Edition. 2014. Dabbs David MD. Diagnostic Immunohistochemistry Theranostic
- **Patrones tisulares:** Permite analizar qué población celular es positiva para un determinado antígeno. Epitelios, células germinales, tejido conectivo, etc.
- **Patrones de inmunotinción celular:** Golgi (Patrón puntiforme pan nuclear): CD15, CD30. En algunas clases de tumores se pueden utilizar citoqueratinas (Ej.: Ctk-20 para tumores neuroendocrinos de la piel) Leica Biosystem. Advanced Staining Catalog. USA Edition. 2014.



**IMAGEN 31: PATRONES DE INMUNOTINCIÓN CELULAR EN LA TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA**  
REF: <https://es.slideshare.net/lhumbertocc/inmun>

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

## 16. CONTROL DE SESGOS

Los sesgos suelen ser resultados erróneos, los que pueden darse por efecto del azar o de forma sistemática. es decir no aparece como un hecho aleatorio. Quizás los de mayor relevancia son debidos al observador, a lo que se mira y al microscopio con el que se trabaja.

Por lo tanto, aunque su importancia es esencial en el desarrollo de una investigación, es bueno mencionar que ninguna está exenta de ellos; y que lo importante y lo que se quiere es conocerlos para evitarlos, minimizarlos o corregirlos.

Lo que se quiere en esta investigación es trabajar para evitar y corregir los sesgos que en la recopilación de los datos se puedan presentar confirmando los datos y correlacionando todas las variables.

Todo lo anterior, se realizará con vigilancia y seguimiento por parte de los patólogos y profesores encargados del proceso de la necropsia, fijación y procesamiento de los Tejidos, así como la lectura de las placas procesadas con cada uno de los fijadores.

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

ACCIÓN ADECUADA	CONSECUENCIAS NEGATIVAS
Vigilar el tiempo de fijación de los tejidos.	Mala fijación: tiempo incorrecto (24-72 H).
Rectificar el lugar donde se dejarán los tejidos	Dejar a altas temperaturas ambientales
Seguir los protocolos y pasos para evitar un mal resultado	Manipulación inadecuada de los materiales y reactivos.
Verificar la limpieza y baterías antes de procesar cada corte	Incorrecto procesamiento: contaminación y baterías agotadas en el procesador.
Vigilar la técnica de inclusión, colocar el tejido adecuadamente.	Mal procedimiento de inclusión.
Supervisar la temperatura: 58°C-60°C.	Alteración en la temperatura de la parafina Por daño en el dispensador.
Revisar el micrótopo: 2-3 micras.	Realizar cortes demasiado gruesos, ocasiona desprendimiento del tejido durante el proceso.
Vigilar temperatura y proceso de recuperación antigénica.	Incorrecto procedimiento, no facilita la avidéz de los anticuerpos frente a los epítomos.
Realizar el proceso de bloqueo de sustancias endógenas como la peroxidasa, fosfatasa alcalina y biotina.	Producción de fondos o ruido inespecífico.

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

Verificar diluciones de anticuerpos primarios y secundarios.	Una inadecuada dilución genera fenómenos de Pro-zona o post-zona en la reacción.
Vigilar secuencia del procedimiento de la técnica.	Incorrecto procedimiento falsea los resultados.
Controlar cantidad de resina sobre cada tejido, colocar la laminilla evitando formación de burbujas.	Montaje inadecuado de lámina.

TABLA N°9: SESGOS  
CREADA POR EL AUTOR

## 17. COMPARACIÓN DE RIESGOS y BENEFICIOS

### 17.1 En caso de perder una muestra.

A lo largo de esta investigación se tendrán en cuenta los posibles riesgos que se podrían identificar en su elaboración, entre ellos se planteó un escenario hipotético en el cual un integrante del grupo tuviera un accidente de riesgo biológico, implementado de forma inmediata el protocolo de manejo y la activación de la póliza de cubrimiento que proporciona la Universidad a cada estudiante. (Ver anexos). Sin embargo, para evitar la presencia de posibles riesgos anteriormente mencionados, los integrantes del equipo fueron capacitados previamente en Normas de Bioseguridad para el manejo de especímenes biológicos, manejo adecuado de extintores e identificación del riesgo químico y reporte de eventos adversos

