



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

**CARRERA DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN  
EXPERIMENTAL ZARAGOZA  
LABORATORIO DE ONCOLOGÍA MOLECULAR

**“ANÁLISIS INMUNOABSORBENTE UNIDO A  
ENZIMA (ELISA) DE LA PROTEÍNA DE ESTRÉS  
FISIOLÓGICO MICA Y MICB EN LÍNEAS  
CELULARES THP-1, U-937 Y HL-60 DE LEUCEMIA  
MIELOIDE AGUDA”**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A

**LUIS ANTONIO SÁNCHEZ AGUILAR**

UNAM  
FES  
ZARAGOZA



DIRECTOR DE TESIS  
DR. JORGE FLAVIO MENDOZA RINCÓN

ASESOR DE TESIS  
DR. MARCO ANTONIO RODRÍGUEZ MEDINA

México D.F. a 26 de Enero de 2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **DEDICATORIAS**

### A mis Padres

Luis Sánchez Durán

María Lina Teresa Aguilar Quiroz

Gracias por esos bellos momentos que me hicieron pasar durante mi carrera y proceso de titulación, por enseñarme todos los obstáculos que hay que vencer en esta vida. Como una muestra de mi cariño y de agradecimiento por todo el amor, confianza y apoyo que me brindaron y por que hoy veo llegar a su fin una de las metas de mi vida, les agradezco la paciencia y orientación que han tenido conmigo.

### A mi Hermana

Bertha Haydee Sánchez Aguilar

En la vida hay momentos de cambio donde hay que tomar decisiones y emprender nuevos propósitos. Te agradezco todo el apoyo que me diste durante mi carrera y proceso de titulación. Gracias por confiar en mí.

### Maestros

Gracias por toda la confianza, apoyo incondicional y consejos que me dieron durante los cinco años de la carrera.

Gracias por dedicarme parte de su tiempo, por enseñarme lo valioso que es la vida y luchar por ella, por darme parte de sus conocimientos y experiencias, por enseñarme como luchar por lo que quiere uno y conseguirlo. Gracias por todo su cariño, amistad, ser un amigo(a) y por prepararme para luchar por un futuro mejor.

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de darme una formación académica y profesional a través de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

A mis funcionarios por todo su apoyo incondicional y consejos.

De manera muy especial al Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón y al Dr. Marco Antonio Rodríguez Medina, por todo su apoyo y consejos que me dieron durante mi proceso de titulación, así también por su confianza que tuvieron.

### A mis Sinodales

Mtra. Leonor Aguilar Santelises

Dra. Martha Legorreta Herrera

M. en C. Claudia Fabiola Martínez Rodríguez

Gracias por todo su apoyo, consejos y espíritu de enseñanza que me dieron durante mi carrera y proceso de titulación.

Gracias a todas las personas que estuvieron a mi lado para apoyarme y principalmente por confiar en mí. Por enseñarme muchas cosas que me sirvieron para seguir aprendiendo, pero principalmente por su colaboración durante mi formación profesional. Muchas gracias.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	2
III. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	3
A. Leucemia.....	3
1. Origen y problemas.....	3
2. Definición.....	3
3. Tipos de leucemia.....	3
a. Causas.....	4
b. Diagnóstico.....	4
c. Tratamiento.....	5
B. Leucemia Mieloide Aguda.....	5
1. Definición.....	5
2. Clasificación.....	6
3. Causas.....	6
4. Síntomas.....	7
5. Diagnóstico.....	8
a. Estudio clínico.....	8
b. Estudio bioquímico.....	8
1) ELISA.....	8
6. Tratamiento.....	10
a. Terapia de inducción.....	10
b. Terapia de consolidación.....	11
C. Líneas Celulares de Leucemia Mieloide Aguda (LMA).....	12
1. Tipos de líneas celulares.....	12
a. HL-60.....	12
b. Thp-1.....	12
c. U-937.....	13
2. Cultivo celular.....	15
D. Proteínas MICA y MICB.....	17
1. Que son.....	17

2. Fisiología.....	17
3. Expresión de MICA y MICB: Asociación con estrés fisiológico en células epiteliales.....	20
4. NKG2D.....	20
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
V. OBJETIVOS.....	24
1. Objetivo General.....	24
2. Objetivos Particulares.....	24
VI. HIPÓTESIS.....	25
VII. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	26
1. Material.....	26
2. Reactivos.....	26
3. Métodos.....	27
a. Líneas celulares.....	27
b. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).....	27
c. Método Estadístico.....	29
VIII. RESULTADOS.....	30
IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	34
X. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	44
XI. CONCLUSIONES.....	46
XII. REFERENCIAS.....	47
XIII. APÉNDICE.....	50

## TABLA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido Desoxirribonucleico	MICC	MHC Class I Chain Related Gene C
ALL	Acute Lymphocytic Leukemia	MICD	MHC Class I Chain Related Gene D
AML	Acute Melogenous Leukemia	MICE	MHC Class I Chain Related Gene E
anti-MICA	Anticuerpo MICA	MICF	MHC Class I Chain Related Gene F
anti-MICB	Anticuerpo MICB	MICG	MHC Class I Chain Related Gene G
ARNm	Ácido Ribonucleico Mensajero	MRI	Imágenes de Resonancia Magnética
CBC	Hemograma Completo	MHC	Major Histocompatibility Complex
CID	Coagulación Intravascular Diseminada	NK	Natural Killer
CML	Chronic Melogenous Leukemia	OMS	Organización Mundial de la Salud
CT	Tomografía Computarizada	PPAR9	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-9
CSF	Cerebral Spinal Fluid	rhMICA	Proteína Recombinante Humana MICA
ELISA	Enzyme Linked Inmunosorbent Assay	rhMICB	Proteína Recombinante Humana MICB
GH	Hormona de Crecimiento	SMD	Síndrome Mielodisplásico
HLA	Human Leukocyte Antigens	SMP	Síndrome Mieloproliferativo
HLA-A	Human Leukocyte Antigens-A		
HLA-B	Human Leukocyte Antigens-B		
HLA-C	Human Leukocyte Antigens-C		
HLA-E	Human Leukocyte Antigens-E		
HLA-F	Human Leukocyte Antigens-F		
HLA-G	Human Leukocyte Antigens-G		
HLA-DR	Human Leukocyte Antigens-DR		
HLA-B27	Human Leukocyte Antigens-B27		
KDa	Kilodaltons		
Kb	Kilobase		
LMA	Leucemia Mieloide Aguda		
LMMA	Leucemia Mielomonocítica Aguda		
LMOA	Leucemia Monocítica Aguda		
MIC	MHC Class I Chain Related Genes		
MICA	MHC Class I Chain Related Gene A		
MICB	MHC Class I Chain Related Gene B		

## I. RESUMEN

La similitud de los genes de la familia MIC con los del MHC-I encontrada en varios mamíferos, refuerzan la idea de que los genes MIC tienen una función importante en la respuesta inmune. Estas proteínas funcionan como marcadores de estrés fisiológico, por lo que en el presente trabajo se pretendió encontrar una posible relación en líneas celulares de leucemia mieloide aguda y la presencia de las proteínas MIC. Para este fin se utilizaron líneas provenientes de cáncer de leucemia mieloide aguda humana (Thp-1, U-937 y HL-60).

Los resultados obtenidos muestran que las líneas de leucemia Thp-1, U-937 y HL-60, secretan la formas soluble de MICA y MICB ya que las diferentes células expresan las proteínas MIC, esto se realizó a través de la técnica de ELISA la cual nos permitió observar la secreción de las proteínas MIC, ya que conforme aumentan los días se observa que hay una presencia de estas en cada una de las líneas celulares hasta alcanzar un máximo tal es el caso de la Thp-1 que llega hasta el día 11 y la U-937 y HL-60 hasta el día 10 y posteriormente empieza a disminuir esta. Este hallazgo podría explicar el hecho de que se pueda desarrollar este tipo de neoplasia aún estando presentes las proteínas MIC, cuya misión principal es la de alertar a las células encargadas de eliminar a las células infectadas por virus o tumorales malignos, ya que la expresión de las proteínas MICA y MICB están asociadas principalmente a estrés fisiológico por infección bacteriana, viral y por transformación maligna.

Recomendamos utilizar la técnica de ELISA porque sigue siendo muy importante en la inmunología para la detección de anticuerpos o antígenos, así también brinda una confiabilidad y reproducibilidad aceptable, sin olvidar su bajo costo.



## II. INTRODUCCIÓN

El propósito del estudio realizado es conocer el funcionamiento y comportamiento de algunas proteínas como MICA y MICB (MHC clase I Chain related genes). Se analizan proteínas de estrés fisiológico que son importantes en la participación del sistema inmunológico, donde se sabe que estas proteínas son liberadas por las células que se han neotransformado por algún agente infeccioso viral (HPV18 y HPV16) al medio externo y que participan en el desarrollo oncológico, por lo tanto tienen una asociación con ciertas enfermedades, es el caso del cáncer de leucemia<sup>28</sup>.

En algunos estudios ya mencionados en la literatura, la expresión de las proteínas MICA y MICB se demostró claramente en células de origen epitelial o fibroblástico, aunque reportes posteriores indicaron que las proteínas MIC son marcadores de estrés fisiológico cuya expresión se aumenta en la superficie de las células transformadas de diversos tipos en particular en aquellas infectadas por virus y bacterias<sup>47, 48</sup>.

El objetivo de este proyecto, es demostrar la presencia de proteínas como marcadores del progreso y establecimiento de células de Leucemia Mieloide Aguda (LMA). Analizando la forma soluble de las proteínas de estrés fisiológico MICA y MICB (sMICA y sMICB) a través de la técnica de ELISA como marcadores biológicos en la leucemia mieloide aguda (LMA); su utilidad en el diagnóstico clínico. Por medio de anticuerpos monoclonales en células provenientes de LMA

Dado que la expresión de las formas solubles de MICA y MICB se ha asociado al estudio de las muestras de pacientes con leucemia mieloide aguda y esto marca el desarrollo clínico del padecimiento. Por lo tanto, proponemos que las formas solubles de MICA y MICB son útiles en el diagnóstico clínico en LMA.

### III. FUNDAMENTO TEÓRICO

#### A. Leucemia

##### 1. ORIGEN Y PROBLEMAS

La médula ósea es el centro esponjoso y suave que tienen los huesos largos, y que producen las tres células principales de la sangre: Los glóbulos blancos, que luchan contra la infección, los glóbulos rojos, que transportan el oxígeno, y las plaquetas que ayudan con la coagulación de la sangre y detienen los sangrados. Cuando un niño tiene leucemia, la médula ósea, por razones que aún se desconocen, comienza a fabricar glóbulos blancos que no maduran correctamente, pero que continúan reproduciéndose. Las células normales, sanas únicamente se reproducen cuando hay suficiente espacio para ellas. El cuerpo puede regular la producción de células al enviar señales para parar dicha producción. Cuando se sufre de leucemia, dichas células no responden a las señales y no se puede detener la reproducción, aunque ya no haya espacio para ellas<sup>2</sup>.

La leucemia es la forma más común de cáncer infantil. En los Estados Unidos, afecta a aproximadamente tres mil niños anualmente, cifra que representa alrededor del 30 por ciento de los cánceres infantiles<sup>1</sup>. Puede manifestarse a cualquier edad, aunque es más frecuente en los niños entre 2 y 6 años de edad. Esta enfermedad se presenta con una frecuencia ligeramente mayor en los varones que en las mujeres y es más común en niños caucásicos que en niños africano-americanos o de otras razas<sup>1</sup>.

##### 2. DEFINICIÓN

La leucemia es el cáncer de la sangre que se desarrolla en la médula del hueso<sup>1</sup>.

##### 3. TIPOS DE LEUCEMIA

Existen tres tipos principales de leucemia<sup>3</sup>:

- Leucemia linfocítica aguda (acute lymphocytic leukemia, ALL)
- Leucemia mielógena aguda (acute myelogenous leukemia, AML)
- Leucemia mielógena crónica (chronic myelogenous leukemia, su sigla en inglés es CML)

La **leucemia linfocítica aguda**, también llamada linfoblástica o linfoide, representa el 75% de los casos de leucemias infantiles. En este tipo de trastorno, la afección se encuentra en los linfocitos, las células que normalmente combaten las infecciones<sup>1</sup>.

La **leucemia mielógena aguda**, también llamada granulocítica, mielocítica, mielóide o mieloblástica, representa alrededor del 19% de los casos de leucemias infantiles<sup>1</sup>.

La **leucemia mielógena crónica**, también llamada leucemia mieloblástica, es un cáncer de la sangre, poco frecuente en los niños, en el cual la médula ósea produce un exceso de granulocitos<sup>1</sup>.

## **a. Causas**

Leucemia linfocítica aguda. En este tipo de trastorno, la afección se encuentra en los linfocitos, las células que normalmente combaten las infecciones. En los pacientes con ALL, la médula ósea produce un exceso de linfocitos que no maduran correctamente y que desplaza a las demás células sanguíneas<sup>8</sup>.

La AML puede producirse en un período de días o semanas. La mayoría de los pacientes con esta afección presenta anomalías cromosómicas (cromosomas adicionales y cambios estructurales en el material cromosómico)<sup>5</sup>.