Se contempló como riesgo para esta investigación, la posible pérdida de una muestra, para evitar que esto suceda se estableció un protocolo por medio del uso de una lista de verificación con los siguientes aspectos a tratar:

DIVISION DE INVESTIGACIONES

Página

75 de 97

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

- a) Frascos recolectores marcados según lista de los 25 tejidos, enumerados FORMOL: 1.001 y FINE FIX: 2.001
- b) Listas de verificación de los tejidos que se van colocando en cada frasco, de los tejidos a colocar en cada equipo procesador, del procesamiento de la técnica de Inmunohistoquímica en los tejidos fijados con FINE-FIX y con formol con cada uno de los anticuerpos elegidos, de la evaluación de los criterios por parte de los estudiantes, de las láminas entregadas a los patólogos internos y externos para su lectura e interpretación.
- c) No se realizará identificación de los cadáveres como fuente de los especímenes, por lo cual se garantizará la confidencialidad.

### **17.2 En caso de realizar inadecuadamente la técnica Inmunohistoquímica.**

Este es otro riesgo que se contempló, una medida preventiva es la elaboración de un plegable con el paso a paso de la técnica colocado en la zona de procesamientos.

Los patólogos contarán con sus propios formatos, en el que harán evidencia de sus lecturas, bajo criterios y conocimientos establecidos por su amplia experiencia en la microscopía (Anexos 1), los estudiantes la calidad y sensibilidad de la técnica en sus formatos (Anexos 2).

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

## 18. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Estudiar diferentes epítomos en la misma proteína.	Calidad de los anticuerpos monoclonales.
Alta sensibilidad.	Presentar reactividad cruzada.
Alta especificidad.	Ruido de fondo.
Disponibilidad en enzimas, sustratos y cromógenos.	Reactivos altamente cancerígenos.
Poco tiempo con equipos o automatizada.	Mucho tiempo manualmente.
Bajo costo.	Estandarización precisa de los marcadores en equipos
Excelente calidad y durabilidad de los reactivos.	Conservación prolongada de los tejidos, realizada la técnica

TABLA N°10; VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA  
REF: CREADA POR EL AUTOR

## 19. BENEFICIOS

- Apropiación social del conocimiento: Artículo original.
- Demostrar la utilidad y características fisicoquímicas FINE-FIX® (Milestone), en la realización de la técnica Inmunohistoquímica.
- Garantizar material genético con mayor calidad y cantidad para realizar estudios moleculares.

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

- Observar la calidad en la determinación de marcadores antigénicos y proteínas específicas, reflejadas en la claridad y sensibilidad de la técnica.
- Esta sustitución es una medida preventiva: eliminar un riesgo actuando en el origen.
- A futuro disminuir las estadísticas de riesgo de cáncer.
- Disminuir niveles ambientales (0.02-0.0 ppm), contaminación del agua por derramamientos.

## 20. INSTRUMENTO DE MEDICIÓN

Se estructura a partir de las variables definidas por los investigadores.

Formatos de seguimiento y verificación en los que se incluya cada proceso: obtención de cortes histológicos, realización de la técnica inmunohistoquímica, lecturas previas realizadas por las estudiantes, lecturas definitivas realizadas por los patólogos, resultados y conclusiones.

## 21. PLAN DE ANÁLISIS

- Evaluación de la estructura tisular y celular.
- Análisis comparativo: estructuras celulares y afinidad en cada marcador utilizado.
- Determinar las características básicas de sensibilidad y especificidad del sustituyente FINE-FIX en la técnica de Inmunohistoquímica, al compararlo con este mismo proceso realizado en tejidos fijados con formol.

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

## 22. CONSIDERACIONES ÉTICAS

- **DECLARACION DE HELSINKI**

Establece la ética en el manejo de muestras como material de investigación y de la información, rescatando la privacidad de los datos y protegiendo la seguridad que se requiere al manejar tejidos de seres humanos que serán motivo de la investigación y el manejo ético de la información obtenida.