La leucemia mielógena aguda es un cáncer de la sangre en el cual la médula ósea produce un exceso de granulocito, esta puede producirse en un período de días o semanas. Los niños con determinados síndromes genéticos, entre ellos, el síndrome de Fanconi, el síndrome de Bloom, el síndrome de Kostmann y el síndrome de Down, tienen mayor riesgo de desarrollar AML que los demás niños<sup>2</sup>.

En los pacientes con leucemia mielógena crónica puede presentarse en un período de meses o años. En los pacientes que tienen CML se produce un reordenamiento cromosómico específico. Parte del cromosoma 9 se fragmenta y se une al cromosoma 22; por lo tanto, se produce un intercambio de material genético entre estos dos cromosomas. Este reordenamiento cambia la posición y las funciones de determinados genes y tiene como consecuencia un crecimiento celular descontrolado. También pueden presentarse otras anomalías cromosómicas<sup>1</sup>.

## **b. Diagnóstico**

El primer indicio en un diagnóstico de LMA es encontrar anomalías en un análisis de sangre o hemograma. Además del típico exceso de glóbulos blancos (leucocitosis), la LMA suele cursar con disminuciones esporádicas de plaquetas, eritrocitos e incluso glóbulos blancos (leucopenia). Estos datos unidos a la información obtenida tras realizar un frotis de sangre periférica, pueden servir para hacer un primer diagnóstico de LMA, pero para obtener un diagnóstico definitivo suele ser necesario llevar a cabo un aspiración de médula ósea y una biopsia<sup>3</sup>.

La examinación de médula ósea tiene como objetivo identificar el tipo de glóbulos rojos anómalos. Sin embargo, si hay muchas células leucémicas circulantes en sangre periférica, podría llegar a evitarse la biopsia de médula ósea. La sangre, o la médula en su caso, es examinada al microscopio óptico así como por citometría de flujo con el fin de poder diagnosticar qué tipo de leucemia sufre el paciente (LMA u otras) y clasificar el subtipo. Además, se llevan a cabo de forma rutinaria exámenes citogenéticos e hibridación *in situ* fluorescente (FISH) con el fin de determinar las posibles translocaciones cromosómicas de las células leucémicas<sup>2</sup>.

El diagnóstico y la clasificación de la LMA pueden llegar a ser realmente complicados, por lo que siempre deberían ser realizados por un hematólogo o hematopatólogo calificado. En los casos de diagnósticos sencillos, la presencia de ciertas características morfológicas

(como los bastones de Auer) o ciertos resultados específicos de la citometría de flujo nos pueden permitir distinguir fácilmente la LMA de otros tipos de leucemias. Sin embargo, en ausencia de estas características, el diagnóstico puede ser bastante más difícil de llevar a cabo<sup>3</sup>.

Según los criterios ampliamente aceptados de la OMS, el diagnóstico de la LMA queda establecido cuando más del 20% de las células observadas en sangre o en médula ósea son mieloblastos leucémicos. La LMA debe ser diferenciada sin ningún género de duda respecto de ciertas patologías "preleucémicas" como los síndromes mielodisplásico y mieloproliferativo, ya que en estos casos el tratamiento a seguir por el paciente es diferente<sup>3</sup>.

### **c. Tratamiento**

El tratamiento específico para la leucemia se determina basándose en lo siguiente<sup>3</sup>:

- La edad, su estado general de salud y sus antecedentes médicos.
- La gravedad de la enfermedad.
- La tolerancia a ciertos medicamentos, procedimientos o terapias.
- Sus expectativas para la evolución de la enfermedad.
- Su opinión o preferencia.

Generalmente, el tratamiento comienza cuando se presentan síntomas como por ejemplo, la anemia, el sangrado o las infecciones. Además, el tratamiento para la leucemia puede incluir (solo o en combinación)<sup>2</sup>:

- Quimioterapia.
- Medicamentos o quimioterapia por vía intratecal (medicamentos introducidos a la médula espinal con una aguja, en el área denominada espacio subaracnoide).
- Radioterapia.
- Trasplante de médula ósea.
- Terapia biológica.
- Medicamentos (para prevenir o tratar el daño a otros sistemas del cuerpo causado por el tratamiento de la leucemia).
- Medicamentos (para las náuseas y los efectos secundarios del tratamiento).
- Transfusiones sanguíneas (glóbulos rojos, plaquetas).
- Antibióticos (para prevenir y tratar infecciones).
- Seguimiento médico continuo (para determinar la respuesta al tratamiento, controlar sus efectos secundarios y detectar la reaparición de la enfermedad).

## **B. Leucemia Mieloide Aguda**

### **1. DEFINICIÓN**

La **leucemia mieloide aguda**, también conocida como leucemia mielocítica aguda o como LMA, es un tipo de cáncer producido en las células de la línea mieloide de los leucocitos,

que se caracteriza por la rápida proliferación de células anormales que se acumulan en la médula ósea e interfieren en la producción de glóbulos rojos normales<sup>2</sup>.

## 2. CLASIFICACIÓN

La **clasificación Franco-Estadounidense-Británica** divide la LMA en ocho subtipos basándose en el tipo de células leucémicas que aparecen y en su grado de madurez<sup>32</sup>:

- **M0** Leucemia mieloblástica aguda sin diferenciación localizada.
- **M1** Leucemia mieloblástica aguda sin maduración.
- **M2** Leucemia mieloblástica aguda con maduración.
- **M3** Leucemia promielocítica aguda (con translocación t(15;17)).
- **M4** Leucemia mielomonocítica aguda (LMMA).
- **M4eo** Leucemia mielomonocítica aguda con eosinofilia en médula ósea.
- **M5** Leucemia monocítica aguda (LMoA).
- **M5a** LMoA sin diferenciación (monoblástica).
- **M5b** LMoA con diferenciación (monocítica).
- **M6** Eritroleucemia aguda; son precursoras de globos rojos.
- **M7** Leucemia megacariocítica aguda.

### Clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS)

- LMA con anomalías genéticas características. Incluyen aquellas LMA con translocaciones entre los cromosomas 8 y 21 [t (8; 21)], inversiones en el cromosoma 16 [inv (16)] o translocaciones entre los cromosomas 15 y 17 [t(15;17)]. Los pacientes con este tipo de LMA generalmente presentan una elevada tasa de remisión y un mejor pronóstico comparado con otros tipos de LMA<sup>32</sup>.
- LMA con displasia multilineaje. Esta categoría incluye a los pacientes que han sufrido previamente un síndrome mielodisplásico (SMD) o mieloproliferativo (SMP) y este ha derivado en una LMA. Este tipo de LMA tiene una mayor incidencia en pacientes de edad avanzada y suele presentar un peor pronóstico<sup>32</sup>.
- LMA y SMD asociados al tratamiento. Esta categoría incluye a los pacientes que se han sometido a quimioterapia o radiaciones, y posteriormente desarrollaron LMA o SMD. Estas leucemias se pueden caracterizar por anomalías cromosómicas específicas y suelen presentar un mal pronóstico<sup>32</sup>.
- LMA no categorizada. Incluye subtipos de LMA que no se pueden incluir en ninguna de las categorías anteriores<sup>32</sup>.

## 3. CAUSAS

La leucemia mieloide aguda, es un tipo de cáncer producido en las células de la línea mieloide de los leucocitos, caracterizado por la rápida proliferación de células anormales que se acumulan en la médula ósea e interfieren en la producción de glóbulos rojos normales. La LMA es el tipo de leucemia aguda más común en adultos y su incidencia aumenta con la edad<sup>2</sup>.

La ausencia de producción de leucocitos normales aumenta la susceptibilidad del paciente a sufrir infecciones, ya que las células leucémicas, a pesar de provenir de precursores leucocíticos, no poseen las características inmunológicas que les permitirían enfrentarse a una infección. El descenso de glóbulos rojos causa anemia y el descenso de plaquetas puede dar lugar a problemas de coagulación<sup>2</sup>.

#### **4. SÍNTOMAS**

Los síntomas de la LMA se deben a la invasión de la médula ósea normal, que se va reemplazando poco a poco por células leucémicas, lo que conlleva a un descenso de glóbulos rojos, plaquetas y leucocitos normales. Los principales síntomas incluyen fatiga, dificultad para respirar, aparición de hematomas, dificultades en la coagulación y un aumento del riesgo de infección. Aunque ya se han determinado ciertos factores de riesgo, aún no está clara la causa específica de la LMA. Al igual que en las demás leucemias agudas, la LMA progresa rápidamente y puede ser fatal en semanas o meses si no se trata adecuadamente<sup>2</sup>.

La LMA es una enfermedad potencialmente curable. Sin embargo, sólo una minoría de pacientes se trata con la terapia actual. El tratamiento inicial consiste en la administración de quimioterapia, cuyo objetivo es inducir una remisión de las células cancerígenas. Algunos pacientes pueden llegar a recibir un trasplante de médula ósea, si se logra encontrar alguna persona compatible<sup>2</sup>.

Actualmente, la investigación relacionada con la LMA se está centrando en elucidar la causa de la LMA, en la identificación de mejores marcadores de diagnóstico, en el desarrollo de nuevos métodos para detectar la enfermedad residual tras el tratamiento y en el desarrollo de nuevas drogas y de terapias dirigidas a dianas específicas<sup>2</sup>.

La LMA puede cursar con otros síntomas adicionales. La esplenomegalia suele producirse, aunque de forma suave y asintomática. La hinchazón de los ganglios linfáticos no es común (al contrario de lo que ocurre en la leucemia linfocítica aguda), pero puede tener lugar. La piel puede ser afectada por el denominado cutis leucémico, una infiltración de células leucémicas en la dermis. También, aunque más excepcionalmente, puede presentarse el síndrome de Sweet, una inflamación paraneoplásica de la piel producida por hormonas o citoquinas secretadas por las células tumorales o por las células del sistema inmune en respuesta al tumor<sup>2</sup>.

Algunos pacientes con LMA pueden experimentar una hinchazón de las encías debido a la infiltración de células leucémicas en el tejido blando de la encía. Menos común es que el primer síntoma de la leucemia sea un tumor fuera de la médula ósea, llamado cloroma. También puede darse el caso de que una persona no exteriorice ningún síntoma y la leucemia sea descubierta accidentalmente durante un análisis de sangre rutinario<sup>2</sup>.

## 5. DIAGNÓSTICO

### a. Estudio clínico

El primer indicio en un diagnóstico de LMA es encontrar anomalías en un análisis de sangre o hemograma. Además del típico exceso de glóbulos blancos (leucocitosis), la LMA suele cursar con disminuciones esporádicas de plaquetas, eritrocitos e incluso glóbulos blancos (leucopenia). Estos datos unidos a la información obtenida tras realizar un frotis de sangre periférica, pueden servir para hacer un primer diagnóstico de LMA, pero para obtener un diagnóstico definitivo suele ser necesario llevar a cabo un aspiración de médula ósea y una biopsia<sup>35</sup>.

El examen de médula ósea tiene como objetivo identificar el tipo de glóbulos rojos anómalos. Sin embargo, si hay muchas células leucémicas circulantes en sangre periférica, podría llegar a evitarse la biopsia de médula ósea. La sangre, o la médula en su caso, se analizan al microscopio óptico así como por citometría de flujo con el fin de poder diagnosticar qué tipo de leucemia sufre el paciente (LMA u otras) y clasificar el subtipo. Además, se llevan a cabo de forma rutinaria exámenes citogenéticos e hibridación *in situ* fluorescente (FISH) con el fin de determinar las posibles translocaciones cromosómicas de las células leucémicas<sup>2,35</sup>.

El diagnóstico y la clasificación de la LMA pueden ser realmente complicados, por lo que siempre se deberían realizar por un hematólogo o hematopatólogo calificado. En los casos de diagnósticos sencillos, la presencia de ciertas características morfológicas (como los bastones de Auer) o ciertos resultados específicos de la citometría de flujo nos pueden permitir distinguir fácilmente la LMA de otros tipos de leucemias. Sin embargo, en ausencia de estas características, el diagnóstico puede ser bastante más difícil de llevar a cabo<sup>35</sup>.

Según los criterios ampliamente aceptados de la OMS, el diagnóstico de la LMA queda establecido cuando más del 20% de las células observadas en sangre o en médula ósea son mieloblastos leucémicos. La LMA se puede diferenciar sin ningún género de duda respecto de ciertas patologías "preleucémicas" como los síndromes mielodisplásico y mieloproliferativo, ya que en estos casos el tratamiento a seguir por el paciente es diferente<sup>35</sup>.

La leucemia promielocítica aguda (LPA) tiene la tasa de curación más alta y requiere una forma única de tratamiento, por lo que es muy importante establecer rápidamente el diagnóstico para determinar si es este subtipo de leucemia. La hibridación *in situ* fluorescente es la técnica más adecuada para este propósito, ya que nos permite identificar fácilmente si se ha producido la translocación cromosómica [t (15; 17)] que caracteriza a la LPA<sup>2</sup>.