Para nuestra investigación, las muestras serán obtenidas de un cadáver del cual no se utilizarán datos de historia clínica ni personales ya que no son fundamentales en este proceso.

La recolección de las muestras, será realizada por un profesional de la patología, con la preparación idónea de lo que se busca investigar, utilizando para su procedimiento todas las medidas de protección que para la ocasión implica, como son, bata quirúrgica desechable, guantes de nitrilo, tapa bocas, gorro quirúrgico desechable, botas de caucho y conservara el protocolo de necropsias en el contexto de la recuperación de tejidos tipo muestra, biopsia resección las cuales procederá a depositar en frascos que como marcaje tendrán lo que contienen como fijador y el tipo de tejido que se colocará únicamente. Nuestras observaciones no incluyen procesos investigativos que involucren seres humanos vivos, ni especie viva alguna, será una investigación donde los resultados obtenidos podrán ser aplicados a favor de procesos investigativos cotidianos en los laboratorios de patología donde la conservación celular y su contexto, nos ofrecerá la posibilidad de determinar de manera más segura y oportuna sus cambios por la enfermedad y de esta manera poder aportar a la ciencia médica un medio para actuar con más prontitud en las necesidades de la salud de nuestra sociedad. (25, 26)

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

- **Resolución 8430 de 1993 y ley 1581 de 2012**

Con esta resolución se busca tener en cuenta todas aquellas normas que son reglamentarias para poner en marcha la investigación en donde el objeto de esta investigación son tejidos humanos y su contexto ético.

Es por esto, que debemos reservarnos toda aquella información que sea correspondiente a los datos del cadáver, ya que este trabajo lo realizaremos con un cadáver NN de no más de 24 horas de deceso, donde serán obtenidas las muestras por un profesional de patología, afiliado a la Fundación Universitaria Ciencias de la Salud y al hospital de San José, conservando así todas las medidas preventivas para llevar a cabo este proceso.

El consentimiento informado no es necesario, como ya se mencionó, se tomarán muestras de un cadáver en su proceso de necropsia clínica, siguiendo las pautas antes mencionadas. (25, 26)

- **Ley 1581 de 2012**

Disposiciones generales de protección de datos, es fundamental para nuestro estudio tener en cuenta las horas de fallecimiento y que la causa de muerte no sea por enfermedad infecciosa o contagiosa que ponga en riesgo la salud de las personas colaboradoras en la realización de este trabajo. (25, 26)

- **Resolución 8430 de 1993**

La investigación con seres humanos, se clasifica como un estudio sin riesgo, ya que la fuente de información son los especímenes que usualmente son estudiados por patología en un cadáver, como un procedimiento diario de una autopsia, se deberá ajustar a los principios científicos y éticos que la justifiquen.

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

En este proyecto, se manejarán químicos que pueden afectar nocivamente nuestra salud, por ello se realizó una investigación de las normas del trabajo seguro para trabajadores con riesgo de exposición de materiales químicos. (25, 26)

- **Real Decreto 665/1997**

Hace referencia a la protección de los trabajadores frente a los riesgos derivados de la exposición a agentes cancerígenos y menciona o exige:

- La utilización del formaldehído no se debe llevar a cabo en un sistema cerrado.
- Las sustancias deben ser colocadas en su lugar de almacenamiento tan pronto como se terminen de utilizar; se debe evitar al máximo que los frascos permanezcan en los mesones o que obstruyan la libre circulación del personal.
- Si se trabaja con ácidos los vapores y calor producidos son peligrosos, por tal motivo, se recomienda trabajar con estas sustancias en las cabinas de extracción y evitar el contacto con la piel y los ojos.
- Debe mantenerse un inventario de los reactivos del laboratorio en el que este indicada la fecha de compra, la fecha de inicio de utilización, y el periodo de vida media del reactivo.
- En el almacenamiento de los reactivos, deben tenerse en cuenta que no deben colocarse juntos. (25).

- **Ley 23 de 1982 modificado Plan Nacional de Desarrollo**

	<b>FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD</b>	<b>VERSIÓN 02</b>
	<b>FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>CODIGO: F-PI-FEP-03</b>
	<b>GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>FECHA 02-05-2019</b>

- Adicionalmente para el buen funcionamiento de nuestro trabajo debemos tener en cuenta leyes y normas que nos ayuden a no cometer fraude y mantener nuestros derechos de autor, en estas normas el artículo número 12, nos habla:

El autor de una obra protegida tendrá el derecho exclusivo de realizar o de autorizar uno o cualquiera de los actos siguientes:

- Reproducir la obra.
- Efectuar una traducción, una adaptación, un arreglo o cualquier otra transformación de la obra.
- Comunicar la obra al público mediante representación, ejecución, radiodifusión o por cualquier otro medio. (26).

Para el desarrollo de nuestra investigación, en el componente experimental o trabajo en el laboratorio de histología, utilizaremos alcoholes y derivados de hidrocarburos como son el xilol y parafinas, los cuales se utilizan teniendo en cuenta las normas internacionales de seguridad para el manejo correcto de estas sustancias, utilizando equipos que limitan su exposición al medio y los operarios del mismo, utilizan elementos de protección que limitan su exposición al componente toxico.

Los elementos de protección incluyen bata, guantes, mono gafas, mascarilla antigases certificada, botas y el lugar donde se encuentran, cumple con las especificaciones de ventilación adecuada para el desarrollo del trabajo.

Una vez las soluciones usadas, para el procesamiento de las muestras están fatigadas o sucias, todas estas se depositan en galones marcados para el desecho de las mismas y su destino está en manos de una empresa de incineración, quienes

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

en su planta de tratamiento darán lugar al proceso de eliminación de estos elementos contaminantes.

De esta manera, protegemos nuestro medio ambiente del potencial contaminante, que estos elementos de desecho contienen. (25, 26)

### 23. CRITERIOS ÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN

En este trabajo todas las decisiones y manejo de este protocolo de investigación, se basan en los principios, éticos y juicios de valor moral de las investigaciones médicas en los seres humanos y sus cambios morfológicos presentados en la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial; 52 Asamblea general, Edimburgo, Escocia Octubre del 2000. (25, 26)

### 24. RESULTADOS/PRODUCTOS ESPERADOS

#### 24.1 PRODUCTOS

- **Productos resultados de actividades de generación de nuevo conocimiento:** según Biosix import “FINE-FIX es el Sustituto del formol. Concentrado patentado libre de formalina y a base de agua. Al diluirlo con etanol su formulación de aditivos de baja toxicidad supera los inconvenientes asociados con el uso de etanol puro o fijadores a base de etanol” (27).

Según PATOLOGIA revista Latinoamérica “La inmunohistoquímica es una técnica que ha revolucionado la histopatología” y “Algunos anticuerpos dirigidos contra

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

antígenos de las membranas suelen producir marcación perimetral, que puede estar acompañada de acentuación citoplasmática, para nuclear (aparato de Golgi) como el CD30, CD15, el LMP-1” (28)

- **Productos resultados de actividades de apropiación social del conocimiento:**

Una propuesta para generar el conocimiento de las características del FINE-FIX y formol en la técnica de Inmunohistoquímica, generación de contenidos impresos, multimedia, virtuales y de audio; divulgación de los resultados en eventos científicos del área e informes finales de investigación.

- **Productos de actividades relacionadas con la formación de recurso humano para trabajos de grado:** manejo de bases de datos.

## 24.2 POTENCIALES BENEFICIARIOS

Comunidad científica, Organizaciones del sector salud comprometidas con el bienestar de su comunidad de estudiantes, patólogos, cito histólogos y medio ambiente.

- **Académicos:** Las temáticas abordadas fortalecerán los conocimientos de los estudiantes en campos del saber relacionados con las áreas de Cito histología, Patología y diseño de proyectos, así como las competencias requeridas para el trabajo en equipos interdisciplinarios.

La realización de un artículo.

- **Sociales:** generar un impacto a futuros estudiantes para que tengan un conocimiento más claro de la diferenciación que se evidencia en tejidos

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

fijados con FINE-FIX y con formol cuando se realiza la técnica de Inmunohistoquímica, adicionalmente darles a entender la importancia de la inmunohistoquímica en el ámbito laboral.