### b. Estudio bioquímico

1) **ELISA**. La técnica (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o

indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un cromógeno (OPD, TMB, ABTS), se pueden medir espectrofotométricamente. Este principio tiene muchas de las propiedades de un inmunoensayo ideal: es versátil, robusto, simple en su realización, emplea reactivos económicos y consigue, mediante el uso de la fase sólida, de una separación fácil entre la fracción retenida y la fracción libre<sup>33,34</sup>.

Este método ha tenido una enorme aplicación en todos aquellos campos en los que se precisaba la cuantificación de productos mediante anticuerpos: diagnóstico clínico, detección viral, clasificación de anticuerpos en isotípos, búsqueda de anticuerpos monoclonales, etc<sup>33,34</sup>.

Los lectores para ELISA son espectrofotómetros capaces de realizar lecturas seriadas de cada uno de los pocillos de la placa de ELISA. A diferencia de un espectrofotómetro convencional, con capacidad de leer todas las longitudes de onda del ultravioleta y el visible de manera continua, los lectores de ELISA disponen de sistemas de filtros que sólo permiten la lectura de una o pocas longitudes de onda. Son la que se corresponden con las necesarias para determinar la densidad óptica de los que se utilizan con mayor frecuencia<sup>33,34</sup>.

Las cuatro fases de un ensayo ELISA son las siguientes:

- Conjugación del anticuerpo o del antígeno con un enzima (peroxidasa, fosfatasa alcalina). El anticuerpo conjugado a la enzima se emplea en los ensayos directos e indirectos, sandwich, etc. El antígeno marcado se emplea en ensayos de competencia de antígeno<sup>33,34</sup>.
- Unión del antígeno (o del anticuerpo) a los pocillos. La unión de anticuerpos o antígenos se realiza con facilidad a la superficie de plásticos tratados que tienen gran afinidad por proteínas<sup>33,34</sup>.
- Formación de una o más capas de inmunocomplejos. En el caso del antígeno unido a la placa se puede detectar mediante un anticuerpo anti-antígeno marcado (ELISA directo) o empleando un anticuerpo primario anti-antígeno y un secundario anti primario marcado (ELISA indirecto). Este segundo método permite la amplificación de la señal al poderse unir uno o más anticuerpos secundarios a cada anticuerpo primario. En el caso del anticuerpo unido a la placa se incubaba con una mezcla de antígeno y antígeno marcado. Se ensayan diferentes relaciones de antígeno frío frente a una cantidad fija de antígeno marcado. Es el ensayo de competición del antígeno<sup>33,34</sup>.
- Revelado de la reacción enzimática. Después de varios lavados para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos se añade el sustrato enzimático en solución. Se deja reaccionar y se lee la densidad óptica (D.O.) mediante espectrofotometría. En el esquema se muestra la reacción asociada a un ELISA directo<sup>33,34</sup>.

Se han desarrollado múltiples variantes de ensayos ELISA que permiten desde la cuantificación de un antígeno en solución, la detección de un anticuerpo en una solución



(por ej. en el clonaje de anticuerpos monoclonales), o la determinación de la subclase (idiotipo) de un anticuerpo. A continuación se describen los más comunes<sup>33,34</sup>.

ELISA directo (ensayo ELISA simple de dos capas). Las placas ELISA se preparan recubriendo los pocillos con las soluciones en las que se sospecha se encuentra el antígeno. Se incuban con anticuerpos marcados. Indican la presencia de antígeno en la solución analizada. Es necesario incluir controles negativos que serán muestras del mismo tipo de las analizadas (sangre y orina) pero en las que se tenga la certeza de la ausencia del antígeno buscado. Asimismo se incluyen controles positivos (soluciones donde se encuentra el antígeno buscado, o bien se le ha añadido)<sup>33,34</sup>.

ELISA indirecto. Las placas ELISA se preparan de una forma idéntica a la anterior. Los controles positivos y negativos son los mismos. El sistema de detección emplea dos anticuerpos: uno primario contra el antígeno, y uno secundario marcado contra el primario. La detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal debida a la unión de dos o más anticuerpos secundarios por cada primario. Es el ensayo más popular, como lo es la inmunofluorescencia indirecta, pues un mismo secundario marcado y un mismo sistema enzimático permiten cuantificar una gran cantidad de antígenos<sup>33,34</sup>.

ELISA 'sandwich'. (ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos). Se trata de un ensayo muy empleado en el que se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno. Después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno, que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de un segundo lavado que elimina el material no retenido se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado. Así pues cada molécula de antígeno estará unido a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo<sup>33,34</sup>.

## **6. TRATAMIENTO**

El tratamiento de la LMA se basa principalmente en la quimioterapia y está dividido en dos fases, terapia de inducción y terapia de post-remisión (o consolidación). El objetivo de la terapia de inducción es llevar a cabo una reducción del número de células leucémicas hasta niveles indetectables. El objetivo de la terapia de consolidación es la completa eliminación de cualquier resto de la enfermedad y lograr la curación completa del paciente<sup>3</sup>.

### **a. Terapia de inducción**

Desde 2006, todos los subtipos FAB de LMA, salvo el M3, reciben normalmente el mismo tratamiento quimioterapéutico con citarabina (Ara-C) y antraciclina (daunorubicina o idarubicina). Otras alternativas incluyen únicamente altas dosis de Ara-C. Sin embargo, estas terapias producen también efectos secundarios tóxicos como la mielosupresión y el incremento del riesgo de infección, por lo que no se recomienda su uso en personas de edad avanzada. Esta primera fase de inducción suele requerir un mes de hospitalización desde el

comienzo del tratamiento quimioterapéutico hasta la recuperación de sus efectos secundarios<sup>2</sup>.

La quimioterapia de inducción presenta un esquema de administración denominado "7 + 3", en el que la citarabina se administra de forma continuada durante los siete primeros días y la antraciclina durante los tres siguientes. Alrededor del 70% de los pacientes logran una remisión con este protocolo de administración<sup>35</sup>.

En cuanto al subtipo M3 (FAB) de LMA, también conocido como leucemia promielocítica aguda, es casi universalmente tratado con la droga ATRA (all-trans-retinoic acid) de forma adicional a la quimioterapia de inducción. Estos casos requieren de mucha atención para prevenir la coagulación intravascular diseminada (CID), una complicación asociada a este tratamiento, que puede darse si los promielocitos liberan su contenido al torrente sanguíneo. Sin embargo, la LPA suele curarse en la mayoría de los casos si se sigue un buen protocolo de tratamiento<sup>4</sup>.

El objetivo de la fase de inducción es alcanzar una remisión completa, pero esto no quiere decir que la enfermedad se cure, sino que los métodos de diagnóstico disponibles no sean capaces de detectar indicios de LMA (por ejemplo, <5% de células leucémicas en la médula ósea). La remisión completa se suele conseguir en el 50-75% de los pacientes adultos diagnosticados, pero estos valores pueden modificarse por algunos de los factores relacionados con el pronóstico descritos anteriormente<sup>1,35</sup>.

La durabilidad de la remisión depende en gran medida del pronóstico de la leucemia original. Generalmente, todas las remisiones fallan si no van seguidas de una quimioterapia de consolidación (post-remisión). Esto hace que la consolidación sea una fase tan importante como la inducción para lograr la curación de la leucemia<sup>5</sup>.

En ciertas ocasiones, el proceso de inducción debe administrarse más de una vez. En estos casos, lograr una remisión tras una segunda inducción no altera las posibilidades de supervivencia del paciente, pero el fracaso de la remisión tras la segunda inducción reduce considerablemente posteriores remisiones de la enfermedad<sup>5</sup>.

## **b. Terapia de consolidación**

Tras conseguir una remisión completa de la leucemia, podría parecer que la enfermedad ha desaparecido, pero realmente aún quedan células leucémicas no detectables por las técnicas de diagnóstico actuales. Si en este punto no se aplica una terapia de consolidación (o post-remisión) prácticamente el 100% de los pacientes sufrirán una recaída. Por ello, es imprescindible administrar esta segunda terapia para eliminar cualquier residuo de la enfermedad y prevenir una recaída.

El tipo de terapia de consolidación utilizado en cada caso suele ser específico e individualizado, basado en cada paciente en particular, según el pronóstico que presente, su estado de salud, su edad, etc. Para aquellas leucemias que presentan un buen pronóstico (por ejemplo, inv(16) y t(15;17)) los pacientes se someten a una quimioterapia intensiva

adicional de 3-5 ciclos, conocida como quimioterapia de consolidación. Sin embargo, para pacientes con un elevado riesgo de recaída (como aquellos con un mal pronóstico citogenética, con un síndrome mielodisplásico o con LMA asociada al tratamiento) se suele recomendar el trasplante de médula ósea, si el paciente es capaz de tolerar un trasplante y existe un donante compatible. En cuanto a la mejor terapia de consolidación aplicable a la LMA de riesgo intermedio (basando dicho riesgo en un pronóstico citogenética) parece ser que no está tan claro y entran más factores en juego como la edad, el estado previo de salud del paciente y la posibilidad de recibir un trasplante de médula ósea<sup>35</sup>.

## **C. Líneas Celulares de Leucemia Mieloide Aguda (LMA)**

### **1. TIPOS DE LÍNEAS CELULARES**

#### **a. HL-60**

El crecimiento es un proceso complejo que refleja principalmente el incremento en el número de células de un organismo, y que depende del balance entre proliferación y muerte celular. Uno de los principales factores implicado en el control del crecimiento es la hormona de crecimiento (GH), producida principalmente por las células somatotropas de la adenohipófisis, aunque se ha descrito también la existencia de síntesis de GH fuera de la hipófisis<sup>37</sup>.

La expresión de GH se encuentra incrementada en células proliferantes en comparación a aquellas que han cesado su proliferación, lo que sugiere que la hormona participa en el control del crecimiento. De acuerdo con esta hipótesis, el bloqueo de la GH producida localmente con anticuerpos anti-GH redujo el crecimiento de las células HL-60. Estudios de la fragmentación de ADN demostraron que este efecto es secundario a un incremento en la apoptosis celular, lo que indica que la GH actúa como un factor de supervivencia autocrino/paracrino. Las vías intracelulares que dirigen este mecanismo se han investigado tanto en células HL-60 como en las clonas de las células CHO transfectados con el receptor de GH o con una forma truncada del mismo (D454GHR) caracterizada ésta por una activación sostenida de Jak-2, la tirosina quinasa asociada al receptor. En todos los casos la activación de GHR produjo un incremento en la fosforilación de Akt, una serina-treonina quinasa que juega un importante papel en las vías de supervivencia celular<sup>38</sup>.

#### **b. Thp-1**

La línea celular Thp-1 procede de un paciente con leucemia monocítica aguda. Estas células expresan marcadores característicos de los monocitos y poseen receptores Fc y C3b, sin embargo, no expresan inmunoglobulinas de superficie o citoplasmáticas. Están caracterizadas por su capacidad fagocítica y por la producción de lisozimas y esterasa, además de por su capacidad para restaurar la respuesta de los linfocitos T a la concavalina. Al tratar las Thp-1 con 12-miristato, 13-acetato de forbol (PMA) se observa adherencia a las superficies de cristal, a la vez que exhiben características morfológicas similares a los macrófagos. Además, poseen la capacidad de acumular lípidos, procedentes de las LDL, en su interior, y de expresar en su superficie el receptor para las LDL acetiladas, la

apolipoproteína E y la lipoproteína lipasa, así como el receptor para las VLDL, todos ellos considerados marcadores diferenciadores de los macrófagos<sup>39</sup>.

Por estos motivos, estas células activadas con PMA han sido ampliamente utilizadas para el estudio *in vitro* de la formación de células espumosas y de la aterosclerosis. Sin embargo, existen diferencias fundamentales entre las células monocíticas y las Thp-1. En primer lugar, los monocitos humanos sufren apoptosis cuando no se estimulan por determinadas citoquinas, mientras que las Thp-1 crecen indefinidamente. En segundo lugar, existe una heterogeneidad celular en cuanto a la expresión de algunos receptores. Incluso, se ha observado que pueden perder la diferenciación cuando se cultivan por un tiempo excesivo, hecho que no les ocurre a los macrófagos. Por otro lado, se ha observado que tras su activación, las Thp-1 segregan factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF)- $\beta$ 1, que inhibe la actividad de los receptores scavenger para las LDL acetiladas. Además, en las células activadas tampoco se observa la expresión del receptor hepático característico de los macrófagos. Concretamente, se ha caracterizado el perfil de expresión genética de estas células, comparándolo con el de los monocitos y macrófagos y se ha demostrado que los monocitos son bastante diferentes a las células Thp-1 no estimuladas<sup>39</sup>.

Sin embargo, al comparar con los macrófagos, las Thp-1 activadas con PMA comparten la expresión de algunos, aunque no todos los genes característicos. Todos estos datos sugieren que, aunque el uso de esta línea celular es adecuado para el estudio *in vitro* de los mecanismos moleculares de las enfermedades cardiovasculares, requieren una rigurosa interpretación de los resultados. Los cultivos celulares con Thp-1 se han utilizado ampliamente para el estudio de múltiples mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de la aterosclerosis. Entre ellos, se han estudiado los receptores de membrana para distintas partículas como las HDL45, procesos de activación e inhibición de proliferación celular, la expresión de metaloproteasas y de algunas moléculas que pueden modular su expresión y/o actividad, el metabolismo de moléculas de adhesión y citoquinas, así como los mecanismos nucleares activados a través de las LDL oxidadas durante el desarrollo de la aterosclerosis<sup>40</sup>.