## **25. IMPACTOS ESPERADOS A PARTIR DEL USO DE LOS RESULTADOS:**

Demostrar la utilidad y características fisicoquímicas del sustituto FINE-FIX® (Milestone), en la realización de la técnica Inmunohistoquímica, al observar la calidad en la determinación de marcadores antigénicos y proteínas específicas, reflejadas en la claridad y sensibilidad de la técnica, para cada ejemplar.

## **26. GRUPO Y LÍNEA DE INVESTIGACIÓN AL QUE SE INSCRIBE LA PROPUESTA**

Los proyectos de investigación que se desarrollan en la FUCS requieren ser avalados por al menos uno de los grupos de investigación institucionales, e identificar la línea a la que corresponden. Para la presentación del proyecto se requiere que el investigador principal y sus con investigadores tengan actualizada su hoja de vida en CvLAC, y estas sean incluidas en el proyecto.

## **27. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES**

Relación de actividades a realizar en función del tiempo (meses), en el periodo de ejecución del proyecto, sin mención de los meses precisos y de acuerdo al siguiente esquema:

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

Tabla 11. Cronograma de actividades y los responsables

	Responsable	Mes 1-2-3	Mes 4-5-6	Mes 7-8-9	Mes 10-11	Mes 12-13	Mes 10-11-12
<b>Organización: Pregunta problema, objetivo general, específicos, propósito e introducción</b>	Martha Patricia Isaza José Fernando Polo Michelle Arias Nicol Natalia García	x					
<b>Recopilación y organización de la información. Generación del protocolo.</b>	Martha Patricia Isaza José Fernando Polo Michelle Arias Nicol Natalia García		x	x			
<b>Acompañamiento en autopsias</b>	Martha Patricia Isaza José Fernando Polo Michelle Arias Nicol Natalia García				x		
<b>Verificación del cumplimiento de criterios escogidos</b>	Martha Patricia Isaza José Fernando Polo Michelle Arias Nicol Natalia García					x	
<b>Recolección, fijación y rotulación de muestras</b>	Martha Patricia Isaza José Fernando Polo Michelle Arias Nicol Natalia García					x	
<b>Procesamiento, inclusión, cortes, realización de la técnica de Inmunohistoquímica</b>	Martha Patricia Isaza José Fernando Polo Michelle Arias Nicol Natalia García					x	
<b>Verificación de los criterios de calidad</b>	Martha Patricia Isaza José Fernando Polo					x	x

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

<b>de la técnica.</b>	Michelle Arias Nicol Natalia García						
<b>Lectura microscópica</b>	Patólogos del Hospital de San José y del Hospital San José Infantil.					x	x
<b>Resultados y conclusiones</b>	Martha Patricia Isaza José Fernando Polo Michelle Arias Nicol Natalia García						x

## 28. PRESUPUESTO

### 26.1 Tabla 12. PRESUPUESTO GLOBAL

Presupuesto global de la propuesta por fuentes de financiación				
RUBROS	FINANCIADO FUCS		FINANCIADO CONTRAPARTIDA	TOTAL
	Desembolsable	No Desembolsable		
PERSONAL	NA	6.000.000		6.000.000
OTRO PERSONAL	NA	2.000.000		2.000.000
EQUIPOS	NA	NA	NA	
SOFTWARE	NA	NA	NA	NA
MATERIALES	3'086.105			3'086.105

	<b>FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD</b>	<b>VERSIÓN 02</b>
	<b>FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>CODIGO: F-PI-FEP-03</b>
	<b>GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>FECHA 02-05-2019</b>

SERVICIOS TECNICOS	NA	1.160.000	NA	1.160.000
CAPACITACION	NA	NA	NA	NA
BIBLIOGRAFIA	NA	2.000.000	NA	2.000.000
PUBLICACIONES Y PATENTES	NA	1.500.000	NA	1.500.000
<b>TOTAL</b>				<b>15'746.105</b>

\*Corresponde al 10 % de valor total del equipo (año).

\*\*Este rubro será evaluado una vez se obtengan productos de difusión.

### **PRESUPUESTO DETALLADO POR RUBROS**

Las tablas que aparecen a continuación permiten conocer el detalle por rubros presupuestales y deben ser diligenciadas de manera concordante con la tabla global.