Por otro lado, existen varios estudios en los que se cultivan conjuntamente varios tipos de células características de las lesiones ateroscleróticas, con el fin de estudiar los mecanismos moleculares de sus interacciones durante la formación de la placa de ateroma<sup>39</sup>.

### **c. Línea Celular U-937**

Tiene las siguientes características:

- Capacidad para producir lisozimas y elevada actividad esterasa.
- Expresan receptores para las LDL en cantidad relativamente elevada, y para las LDL acetiladas en menor cantidad.
- Poseen varios antígenos de superficie comunes con los monocitos sanguíneos, como por ejemplo el antígeno OKM1, 4F2 y T4.
- La estimulación de las U-937 con metabolitos segregados por linfocitos T tratados con concavalina A, provoca: Incremento de OKM1 y de la actividad del receptor Fc

y disminuye la expresión del antígeno T4, hecho característico de la maduración fenotípica de las células<sup>41</sup>.

La línea celular U-937 procede de un linfoma histiocítico difuso de un humano caucásico; las células de tipo histiocítico exhiben características semejantes a los monocitos. Las U-937 se caracterizan por su capacidad para producir lisozimas y por su gran actividad esterasa. Estas células expresan receptores para las LDL en cantidad relativamente elevada, y para las LDL acetiladas en menor cantidad. Además, poseen varios antígenos de superficie comunes con los monolitos sanguíneos, como por ejemplo el antígeno OKM1, 4F2 y T4. La estimulación de las U-937 con metabolitos segregados por linfocitos T tratados con concavalina A, provoca un incremento de OKM1 y de la actividad del receptor Fc, a la vez que disminuye la expresión del antígeno T4, hecho característico de la maduración fenotípica de las células monocíticas. La diferenciación de estas células provoca cambios morfológicos y funcionales bastante marcados, incrementando la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos frente a las células tumorales. Al igual que los macrófagos, una vez diferenciada, esta línea celular tiene capacidad para reconocer y captar LDL nativas o acetiladas<sup>42</sup>.

La diferenciación de U-937 con PMA induce la supresión de la transcripción de catepsina G y colágeno, mientras que incrementa la segregación de metaloproteasas, son características de las células monocíticas, los mecanismos involucrados se están estudiando. Sin embargo, las U-937 activadas no son capaces de expresar los antígenos HLA-DR que sí son inducidos en los macrófagos. Recientemente se han descrito algunos factores de transcripción implicados en los procesos de proliferación, apoptosis, ubiquitinación e integridad estructural, junto con otros factores implicados en la respuesta inflamatoria y del sistema inmune, lo que proporciona información clave para el estudio de los mecanismos patofisiológicos de la aterosclerosis<sup>41</sup>.

Respecto a los procesos de maduración de los monocitos, las U-937 se han utilizado para la determinación de mecanismos implicados en la modulación de procesos de activación y migración, como por ejemplo la hemoxigenasa 1 que podría constituir un novedoso mecanismo antiaterogénico. En relación a las implicaciones de las LDL en la formación de la placa de ateroma, las U-937 se han utilizado para el estudio de los mecanismos de oxidación mediados por células, de captación de los lípidos sanguíneos y de expresión de receptores característicos de estos procesos. Existen trabajos con U-937 que han descrito algunos mecanismos de formación de células espumosas y la liberación de moléculas una vez que estas células están cargadas de grasa y transformadas<sup>42</sup>.

Cabe destacar que los trabajos con U-937 contribuyeron a determinar el papel fundamental de los procesos inflamatorios, como la liberación de citoquinas proinflamatorias, en el desarrollo de la arterosclerosis. Por otro lado, esta línea celular se ha empleado en cocultivos con células endoteliales, evidenciando la mayor adherencia de las células monocíticas en presencia de LDL<sup>62</sup>, así como algunos mecanismos anti-aterogénicos relacionados con la prevención de estos procesos. Entre éstos encontramos trabajos recientes que muestran un posible mecanismo preventivo de las HDL a través de la lipasa endotelial y los activadores nucleares PPAR9 (*Peroxisome proliferator-activated receptor*)<sup>43</sup>.

## 2. CULTIVO CELULAR

El cultivo de células tuvo su origen en el siglo XIX. Reichlinhausen en 1866, mantuvo vivas células sanguíneas de anfibio, pero fue la utilización de bloques de agar con plasma coagulado (soporte y alimento) el inicio del cultivo de células *in vitro*<sup>45</sup>.

En la actualidad, pueden cultivarse en el laboratorio células procedentes de una amplia gama de tejidos y organismos diferentes. En un principio, el objetivo principal era el estudio de las propias células, cómo crecen, qué necesitan para su crecimiento, cómo y cuando dejan de crecer. Este tipo de estudios tiene hoy un gran interés científico, por ejemplo, en relación con investigaciones sobre el ciclo celular, el control del crecimiento de células tumorales y la modulación de la expresión genética. Otra área de gran interés se centra en la biología del desarrollo. Los esfuerzos para explicar cómo el gran número de células presentes en organismo maduro derivan de una sola célula a partir de la fertilización han llevado a la búsqueda de modelos experimentales<sup>46</sup>.

El cultivo celular es muy adecuado como modelo para el estudio del desarrollo y la diferenciación, por lo que las líneas celulares que conservan la capacidad de diferenciarse *in vitro* son objeto de un intenso estudio. Por último, hay cierto tipo de investigaciones que no pueden realizarse sin el cultivo de células, por ejemplo, el trabajo con animales transgénicos, conduce a que organismos maduros expresen genes nuevos, se basa totalmente en las técnicas de cultivo celular para la inserción de genes extraños en las células receptoras. Así mismo, la tecnología de la fusión celular y los ensayos de citotoxicidad son técnicas de cultivo celular que, en cierto modo, han sido diseñadas para sustituir a la metodología *in vivo*.

El crecimiento de las células en un cultivo celular primario depende de la supervivencia de éstas a las diferentes técnicas de disgregación y a la capacidad de adherirse al sustrato o de sobrevivir en suspensión. Si el cultivo primario se mantiene por pocas horas podría ocurrir un paso de selección futuro. Las células capaces de proliferar podrían aumentar, otros tipos de células podrían sobrevivir pero no aumentar y otras podrían ser capaces de sobrevivir en condiciones especiales. Además el crecimiento celular va ligado al espacio del cultivo, ya que unas células detienen su crecimiento, mientras que otras lo incrementan.

Los cultivos de células y tejidos pueden ser altamente sensibles a las sustancias químicas y permitir a los investigadores estudiar partes del cuerpo específicamente identificadas. Se han utilizado cultivos de células en investigaciones para el cáncer, el Parkinson, SIDA, desarrollo de medicamentos, toxicidad y Alzheimer<sup>47</sup>.

Son el producto de la colección de células vegetales o animales de diferentes órganos, colocadas en condiciones especiales propicias para su supervivencia y multiplicación, manteniendo para esto todas sus funciones metabólicas de una manera semejante a las que tenía en el huésped<sup>46</sup>.

Los cultivos de células animales se han clasificado de acuerdo a su capacidad de anclaje (adherencia), y así han sido aisladas recientemente de un órgano determinado o si provienen de células que han sufrido modificación<sup>44, 47</sup>.

De acuerdo a su capacidad de adherencia o no a una superficie determinada pueden crecer formando monocapa o en suspensión respectivamente, lo que está muy asociado con el tipo de célula de la cual derivan: por lo general las células provenientes de órganos, crecen en monocapa; igualmente existen células que pueden crecer indistintamente tanto en monocapa como en suspensión, ejemplo son las células HeLa que son células transformadas derivadas de cultivos en monocapa<sup>46</sup>.

Cuando el cultivo proviene de células que se han disgregado de un tejido original tomado de un órgano de un animal recién sacrificado, reciben el nombre de Cultivo Primario; si es sometido a procesos de transformación que le confiere capacidad ilimitada de multiplicación, reciben el nombre de Líneas Celulares, cuando se genera otro tipo de células que se pueden separar recibe el nombre de Cultivos Secundarios y cuando en el cultivo coexisten dos tipos de células de linajes diferentes que se pueden separar recibe el nombre de Cocultivo<sup>44</sup>.

Las células exhiben una variedad de "comportamientos sociales", permitiendo la formación de una monocapa que cubrirá la correspondiente superficie de crecimiento (confluencia), lo que hace que su multiplicación sea inhibida cuando establecen contacto entre sí (quiescencia)<sup>44</sup>.

Las células provenientes de cultivos primarios son las que mejor crecen en ésta condición, dada su estabilidad genética y su naturaleza diploide normal<sup>47</sup>.

Los recipientes para el cultivo de células estacionarias son cajas de Petri, frascos para el cultivo de tejido, entre otros, que pueden ser de material de plástico o de vidrio previamente tratado y su desprendimiento para transferirlas a superficies mayores se realizan con agentes proteolíticos como la tripsina<sup>46</sup>.

Las dos principales ventajas cuando se utilizan los cultivos celulares son: el control del medio fisicoquímico, a saber, pH, temperatura, presión osmótica, tensión de oxígeno (O<sub>2</sub>) y gas carbónico (CO<sub>2</sub>) de las células cultivadas y, las condiciones fisiológicas que deben ser constantes. La mayoría de las líneas celulares requieren para su buen desarrollo de suplementos en el medio en que se cultivan, ejemplo de esto es el suero, el cual provee infinidad de elementos como hormonas y otras sustancias reguladoras. El control del medio fisicoquímico y de las condiciones fisiológicas permite el cultivo de células específicas<sup>46, 47</sup>.

Los cultivos de células permiten someter a las mismas a una baja y definida concentración de reactivos asegurando un acceso directo en ellas, lo que ahorra en un 90% lo requerido para la inyección del reactivo *in vivo*, su excreción y su posterior distribución a los tejidos en estudio. Aunque los estudios *in vivo* resulten más económicos que los *in vitro* son descartados porque el uso de la experimentación en animales resulta cuestionado en aspectos legales, morales y éticos<sup>45</sup>.

## D. Proteínas MICA Y MICB

### 1. ¿QUÉ SON?

En contraste con el amplio conocimiento de los genes clásicos del MHC que han estado bajo intensa investigación, poco es lo que se conoce de los genes MIC. Recientemente se ha publicado su estructura y se han comenzado a hacer investigaciones en cuanto a la regulación de su expresión, su distribución en los tejidos y su variabilidad alélica<sup>10</sup>.

Los genes MICA y MICB están estrechamente relacionados y codifican para transcritos de 1382 y 2376 pares de bases respectivamente. La molécula de MICA es codificada por un gene muy largo (si se compara con los 3.5kb promedio del HLA) y poco común de 11722pb que se encuentra localizado 46.5 kilobases (kb) centromérico del locus HLA-B; también MICB es codificado por un gene extenso de 12930pb que está localizado a 83kb centromérico de MICA<sup>16</sup>.

### 2. FISIOLOGÍA

Los genes MICA y MICB son similares en estructura, aunque si los comparamos con las moléculas del MHC de clase I sólo comparten una similitud del 19%, 25% y 35% con respecto a los dominios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ . A pesar de ello, se ha postulado que sus proteínas se pliegan de manera semejante a las moléculas MHC de clase I. La proteína madura contiene tres dominios extracelulares precedidos de un segmento transmembranal y una cola citoplasmática relativamente corta. Además, las moléculas de MICA y MICB no se asocian con la  $\beta 2$ -microglobulina para su expresión fisiológica en la superficie celular, sus niveles de mRNA no se afectan por interferón gama, que es un inductor clásico para las moléculas de clase I, son independientes de los transportadores TAP y muy probablemente no presenten antígenos<sup>14,15</sup>.

MICA y MICB son los miembros más divergentes de los genes humanos del MHC clase I identificados hasta el momento, y mediante análisis de "southern blot" se ha sugerido que MIC se conserva en la mayoría de las especies de mamíferos. La excepción más ubicua es el ratón en el que no se ha detectado la presencia de esta familia de genes en su genoma, aunque se cree que posiblemente se encuentra su contraparte evolutiva que compensa su ausencia<sup>14,15</sup>.

El análisis filogenético de MICA sugiere que este gen tenga una divergencia de los demás genes del MHC de clase I después de la aparición de los anfibios pero antes de la separación de mamíferos marsupiales y placentarios<sup>17</sup>.

La expresión de las proteínas MICA y MICB esta asociada principalmente a estrés fisiológico por infección bacteriana, viral y por transformación maligna. Se ha documentado en varios tipos de cáncer de origen epitelial entre los que se encuentran: pulmón, ovario, próstata, mama, entre otros<sup>26</sup>.

MICA tiene una expresión restringida y regulada por estrés o infección, se induce en linfocitos T activados. Diversas células tumorales también expresan MICA, pero la



supresión de su expresión en superficie sería un mecanismo de evasión de la citotoxicidad NKG2D-dependiente<sup>28</sup>.