Tabla 1 Personal							
Nombre	Formación	Función	Dedicación Hora / Semana	Recursos			Valor m
				Financiado FUCS		Financiada contrapartida	
				Desembolsable	No Desembolsable		

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

Martha Patricia Isaza Cortes	Profesional	Investigador principal	3		2.000.000		
	Profesional	Investigador principal	3		4.000.000		

Tabla 2 Otro Personal								
Nombre	Formación	Función	Dedicación Hora / Semana	Recursos		Valor mensual	No meses	Total
				Financiado FUCS	Financiada contrapartida			
				Desembolsable	No Desembolsable			
4 patólogos: 2 internos y dos externos	Profesional	Evaluar	2		2.000.000			

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

Tabla 3 Materiales y suministros				
Materiales	Justificación	Valor unitario	Cantidad	Valor Total
Resma	Formatos	11.900	1	11.900
Caja esferos	Escribir resultados	6.300	6	6.300
Gorros	Barrera de protección	13.000	Paquete de 50	13.000
Caja de guantes vinilo	Barrera de protección	50.000	Caja de 50 pares	50.000
Caja de tapabocas desechable	Barrera de protección	8.000	Caja de 50 unidades	8.000
Careta	Barrera de protección	4.000	4	16.000
Laminas procesadas	Definición de contenido	40.000	30	1.200.000
Formol	Fijador	52.955	1	52.955
Etanol	Diluyente	23.000	3,5	80.500
FINE-FIX	Fijador sustituyente	354.000	1	354.000
<b>TOTAL</b>				<b>\$1.792.655</b>

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

## • BIBLIOGRAFIA

1. <http://iah.salud.gob.ar/doc/Documento203.pdf>
2. [file:///C:/Users/mvari/Downloads/MM029-005\\_-\\_FineFIX\\_-\\_Operator\\_Manual%20\(3\).pdf](file:///C:/Users/mvari/Downloads/MM029-005_-_FineFIX_-_Operator_Manual%20(3).pdf)
3. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo/sustancias/formaldehido/hoja-informativa-formaldehido>
4. <https://repositorio.fucsalud.edu.co/bitstream/handle/001/1044/Conocimiento%20sobre%20la%20t%C3%A9cnica%20de%20fijaci%C3%B3n%20de%20muestras%20anatomopatol%C3%B3gicas%2Cpor%20parte%20del%20personal%20que%20labora%20en%20una%20Instituci%C3%B3n%20prestadora%20de%20servicios%20de%20salud%2C%20HSJ.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
5. [http://www.seapcongresos.com/2011/SEAP/19\\_mayo\\_jueves/Anfiteatro/08.00/Dolores\\_Isabel.pdf](http://www.seapcongresos.com/2011/SEAP/19_mayo_jueves/Anfiteatro/08.00/Dolores_Isabel.pdf)
6. <https://prevencionar.com.co/2018/08/15/que-es-el-formaldehido-y-donde-se-encuentra/>
7. [https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/anales/v60\\_n4/inmunoh.htm](https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/anales/v60_n4/inmunoh.htm)
8. <https://www.breastcancer.org/es/sintomas/analisis/tipos/ihq>
9. [file:///C:/Users/mvari/Downloads/1839-Texto%20del%20manuscrito%20completo%20\(cuadros%20y%20figuras%20insertos\)-7078-1-10-20130808.pdf](file:///C:/Users/mvari/Downloads/1839-Texto%20del%20manuscrito%20completo%20(cuadros%20y%20figuras%20insertos)-7078-1-10-20130808.pdf)
10. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16683912/>
11. [file:///C:/Users/mvari/Downloads/66336\\_Fuertes\\_de\\_Veg%C3%A1%20\\_Laura%20\(5\).pdf](file:///C:/Users/mvari/Downloads/66336_Fuertes_de_Veg%C3%A1%20_Laura%20(5).pdf)
12. <https://catalogo.fucsalud.edu.co:2056/#!/content/book/3-s2.0-B9780323532655000277?scrollTo=%23hI0000857>
13. Inés Martín, Lacave Tomás García, Caballero. Atlas de Inmunohistoquímica
14. ARTÍCULO DE REVISIÓN: Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas. NINA PATRICIA MACHADO, GERMÁN ALBERTO TÉLLEZ, JOHN CARLOS CASTAÑO
15. <https://www.abyntek.com/diferencias-anticuerpos-monoclonales-y-policlonales/>

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

16. <https://www.redalyc.org/jatsRepo/379/37964363011/html/index.html>
17. <https://www.agilent.com/cs/library/packageinsert/public/107610005.PDF>
18. <https://www.histopat.es/2005/09/ttf1-thyroid-transcription-factor-1/>
19. [https://www.instituto-roche.es/static/oncobyg/files/info\\_linfomas.pdf](https://www.instituto-roche.es/static/oncobyg/files/info_linfomas.pdf)
20. <https://www.breastcancer.org/es/sintomas/diagnostico/tasa>
21. <https://conganat.uninet.edu/conferencias/C006/index.html>
22. [http://web.uchile.cl/vignette/avancesveterinaria/CDA/avan\\_vet\\_simple/0,1423,S CID%253D10700%2526ISID%253D481%2526PRT%253D10668,00.html#:~:text=La%20desmina%20es%20un%20marcador,Osborn%20y%20Weber%2C%201983](http://web.uchile.cl/vignette/avancesveterinaria/CDA/avan_vet_simple/0,1423,S CID%253D10700%2526ISID%253D481%2526PRT%253D10668,00.html#:~:text=La%20desmina%20es%20un%20marcador,Osborn%20y%20Weber%2C%201983)
23. <http://www.cibic.com.ar/noticias/aplicaciones-de-la-determinacion-del-marcador-s100-en-melanoma-y-dano-cerebral/#:~:text=El%20marcador%20S100%20es%20una,como%20los%20tumores%20de%20melanocitos>
24. <http://www.raem.org.ar/numeros/2017-vol54/suplemento/cc33.pdf>
25. [https://www.mineducacion.gov.co/1759/articles-355749\\_recurso\\_normatividad.pdf](https://www.mineducacion.gov.co/1759/articles-355749_recurso_normatividad.pdf)
26. <http://derechodeautor.gov.co:8080/documents/10181/182597/23.pdf/a97b8750-8451-4529-ab87-bb82160dd226>
27. <https://biosiximport.com/categoria-producto/consumibles/anatomia-patologica/macrosopia/>
28. [http://www.revistapatologia.com/content/historia/1264110-Patologia\\_2007\\_Vol\\_45\\_Num\\_3\\_Pag\\_126-140.pdf](http://www.revistapatologia.com/content/historia/1264110-Patologia_2007_Vol_45_Num_3_Pag_126-140.pdf)
29. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602007000100003](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602007000100003)
30. [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1699-695X2016000100006](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-695X2016000100006)
31. Fernández Suárez A, Martínez Peinado A, Gaspar MJ, Filella X, Molina R, Ballesta AM. Marcadores tumorales serológicos. *Química clínica*. 2007; 26 (2): 77-85.
32. <https://www.cancerquest.org/es/para-los-pacientes/deteccion-y-diagnosis/inmunoquimica>
33. Vaquero Manuel S. Anatomía P S. Manual de Calidad de Manual de Calidad de Inmunoquímica en Anatomía Patológica, Osakidetza; 2007

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 02
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-03
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 02-05-2019

34. <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-senologia-patologia-mamaria--131-articulo-correlacion-entre-expresion-ki67-con-S0214158214000565>
35. <http://www.conganat.org/linfo.tortosa/6curso/ihq/BoT5.htm>
36. <https://docplayer.es/90378124-Inmunohistoquimica-avanzada.html>

- **ANEXOS**

### 28.1 LISTA DE CHEQUEO TOTAL

	MICHEL ARIAS	NICOL GARCÍA	PATRICIA ISAZA	FERNANDO POLO
Marcaje de frascos				
Tejidos en frascos				
Tejidos en procesadores				
Láminas procesadas				
Criterios de calidad por estudiantes				
Láminas patólogos internos				
Láminas patólogos externos				