La búsqueda de nuevas secuencias codificadoras en la región cercana al locus HLA-B para dilucidar la asociación entre el HLA-B27 con enfermedades reumatoides e inflamatorias condujo al descubrimiento de una nueva familia, los genes MIC (Major histocompatibility complex class I Chain-related genes, por sus siglas en inglés), que consisten en siete miembros, MICA (PERB11.1), MICB (PERB11.2), MICC (PERB11.3), MICD (PERB11.4), MICE (PERB11.5), MICE (PERB11.6) y MICG (PERB11.7) de los cuales sólo MICA y MICB codifican para transcritos de ARNm, mientras que MICC, MICD, MICE, MICE y MICG son pseudogenes debido a que presentan varias mutaciones puntuales y de lesiones (Fig. 2).

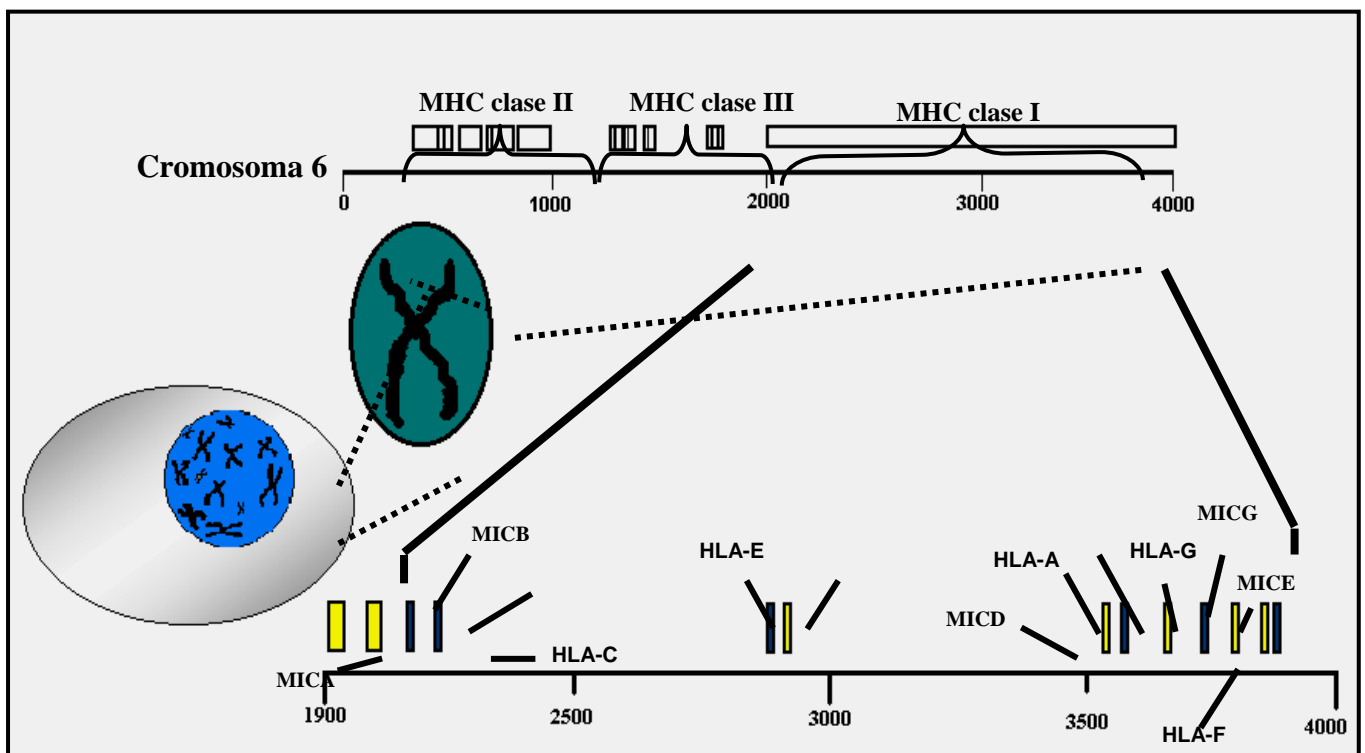


Fig. 1 Localización de los genes MIC en el cromosoma 6 (Tomado de Mendoza et al., 2001)

MICA y MICB son moléculas que no se expresan en células normales pero sí lo hacen en células infectadas, transformadas o estresadas lo que permite su eliminación por el sistema inmune. La expresión de estas moléculas desencadena la activación de linfocitos T y células naturales killer mediante la interacción con el receptor activador NKG2D. Se ha postulado que la expresión de estas moléculas debe estar estrictamente regulada, ya que una expresión inapropiada puede llevar al desencadenamiento o la exacerbación de una respuesta autoinmune. De acuerdo con esta idea, se ha implicado a estas moléculas en la patogenia de diversas enfermedades autoinmunes<sup>23, 25</sup>.

MICA y MICB (MICA/B) forman una nueva familia de moléculas de HLA de clase I denominadas no clásicas<sup>18</sup>. Estas moléculas no presentan péptidos y no se expresan en la mayoría de las células en condiciones normales, pero su expresión se incrementa notablemente en respuesta al estrés biológico (p. ej., en respuesta a una infección o transformación tumoral), y entonces las células NK las reconocen los linfocitos T a través de un receptor activador que se expresa en estas células denominado NKG2D (fig. 3)<sup>20</sup>. Este reconocimiento permite al sistema inmune eliminar las células que padecen estrés biológico y, por tanto, constituye un mecanismo de inmunovigilancia. La mediación de MICA/B en la eliminación de células estresadas implica que estas moléculas se deben regular estrictamente, ya que su expresión exagerada (p. ej., en los sinoviocitos) puede llevar a la destrucción de las propias células y, como consecuencia, a la generación de una respuesta autoinmune, como la que se observa en la artritis reumatoide<sup>24</sup>.

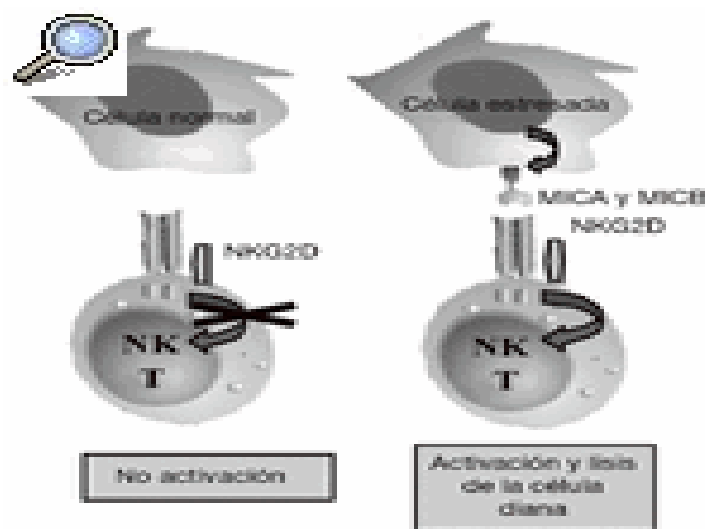


Figura 2. Función de MICA y MICB. Estas moléculas no se expresan en células normales, pero su expresión se induce en células infectadas, transformadas o estresadas, lo que permite su eliminación por el sistema inmune mediante su interacción con el receptor activador NKG2D presente en linfocitos T y células *natural killer* (NK).

MICA/B son moléculas que se inducen por el estrés biológico. Su función es alertar al sistema inmune del posible daño de alguna de nuestras células. Ya que el receptor NKG2D se expresa de una forma constitutiva en los linfocitos T citotóxicos y en las células NK, la expresión de MICA/B puede llevar directamente a la destrucción de la célula dañada. Esto sugiere que la expresión inespecífica de MICA/B durante un proceso inflamatorio o la expresión inadecuada en individuos genéticamente predispuestos pueden desencadenar o exacerbar las enfermedades autoinmunes<sup>27</sup>.

A pesar de que MICA y MICB son dos moléculas altamente polimórficas, las características funcionales de la mayoría de sus polimorfismos son desconocidas. Algunos alelos de MICB presentan en su región promotora una delección de dos pares de bases en la posición 66 (AG/-) que disminuyen muy significativamente la transcripción de MICB (hasta unas 18 veces)<sup>22, 30</sup>. Estos polimorfismos son muy frecuentes en nuestra población,

lo que implica que existen grandes variaciones en la expresión de MICB entre los diferentes individuos que la componen. Esto podría llevar a suponer que los individuos que producen grandes cantidades de MICB (como los que son MICB\*004) expresen mayor cantidad de MICB en la sinovia y produzcan una reacción autoinmune más intensa<sup>11,18</sup>. Esto explicaría por qué estos individuos se asocian con un mayor riesgo de padecer AR y otras enfermedades inmunológicas, como la esclerosis múltiple o la enfermedad celíaca. Se puede predecir que, por el contrario, estos individuos estarían más protegidos del desarrollo del cáncer, aunque esto no se ha demostrado aún experimentalmente<sup>27</sup>.

### **3. EXPRESIÓN DE MICA Y MICB: ASOCIACIÓN CON ESTRÉS FISIOLÓGICO EN CÉLULAS EPITELIALES**

Se ha aceptado que las moléculas HLA de clase I (HLA-A, B y C) se expresan ubicuamente en la mayoría de las células de nuestro organismo, mientras que las moléculas no clásicas del HLA de clase I (HLA-E, F y G) tienen una distribución mucho más limitada. Por consiguiente, no fue ninguna sorpresa cuando aparecieron los primeros reportes de la expresión de las proteínas MICA y MICB. Por lo general, tanto MICA como MICB<sup>48</sup> se expresan principalmente en fibroblastos y células epiteliales, pero preponderantemente en la mayoría de los tejidos de origen epitelial. Por otra parte, reportes recientes indican que la expresión de las proteínas de MICA y MICB en la superficie celular se encuentran disminuida o sobre expresada en células transformadas de diversos tipos, pero de manera particular en aquellas de origen epitelial<sup>7, 31</sup>. Todas estas evidencias en su conjunto nos indican de manera clara que las proteínas MICA y MICB pueden considerarse como marcadores fisiológicos de estrés en células epiteliales, lo que es consistente con los reportes de que el calor (a través de las proteínas de choque térmico) y los virus inducen un incremento de la expresión de las proteínas MIC en la superficie celular de las células epiteliales<sup>11</sup>.

### **4. NKG2D**

Las células natural killer (asesinas naturales)

Las células NK (también conocidas como células asesinas naturales) son un elemento importante del sistema inmunológico innato que es capaz de matar células tumorales. Las células infectadas, con daño a nivel de DNA o con estrés fisiológico son reconocidas por las células NK que expresan un número grande de receptores de superficie conocidos como receptores NKG2D. Muchos de estos receptores también se presentan en células T citotóxicas y en linfocitos intestinales. El receptor NKG2D es un receptor activador que ha generado un gran interés considerable recientemente por su posible utilidad en la vigilancia inmunológica<sup>26</sup>. Existen 2 tipos de receptores NKG2D identificados recientemente. Los ligandos que reconocen este receptor son principalmente las proteínas MICA y MICB (MHC class I chain related gene) y también se han descrito que se une a las proteínas denominadas ULBPs. En el contexto de la respuesta inmune las proteínas MICA y MICB se expresan sobre la superficie de las células estresadas para que sean eliminadas por células NK y/o linfocitos T citotóxicos.<sup>12, 17</sup>

En humanos, NKG2D tiene como ligandos 2 familias de moléculas similares a las moléculas de HLA de clase I denominadas MIC (*MHC class I related genes*) que incluyen a MICA/B, y la familia de las ULBP (*UL16 Binding Proteins*)<sup>19</sup>. MICA/B fueron los primeros ligandos de NKG2D identificados. Los genes que codifican estas proteínas se sitúan cerca de la región del MHC de clase I<sup>25</sup>. MICA/B son moléculas de MHC de clase I denominadas no clásicas, ya que tienen una estructura formada por 3 dominios denominados a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub> y a<sub>3</sub>, similares a los que tienen las moléculas de MHC de clase I, pero a diferencia de éstas, no se unen a  $\beta_2$ -microglobulina ni presentan péptidos intracelulares. MICA/B se expresan de una forma restringida en tejidos sanos, pero los valores de estas proteínas se incrementan en la superficie de células tumorales o sometidas a otros tipos de estrés (p. ej., por una infección por citomegalovirus humano, el estrés oxidativo o el estrés genotóxico).<sup>13, 27</sup>

No obstante, se han descrito numerosos mecanismos de evasión de la respuesta inmune frente a estas células bajo condiciones de estrés. Por ejemplo, en las células tumorales la proteína MICA se digiere de la superficie de las células por la acción de una proteasa, lo que da lugar a la formación de moléculas solubles de MICA. La digestión de MICA de la superficie de la célula dificulta el reconocimiento de las células tumorales por el sistema inmune, y además, la forma soluble de MICA es un potente inmunosupresor que inhibe la expresión de NKG2D en la superficie de los linfocitos T y de las células NK.<sup>26, 27</sup>

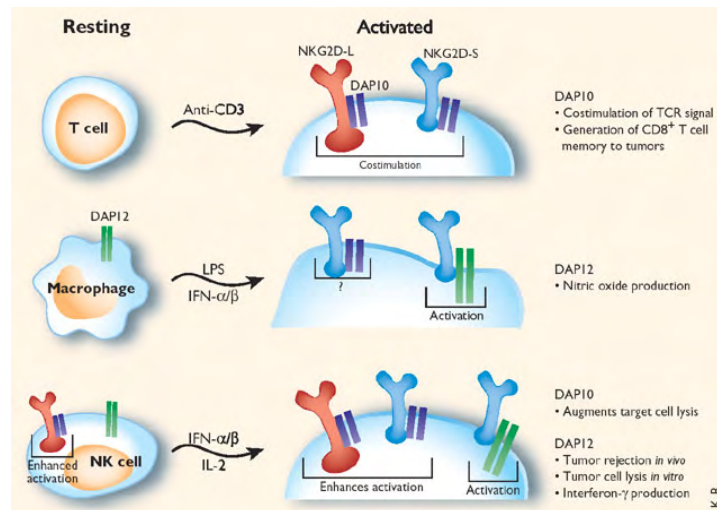


Figura 3. La señalización versátil por el receptor de NKG2D.

Algo paradójico con respecto a las proteínas MIC es el hecho de que si su función es la de estimular al sistema inmune, cabría preguntar, ¿cómo es que entonces se desarrollan los tumores aún estando presentes las proteínas MIC?. Esto comenzó a dilucidarse cuando se descubrió que no todas las variantes de genes que codifican para MICA se expresan en las membranas de las células, específicamente la variante del gen para MICA, el cual se caracteriza por la inserción de 4 nucleótidos causando la terminación prematura de la proteína por la aparición del triplete de terminación (TAA) en la región transmembranal, esto trae como consecuencia que la proteína no se pueda expresar en la superficie de las células, dando origen a una forma soluble de MICA (sMICA)<sup>9</sup>. Ya existen reportes en los

que se demuestra que ciertas líneas tumorales tienen la capacidad de liberar una forma soluble de las proteínas MIC<sup>21</sup>. La proteína sMIC se une al receptor NKG2D presente en linfocitos  $\alpha\beta$ T y  $\gamma\delta$ T así como a células NK, esta unión promueve la endocitosis seguido de reciclamiento o degradación de NKG2D, similar a lo que sucede con diversos receptores al unirse a sus ligandos<sup>26</sup>. La disminución en la expresión de NKG2D provoca la aparición de células NK y linfocitos  $\alpha\beta$ T y  $\gamma\delta$ T carentes de dicho receptor, estas células ciegas por llamarlas de alguna manera, son incapaces de reconocer a las células tumorales o transformadas aun estando presentes las proteínas MIC a nivel de membrana y así evadir al sistema inmunológico<sup>26, 29</sup>.

#### IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el laboratorio de oncología molecular al extender el modelo de estudio a otro sistema y emplear líneas celulares leucémicas (Thp-1, U-937 y HL-60) se encontró que la expresión de las proteínas MICA y MICB se encuentra elevada. Además, que se secreta al medio en forma soluble (sMICA) se detecta en los sobrenadantes de los cultivos por medio de ELISA. Estos resultados en su conjunto hacen pensar que las proteínas MICA y MICB al estar en forma soluble posiblemente sean de presencia para ser reconocidas por el sistema inmune y evitar su eliminación por el receptor NKG2D y linfocitos T citotóxicos.

Sin embargo, aunque este hecho resulta en un mecanismo de escape inmunológico, la presencia de las formas solubles de MICA y MICB se puede utilizar como marcador del progreso, desarrollo y establecimiento del tumor<sup>47</sup>. En este proyecto estudiara el potencial de las formas solubles de MICA y MICB (sMICA y sMICB) como marcadores en líneas celulares de leucemia mieloide aguda.

Ya existen resultados preliminares donde se ha demostrado que se secreta la forma soluble de MICA y que esta secreción se incrementa durante los días de cultivo alcanzando su máximo a los 8 días. En este trabajo considero necesario determinar si también esta expresándose MICB y evaluar si la producción de MICA/MICB alcanza su máximo a los 8 días de cultivo a partir de un plaqueo realizado para tomar sobrenadantes de la línea celular o durante más días de cultivo<sup>47, 48</sup>. Asimismo estos estudios se extenderán a otra línea leucémica humana conocida como HL-60.

Considero que en su conjunto los resultados que se obtengan, nos permitirán entender si el sistema MICA/MICB esta secretándose en las líneas tumorales estudiadas ya que ello representaría un mecanismo de evasión de la respuesta inmune contra el tumor.

## **V. OBJETIVOS**

### **1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar a través los sobrenadantes de las líneas celulares Thp-1, U-937 y HL-60 de leucemia mieloide aguda la presencia de las proteínas de estrés fisiológico MICA y MICB como marcadores biológicos por medio de la técnica de ELISA.

### **2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Estandarización de la técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).
- Análisis bioquímico de la expresión de las proteínas MICA y MICB por medio de anticuerpos monoclonales en células provenientes de leucemia mieloide aguda.
- Determinar por medio del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) la presencia de la proteína MICA y MICB en células de Leucemia Mieloide Aguda.

## **VI. HIPÓTESIS**

La expresión de las proteínas codificadas por los genes MIC se aumenta bajo condiciones de estrés fisiológico y por la presencia de virus. En consecuencia, se espera encontrar un aumento en la expresión de las proteínas MICA y MICB en las líneas celulares Thp-1, U-937 y HL-60 provenientes de leucemia mieloide aguda humana. Por lo tanto, las formas solubles de MICA y MICB serán marcadores en la progresión de la leucemia.



## VII. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 1. MATERIAL

- Incubadora de CO<sub>2</sub>
- Centrifuga
- Campana de extracción
- Microscopio
- Balanza analítica de doble plato
- Balanza analítica
- Lector de ELISA
- Cajas para cultivo celular
- Tubos de plástico de 25mL
- Tubos de plástico de 45mL
- Micropipetas de 50-100μL
- Micropipetas de 100-1000μL
- Micropipetas de 1-20μL
- Puntas para micropipetas
- Algodón
- Pipetas graduadas de 5mL
- Pipetas graduadas de 2mL
- Pipetas graduadas de 1mL
- Recipientes para residuos
- Pissetas
- Cámara de Neubauer

### 2. REACTIVOS

- Alcohol al 96%
- RPMI 1640
- Solución de aminoácidos
- Solución de piruvato
- Suero de bovino
- PBS-T 0.05%
- Anticuerpo primario y secundario
- Mezcla de carbonatos 100, 10, 1 y 0.1ng/mL
- Leche descremada swelty al 1%
- Sustrato ABTS

### 3. MÉTODOS

#### a. Líneas Celulares

1. Se emplearon las líneas celulares derivadas de leucemia mieloide aguda HL-60, Thp-1 y U-937.
2. Las células Thp-1 y U-937 se cultivaron de la siguiente manera. Se le agregó a cada línea celular 1mL de suero, 0.05mL de solución de aminoácidos y 0.05mL de solución de piruvato de sodio y por ultimo 4mL de RMPI 1640 para tener al final un volumen de aprox. 5mL. Teniendo un inoculo inicial de 10, 000 células en botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>.
3. Las células HL-60 se cultivaron de la siguiente manera. Se le agregó 1mL de suero y por ultimo 4mL de RMPI 1640 para tener al final un volumen de aprox. 5mL. Teniendo un inoculo inicial de 10, 000 células en botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>.
4. Posteriormente se incubaron a una atmósfera saturante de humedad, temperatura de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.
5. Estas se revisaron cada tercer día y se sembraban pasado ese tiempo.
6. Se mantuvieron en esas condiciones de cultivo hasta su uso posterior.

#### b. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

##### *Curva Patrón*

1. Primero se preparo la proteína (recombinant Human MICA /Fc Chimera) en PBS 1X y se diluyo el antígeno a una concentración de (100, 10, 1 y 0.1) ng con buffer sensibilizador (mezcla de carbonatos) y se coloco en la placa de ELISA con un volumen de 100µL en cada pozo, cada concentración se realizo por triplicado.
2. Las concentraciones son las siguientes:
  - a.  $V_{100ng}=100ng \times 1500\mu L/50000ng=3\mu L$  para mezcla de 1497µL en amortiguador de carbonatos.
  - b.  $V_{10ng}=10ng \times 1500\mu L/100ng=150\mu L$  para mezcla de 1350 µL en amortiguador de carbonatos.
  - c.  $V_{1ng}=1ng \times 1500\mu L/1ng=150\mu L$  para mezcla de 1350 µL en amortiguador de carbonatos.
  - d.  $V_{0.1ng}=0.1ng \times 1500\mu L/0.1ng=150\mu L$  para mezcla de 1350 µL en amortiguador de carbonatos.
3. Se incubo toda la noche a 4°C, pasado este tiempo se retiro el liquido y se procedió al lavado de los pozos dos veces con una solución de PBS-T 0.05% con 100µL cada pozo.
4. Terminado el paso anterior, se bloquearon los pozos con 200µL de leche descremada svelty 1% y se incubo por 1h a 37°C.
5. Pasado este tiempo se retiro el líquido y se procedió al lavado de los pozos cuatro veces con 100µL de la solución de PBS-T 0.05%.
6. Posteriormente se agregaron 100 µL de anticuerpo primario (anti-MICA) diluido en leche descremada svelty al 1% a una concentración 1:100. Se incubó por 1h a 37°C

- (se deja un pozo de la curva estándar sin anticuerpo primario para que sirviera como blanco y se cubrió con la leche descremada swelty al 1%).
7. Pasado ese tiempo se retiró el líquido y se procedió al lavado de los pozos seis veces con 100µL de una solución de PBS-T 0.05%.
  8. Se agregó el anticuerpo secundario HRP/RyM diluido con la leche descremada swelty al 1% a una concentración 1:4000, 100µL por pozo.
  9. Se dejó incubando 1h a 37°C. Lavar ocho veces con la solución PBS-T 0.05% con 100µL cada pozo y luego se colocó 100µL de sustrato ABTS y se incubó por 1h a 37°C en oscuro (se tapó con aluminio).
  10. Leer la densidad óptica a una longitud de onda de 405nm en el lector de placas.

Los pasos anteriores se realizaron también para MICB.

### ***Muestras de Líneas Celulares***

1. Se colocaron los sobrenadantes de la línea celular en los pozos, por triplicado, 100µL por pozo.
2. Se incubó toda la noche a 4°C, pasado este tiempo se retiró el líquido y se procedió al lavado de los pozos dos veces con 100µL de solución de PBS-T 0.05%.
3. Terminado el paso anterior, se bloquearon los pozos con 200µL de leche descremada swelty 1% y se incubó por 1h a 37°C.
4. Pasado este tiempo se retiró el líquido y se procedió al lavado de los pozos cuatro veces con 100µL de la solución de PBS-T 0.05%.
5. Posteriormente se agregó 100 µL de anticuerpo primario (anti-MICA) diluido en leche descremada swelty al 1% a una concentración 1:100. Se incubó por 1h a 37°C (se deja un pozo de la curva estándar sin anticuerpo primario para que sirviera como blanco y se cubrió con la leche descremada swelty al 1%).
6. Pasado ese tiempo se retiró el líquido y se procedió al lavado de los pozos seis veces con 100µL de una solución de PBS-T 0.05%.
7. Se agregó el anticuerpo secundario HRP/RyM diluido con la leche descremada swelty al 1% a una concentración 1:4000, 100µL por pozo.
8. Se dejó incubando 1h a 37°C. Se lavó ocho veces con la solución PBS-T 0.05% con 100µL cada pozo y luego se colocaron 100µL de sustrato ABTS y se incubó por 1h a 37°C en oscuro (se tapó con aluminio).
9. Se leyó la densidad óptica a una longitud de onda de 405nm en el lector de placas.

Los pasos anteriores se realizaron también para MICB.

En el paso 1 de la técnica de ***Muestras de Líneas Celulares***, se colocó por cada placa de ELISA una línea celular ya sea Thp-1, U-937 o HL-60, y se siguió el resto del procedimiento.

### **c. Métodos Estadísticos**

Se aplicó el paquete estadístico de Excel versión 2007.

El análisis estadístico se realizó comparando el control contra la línea celular de LMA humana.