	<b>FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD</b>	<b>VERSIÓN 02</b>
	<b>FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>CODIGO: F-PI-FEP-03</b>
	<b>GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>FECHA 02-05-2019</b>

MARCADO R	CD4 5	AE1/AE 3	TTF 1	CD2 0	CD 3	KI6 7	ACTIN A	DESMIN A	S10 0	PAX 8
NOMBRE DEL PATOLOGO 1										
FECHA										
NOMBRE DEL PATOLOGO 2										
FECHA										
NOMBRE DEL PATOLOGO 3										
FECHA										
NOMBRE DEL PATOLOGO 4										
FECHA										
FORMOL										

	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD						VERSIÓN 02			
	FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN						CODIGO: F-PI-FEP-03			
	GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN						FECHA 02-05-2019			

MARCADO R	CD4 5	AE1/AE 3	TTF 1	CD2 0	CD 3	KI6 7	ACTIN A	DESMIN A	S10 0	PAX 8
NOMBRE DEL PATOLOGO 1										
FECHA										
NOMBRE DEL PATOLOGO 2										
FECHA										
NOMBRE DEL PATOLOGO 3										
FECHA										
NOMBRE DEL PATOLOGO 4										
FECHA										
FINE FIX										

### 28.2 LISTA DE CHEQUEO PROCESO POR PROCESO

TEJIDOS	FORMOL	FINE-FIX	MARCA FRASCO	TEJIDO FRASCO	PROCESO FORMOL	PROCESO FINE-FIX	LÁMINA PROCESADA
1. Piel	1-001	2-001					
2. Hueso	1-002	2-002					
3. Gl.salival	1-003	2-003					
4. Lengua	1-004	2-004					
5. Laringe	1-005	2-005					

DIVISION DE INVESTIGACIONES



FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD

VERSIÓN 02

FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

CODIGO: F-PI-FEP-03

GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN

FECHA 02-05-2019

6.	Ganglio	1-006	2-006									
7.	Mama	1-007	2-007									
8.	Esófago	1-008	2-008									
9.	Estómago	1-009	2-009									
10.	Hígado	1-010	2-010									
11.	Intestino	1-011	2-011									
12.	Corazón	1-012	2-012									
13.	Pulmón	1-013	2-013									
14.	Riñón	1-014	2-014									
15.	Testiculo	1-015	2-015									
16.	Próstata	1-016	2-016									
17.	Utero	1-017	2-017									
18.	Trompa	1-018	2-018									
19.	Ovario	1-019	2-019									
20.	Placenta	1-020	2-020									
21.	T. blandos	1-021	2-021									
22.	Tiroides	1-022	2-022									
23.	Timo	1-023	2-023									
24.	Bazo	1-024	2-024									
25.	Paratiroides	1-025	2-025									

### 28.3 LISTA DE CHEQUEO DE ANTICUERPOS PRIMARIOS

TEJIDO	FORMOL	FINE-FIX	ACL	AE1/AE3	TTF 1	CD 20	CD 3	Ki 67	ACT INA	DESM INA	S 100	PAX 8
1.	1-001	2-001										
2.	1-002	2-002										
3.	1-003	2-003										
4.	1-004	2-004										
5.	1-005	2-005										
6.	1-006	2-006										
7.	1-007	2-007										
8.	1-008	2-008										
9.	1-009	2-009										
10.	1-010	2-010										
11.	1-011	2-011										
12.	1-012	2-012										
13.	1-013	2-013										
14.	1-014	2-014										
15.	1-015	2-015										
16.	1-016	2-016										
17.	1-017	2-017										
18.	1-018	2-018										
19.	1-019	2-019										
20.	1-020	2-020										
21.	1-021	2-021										
22.	1-022	2-022										
23.	1-023	2-023										
24.	1-024	2-024										
25.	1-025	2-025										

DIVISION DE INVESTIGACIONES

Página

96 de 97

	<b>FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD</b>	<b>VERSIÓN 02</b>
	<b>FORMULACIÓN Y EJECUCIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>CODIGO: F-PI-FEP-03</b>
	<b>GUIA PARA LA ELABORACION DE PROYECTOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>FECHA 02-05-2019</b>