## VIII. RESULTADOS

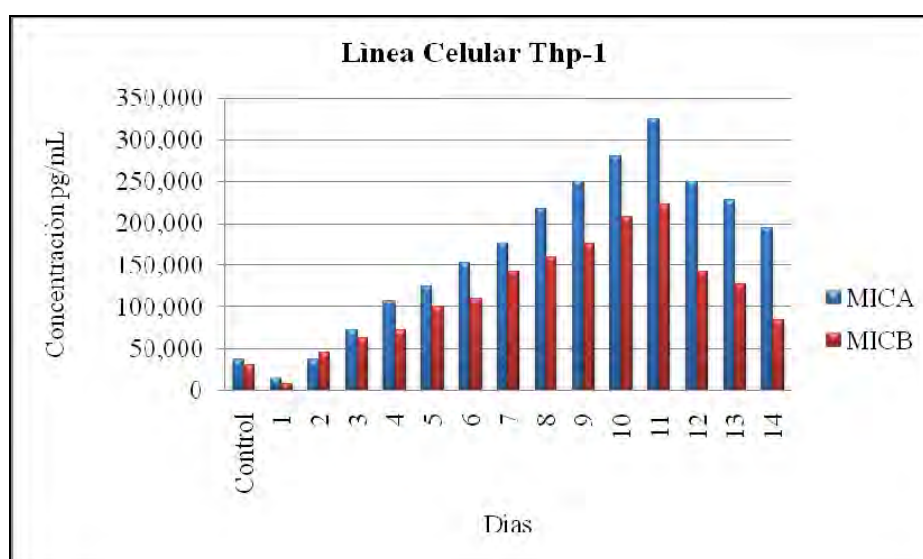
En estudios previos se ha utilizado preferentemente el ensayo de ELISA para determinar la presencia de la proteína MICA y MICB. Por ello se tuvieron que modificar algunas variables de dicha técnica para poder obtener buenos resultados. Tal fue el caso que la primera incubación se realizara a una temperatura de 37°C durante 1 hora y se tuvo que modificar a una temperatura de 4°C durante 24 horas y el resto de las incubaciones fue a 37°C durante 1 hora, esto nos permitió obtener que las proteínas que se deseaban estudiar se pegaran mejor a la placa la cual tenía esa característica (placa de ELISA) y existiera un equilibrio entre reactivos. Otra de las variables que se modificaron fue la de los lavados, ya que la técnica recomendaba realizar dos lavados después de cada incubación, y se modificó realizando después de la primera incubación dos lavados y posteriormente después de cada incubación se fueron aumentando dos lavados hasta que en la última incubación fue de 8 lavados, esto sirvió para que se lavaran bien los pozos de la placa de ELISA y eliminar los residuos que se pudieran quedar pegados o alguna sustancia que no se deseara. Para la parte del bloqueo nos recomendaba la técnica utilizar 120µL de leche descremada svelty al 3% por pozo, para lo cual se modificó agregando 200µL de leche descremada svelty al 1% por pozo. La última variable que se modificó fue la marca del sustrato revelador, tal fue el caso que se estaba utilizando el sustrato ABTS de la marca Zimed y se cambió por la marca Amresco ya que esta nos permitió tener un mejor color del revelado.

Detección de la forma soluble de MICA/MICB en los sobrenadantes de líneas celulares de leucemia mieloide humana.

En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos de las concentraciones a diferentes días de cultivo de los sobrenadantes de la línea celular Thp-1. Se observa que la concentración de MICA y MICB se incrementa con respecto a los días de cultivo y alcanza un máximo a los 11 días y posteriormente empieza a disminuir su concentración.

Tabla 1. Determinación de la forma soluble de MICA y MICB en los sobrenadantes de la línea celular Thp-1.

	MICA	MICA	MICA	MICB	MICB	MICB
Días	Absorbancia	Concentración ng/mL	Concentración pg/mL	Absorbancia	Concentración ng/mL	Concentración pg/mL
Control	1.37	37	37,000	1.49	30	30,000
1	1.33	15	15,000	1.45	8	8,000
2	1.37	37	37,000	1.52	45	45,000
3	1.43	72	72,000	1.55	62	62,000
4	1.49	107	107,000	1.57	73	73,000
5	1.52	125	125,000	1.62	100	100,000
6	1.57	153	153,000	1.64	110	110,000
7	1.61	176	176,000	1.7	143	143,000
8	1.68	217	217,000	1.73	160	160,000
9	1.74	250	250,000	1.76	175	175,000
10	1.79	280	280,000	1.82	207	207,000
11	1.87	325	325,000	1.85	223	223,000
12	1.74	250	250,000	1.7	143	143,000
13	1.7	228	228,000	1.67	127	127,000
14	1.64	194	194,000	1.59	84	84,000

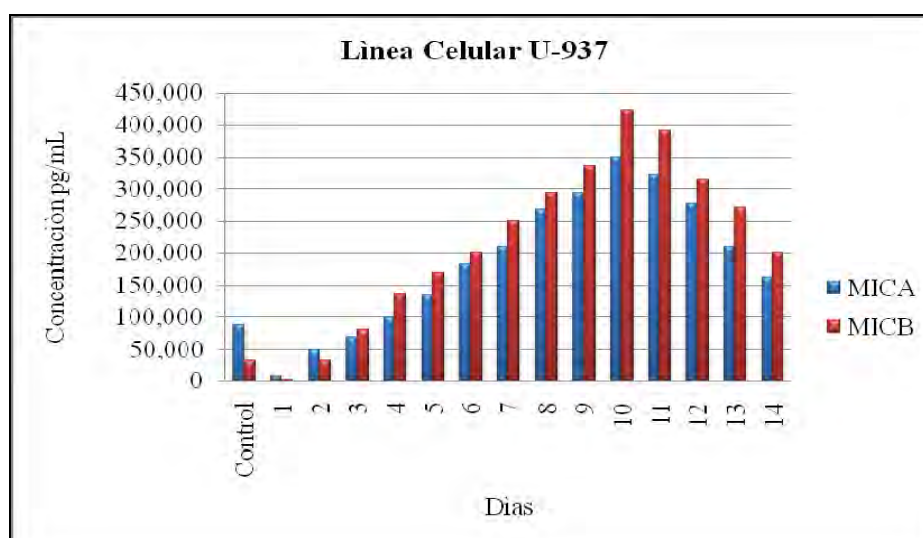


Gráfica 1. Concentraciones obtenidas de la forma soluble de MICA y MICB en los sobrenadantes de la línea celular Thp-1.

En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos de las concentraciones a diferentes días de cultivo de los sobrenadantes de la línea celular U-937. Se observa que la concentración de MICA y MICB se incrementa con respecto a los días de cultivo y alcanza un máximo a los 10 días y posteriormente empieza a disminuir.

Tabla 2. Determinación de la forma soluble de MICA y MICB en los sobrenadantes de la línea celular U-937.

	MICA	MICA	MICA	MICB	MICB	MICB
Días	Absorbancia	Concentración ng/mL	Concentración pg/mL	Absorbancia	Concentración ng/mL	Concentración pg/mL
Control	1.29	88	88,000	1.26	33	33,000
1	1.21	9	9,000	1.23	3	3,000
2	1.25	50	50,000	1.26	33	33,000
3	1.27	69	69,000	1.3	80	80,000
4	1.3	100	100,000	1.35	136	136,000
5	1.34	135	135,000	1.38	170	170,000
6	1.39	182	182,000	1.41	201	201,000
7	1.42	210	210,000	1.45	250	250,000
8	1.48	267	267,000	1.49	293	293,000
9	1.51	293	293,000	1.53	336	336,000
10	1.57	350	350,000	1.61	423	423,000
11	1.54	322	322,000	1.58	390	390,000
12	1.49	276	276,000	1.51	315	315,000
13	1.42	210	210,000	1.47	270	270,000
14	1.37	163	163,000	1.41	201	201,000

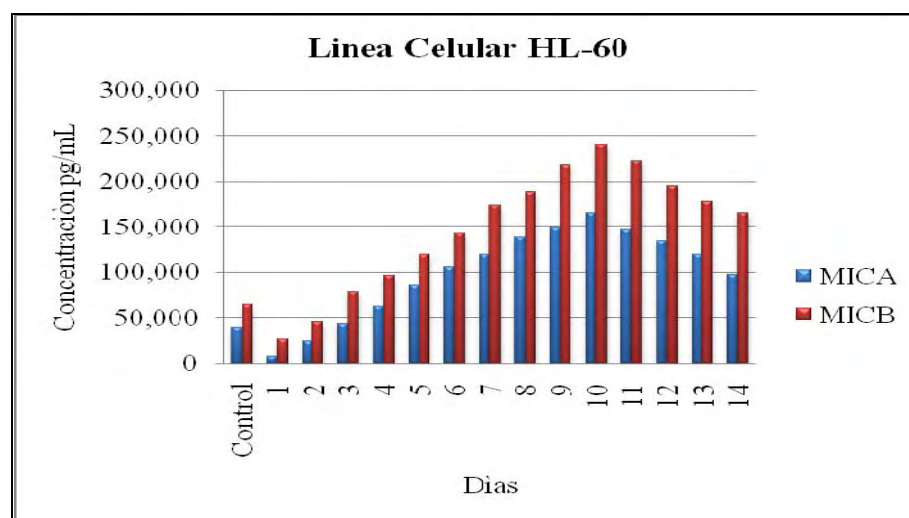


Gráfica 2. Concentraciones obtenidas de la forma soluble de MICA y MICB en los sobrenadantes de la línea celular U-937.

En la tabla 3 se presentan los resultados obtenidos de las concentraciones a diferentes días de cultivo de los sobrenadantes de la línea celular HL-60. Se observa que la concentración de MICA y MICB se incrementa con respecto a los días de cultivo y alcanza un máximo a los 10 días y posteriormente empieza a disminuir su concentración.

Tabla 3. Determinación de la forma soluble de MICA y MICB en los sobrenadantes de la línea celular HL-60.

	MICA	MICA	MICA	MICB	MICB	MICB
Días	Absorbancia	Concentración ng/mL	Concentración pg/mL	Absorbancia	Concentración ng/mL	Concentración pg/mL
Control	1.52	39	39,000	1.55	64	64,000
1	1.44	8	8,000	1.47	27	27,000
2	1.48	24	24,000	1.51	45	45,000
3	1.53	43	43,000	1.58	78	78,000
4	1.58	62	62,000	1.62	96	96,000
5	1.64	85	85,000	1.67	119	119,000
6	1.69	105	105,000	1.72	142	142,000
7	1.73	119	119,000	1.79	174	174,000
8	1.78	138	138,000	1.82	188	188,000
9	1.81	149	149,000	1.89	218	218,000
10	1.85	165	165,000	1.94	240	240,000
11	1.8	146	146,000	1.9	222	222,000
12	1.77	134	134,000	1.84	195	195,000
13	1.73	119	119,000	1.8	178	178,000
14	1.67	97	97,000	1.77	165	165,000



Gráfica 3. Concentraciones obtenidas de la forma soluble de MICA y MICB en los sobrenadantes de la línea celular HL-60.



## IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se aplicó el paquete estadístico de Excel versión 2007.

El análisis estadístico se realizó comparando el control contra la línea celular de LMA humana.

### Modelo Estadístico

El diseño de bloques aleatorios es una generalización de la  $t$  de student para diferencias apareadas entre dos medias. El propósito de este diseño es el de hacer comparaciones entre un conjunto de tratamientos dentro de bloques de material experimental. El objetivo de usar este diseño es el de aislar y remover la fuente de variación del error la variación atribuida a los bloques para asegurar que las medias de los tratamientos estarán libres del efecto de bloques.

El siguiente modelo nos sirvió para realizar el diseño completamente aleatorio.

### Diseño de Bloques Aleatorios Completos al Azar

#### Modelo

$$Y_{ij} = \mu + \beta_i + \tau_j + \varepsilon_{ij}$$

$Y_{ij}$  = es una observación cualquiera

$\mu$  = media poblacional o gran media

$\beta_i$  = efecto de bloques

$\tau_j$  = efecto de tratamiento

$\varepsilon_{ij}$  = efecto de error aleatorio

Todos los cálculos se pueden resumir en la tabla 4 de ANADEVVA para el diseño de un factor con bloques completos al azar, donde a través de la  $F_{cal}$  y  $F_{teórica}$  podemos comprobar si se acepta o rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ ) o la hipótesis alterna ( $H_a$ ). En el caso de que  $F_{cal} > F_{teórica}$ , se rechaza la  $H_0$  y se acepta la  $H_a$ , pero si  $F_{cal} < F_{teórica}$  se rechaza la  $H_a$  y se acepta la  $H_0$ .

Tabla 4. Tabla de ANADEVVA para el diseño de un factor de bloques completos al azar

Fuente	g.l.	S.C.	C.M.	$F_{cal}$	$F_{teórica}$
Tratamiento	K-1	$SC_{Trat.} = \sum_{j=1}^k Y_{.j}^2/n_j - Y_{..}^2/N$	$CM_{Trat.} = SC_{Trat.}/K-1$	$F_{Cal} = CM_{Trat.}/CM_{Error}$	$F_{Teórica} = F_{1-\alpha, K-1, (K-1)(n-1)}$
Bloques	N-1	$SC_{Bloques} = \sum_{i=1}^n Y_{i.}^2/K - Y_{..}^2/N$	-----		
Error	(K-1)(n-1)	$SC_{Error} = SC_{Total} - SC_{Bloques} - SC_{Trat.}$	$CM_{Error} = SC_{Error}/g.l_{Error}$		
Total	N-1	$SC_{Total} = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^n Y_{ij}^2 - Y_{..}^2/N$	-----		

g.l.: Grados de Libertad. S.C.: Suma de Cuadrados. C.M.: Cuadrados Medios.

La prueba de Scheffé sirve para probar la hipótesis alterna en la cual se compruebe que existe una diferencia entre cualquier par de medias. Como también siempre y cuando  $F_{cal} > F_{Teórica}$ .

Para lo cual se utiliza la siguiente ecuación:

$$S = \sqrt{(K-1)F_{1-\alpha, K-1, glerror}} \sqrt{2CM_{error/n}}$$

Si la diferencia entre cualquier par de medias excede este valor de S, se dice que hay diferencia significativa entre las medias comparadas. Para lo cual las diferencias entre cada uno de los valores de las medias se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 5. Tabla para realizar los valores absolutos de las diferencias entre  $Y_{.1}$ ,  $Y_{.2}$ ,  $Y_{.3}$

	$Y_{.1}$	$Y_{.2}$	$Y_{.3}$
$Y_{.1}$	$ Y_{.1}-Y_{.1} $	$ Y_{.2}-Y_{.1} $	$ Y_{.3}-Y_{.1} $
$Y_{.2}$	$ Y_{.2}-Y_{.1} $	$ Y_{.2}-Y_{.2} $	$ Y_{.3}-Y_{.2} $
$Y_{.3}$	$ Y_{.3}-Y_{.1} $	$ Y_{.3}-Y_{.2} $	$ Y_{.3}-Y_{.3} $

Tabla 6. Tabla de ANADEVa con los resultados obtenidos de las concentraciones de los sobrenadantes de la línea celular Thp-1 con la proteína MICA para el diseño de un factor de bloques completos al azar.

		Factor Thp-1 con MICA			
Días\Conc.		$C_1$	$C_2$	$C_3$	$Y_i$
Bloques (D)	0 (Control)	43,000	8,000	37,000	88,000
	1	26,000	3,000	15,000	44,000
	2	56,000	57,000	37,000	150,000
	3	78,000	82,000	72,000	232,000
	4	106,000	119,000	107,000	332,000
	5	118,000	135,000	125,000	378,000
	6	150,000	180,000	153,000	483,000
	7	172,000	210,000	176,000	558,000
	8	189,000	240,000	217,000	646,000
	9	198,000	265,000	250,000	713,000
	10	220,000	283,000	280,000	783,000
	11	241,000	318,000	325,000	884,000
	12	238,000	295,000	250,000	783,000
	13	207,000	270,000	228,000	705,000
	14	193,000	240,000	194,000	627,000
	$n_i$	15	15	15	$N = 45$
	$Y_{.j}$	2,235,000	2,705,000	2,466,000	$Y_{..} = 7,406,000$

Tabla 7. Valores obtenidos a través de la tabla de ANADEVa con los resultados de las concentraciones de los sobrenadantes de la línea celular Thp-1 con la proteína MICA.

Fuente	g.l.	S.C.	C.M.	F <sub>cal</sub>	F <sub>Teórica</sub>
Tratamiento	2	7,364,044,444.445	2,454,681,480.482	5.962	5.453
Bloques	44	350,216,311,111.111	-----		
Error	28	11,528,622,222	411,736,507.936		
Total	44	369,108,977,778	-----		

Ho: Si las leucemias provocan un estrés fisiológico debido a que se desarrolla un proceso de neotransformación, entonces es posible que los niveles de la proteína MICA en células sean igual a las líneas celulares de leucemia humana.

Ha: Si las leucemias provocan un estrés fisiológico debido a que se desarrolla un proceso de neotransformación, entonces es posible que los niveles de la proteína MICA en células sean diferentes a las líneas celulares de leucemia humana.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

$$H_a: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$$

Prueba de Scheffé

Ecuación

$$S = \sqrt{(K-1)F_{1-\alpha, K-1, gl_{error}}} \sqrt{2CM_{error}/n}$$

Valor obtenido

$$S = 24,468.610$$

Tabla 8. Resultados de los valores absolutos de las diferencias entre Y<sub>.1</sub>, Y<sub>.2</sub>, Y<sub>.3</sub>

	Y <sub>.1</sub>	Y <sub>.2</sub>	Y <sub>.3</sub>
Y <sub>.1</sub>	---	470,000	231,000
Y <sub>.2</sub>	---	---	-239,000
Y <sub>.3</sub>	---	---	---

Todas las diferencias entre los pares de medias son menores que 24,468.610, por lo que no hay diferencia significativa.

Conclusión: Se concluye que entre la línea celular Thp-1 con la proteína MICA de LMA humana y el control hay una diferencia y entonces se acepta la hipótesis alterna (Ha) con un valor de F= 5.453. Ya que el valor de S de la prueba de Scheffé es mayor al de cada una de las medias y por lo tanto se corrobora que existe una diferencia entre los valores obtenidos de cada una de las concentraciones.

Tabla 9. Tabla de ANADEVa con los resultados obtenidos de las concentraciones de los sobrenadantes de la línea celular Thp-1 con la proteína MICB para el diseño de un factor de bloques completos al azar.

		Factor Thp-1 con MICB			
		C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	Y <sub>i</sub>
Bloques (D)	0 (Control)	15,000	7,000	30,000	52,000
	1	4,000	1,000	8,000	13,000
	2	10,000	45,000	45,000	100,000
	3	40,000	70,000	62,000	172,000
	4	70,000	95,000	73,000	238,000
	5	100,000	113,000	100,000	313,000
	6	132,000	145,000	110,000	387,000
	7	145,000	164,000	143,000	452,000
	8	157,000	182,000	160,000	499,000
	9	169,000	200,000	175,000	544,000
	10	188,000	214,000	207,000	609,000
	11	206,000	232,000	223,000	661,000
	12	182,000	195,000	143,000	520,000
	13	139,000	175,000	127,000	441,000
	14	108,000	138,000	84,000	330,000
	n <sub>j</sub>	15	15	15	N= 45
	Y <sub>j</sub>	1,665,000	1,976,000	1,690,000	Y <sub>..</sub> = 5,331,000

Tabla 10. Valores obtenidos a través de la tabla de ANADEVa con los resultados de las concentraciones de los sobrenadantes de la línea celular Thp-1 con la proteína MICB.

Fuente	g.l.	S.C.	C.M.	F <sub>cal</sub>	F <sub>Teórica</sub>
Tratamiento	2	3,980,933,333.333	1,326,977,776.778	7.747	5.453
Bloques	44	194,341,866,666.667	-----		
Error	28	4,796,400,000	171,300,000.000		
Total	44	203,119,200,000	-----		

Ho: Si las leucemias provocan un estrés fisiológico debido a que se desarrolla un proceso de neotransformación, entonces es posible que los niveles de la proteína MICB en células sean igual a las líneas celulares de leucemia humana.

Ha: Si las leucemias provocan un estrés fisiológico debido a que se desarrolla un proceso de neotransformación, entonces es posible que los niveles de la proteína MICB en células sean diferentes a las líneas celulares de leucemia humana.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

$$H_a: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$$

Prueba de Scheffé

Ecuación

$$S = \sqrt{(K-1)F_{1-\alpha, K-1, gl_{error}} \sqrt{2CM_{error}/n}}$$

Valor obtenido

$$S = 15,782.590$$

Tabla 11. Resultados de los valores absolutos de las diferencias entre  $Y_{.1}$ ,  $Y_{.2}$ ,  $Y_{.3}$

	$Y_{.1}$	$Y_{.2}$	$Y_{.3}$
$Y_{.1}$	---	311,000	25,000
$Y_{.2}$	---	---	-286,000
$Y_{.3}$	---	---	---

Todas las diferencias entre los pares de medias son menores que 15,782.590, por lo que no hay diferencia significativa.

Conclusión: Se concluye que entre la línea celular Thp-1 con la proteína MICB de LMA humana y el control hay una diferencia y entonces se acepta la hipótesis alterna ( $H_a$ ) con un valor de  $F = 5.453$ . Ya que el valor de  $S$  de la prueba de Scheffé es mayor al de cada una de las medias y por lo tanto se corrobora que existe una diferencia entre los valores obtenidos de cada una de las concentraciones.

Tabla 12. Tabla de ANADEVa con los resultados obtenidos de las concentraciones de los sobrenadantes de la línea celular U-937 con la proteína MICA para el diseño de un factor de bloques completos al azar.

		Factor U-937 con MICA			
Días\Conc.		$C_1$	$C_2$	$C_3$	$Y_{.i}$
Bloques (D)	0 (Control)	72,000	88,000	74,000	234,000
	1	19,000	9,000	51,000	79,000
	2	40,000	50,000	80,000	170,000
	3	59,000	69,000	95,000	223,000
	4	83,000	100,000	117,000	300,000
	5	110,000	135,000	130,000	375,000
	6	132,000	182,000	169,000	483,000
	7	165,000	210,000	188,000	563,000
	8	171,000	267,000	227,000	665,000
	9	205,000	293,000	254,000	752,000
	10	238,000	350,000	313,000	901,000
	11	232,000	322,000	298,000	852,000
	12	198,000	276,000	256,000	730,000
	13	174,000	210,000	188,000	572,000
	14	138,000	163,000	145,000	446,000
	$n_j$	15	15	15	$N = 45$
	$Y_{.j}$	2,036,000	2,724,000	2,585,000	$Y_{..} = 7,345,000$

Tabla 13. Valores obtenidos a través de la tabla de ANADEVa con los resultados de las concentraciones de los sobrenadantes de la línea celular U-937 con la proteína MICA.

Fuente	g.l.	S.C.	C.M.	F <sub>cal</sub>	F <sub>Teórica</sub>
Tratamiento	2	17,645,911,111.111	5,881,970,369.370	13.744	5.453
Bloques	44	309,447,111,111.111	-----		
Error	28	11,982,755,556	427,955,555.556		
Total	44	339,075,777,778	-----		

Ho: Si las leucemias provocan un estrés fisiológico debido a que se desarrolla un proceso de neotransformación, entonces es posible que los niveles de la proteína MICA en células sean igual a las líneas celulares de leucemia humana.

Ha: Si las leucemias provocan un estrés fisiológico debido a que se desarrolla un proceso de neotransformación, entonces es posible que los niveles de la proteína MICA en células sean diferentes a las líneas celulares de leucemia humana.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

$$H_a: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$$

Prueba de Scheffé

Ecuación

$$S = \sqrt{(K-1)F_{1-\alpha, K-1, gl_{error}}} \sqrt{2CM_{error/n}}$$

Valor obtenido

$$S = 24,945.886$$

Tabla 14. Resultados de los valores absolutos de las diferencias entre  $Y_{.1}$ ,  $Y_{.2}$ ,  $Y_{.3}$

	$Y_{.1}$	$Y_{.2}$	$Y_{.3}$
$Y_{.1}$	---	688,000	549,000
$Y_{.2}$	---	---	-139,000
$Y_{.3}$	---	---	---

Todas las diferencias entre los pares de medias son menores que 24,945.886, por lo que no hay diferencia significativa.

Conclusión: Se concluye que entre la línea celular U-937 con la proteína MICA de LMA humana y el control hay una diferencia y entonces se acepta la hipótesis alterna (Ha) con un valor de  $F = 5.453$ . Ya que el valor de  $S$  de la prueba de Scheffé es mayor al de cada una de las medias y por lo tanto se corrobora que existe una diferencia entre los valores obtenidos de cada una de las concentraciones.

Tabla 15. Tabla de ANADEVa con los resultados obtenidos de las concentraciones de los sobrenadantes de la línea celular U-937 con la proteína MICB para el diseño de un factor de bloques completos al azar.

		Factor U-937 con MICB			
Días\Conc.		C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	Y <sub>i</sub>
Bloques (D)	0 (Control)	26,000	33,000	35,000	94,000
	1	2,000	3,000	12,000	17,000
	2	26,000	33,000	74,000	133,000
	3	67,000	80,000	97,000	244,000
	4	87,000	136,000	120,000	343,000
	5	113,000	170,000	135,000	418,000
	6	140,000	201,000	172,000	513,000
	7	166,000	250,000	193,000	609,000
	8	179,000	293,000	230,000	702,000
	9	219,000	336,000	260,000	815,000
	10	250,000	423,000	329,000	1,002,000
	11	239,000	390,000	300,000	929,000
	12	219,000	315,000	275,000	809,000
	13	179,000	270,000	191,000	640,000
	14	146,000	201,000	157,000	504,000
	n <sub>j</sub>	15	15	15	N= 45
	Y <sub>.j</sub>	2,058,000	3,134,000	2,580,000	Y <sub>..</sub> = 7,772,000

Tabla 16. Valores obtenidos a través de la tabla de ANADEVa con los resultados de las concentraciones de los sobrenadantes de la línea celular U-937 con la proteína MICB.

Fuente	g.l.	S.C.	C.M.	F <sub>cal</sub>	F <sub>Teórica</sub>
Tratamiento	2	38,603,911,111.111	12,867,970,369.370	15.606	5.453
Bloques	44	442,670,577,777.778	-----		
Error	28	23,086,755,556	824,526,984.127		
Total	44	504,361,244,444	-----		

Ho: Si las leucemias provocan un estrés fisiológico debido a que se desarrolla un proceso de neotransformación, entonces es posible que los niveles de la proteína MICB en células sean igual a las líneas celulares de leucemia humana.

Ha: Si las leucemias provocan un estrés fisiológico debido a que se desarrolla un proceso de neotransformación, entonces es posible que los niveles de la proteína MICB en células sean diferentes a las líneas celulares de leucemia humana.

Ho:  $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$   
 Ha:  $\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$   
 Prueba de Scheffé

Ecuación

$$S = \sqrt{(K-1)F_{1-\alpha, K-1, glerror}} \sqrt{2CM_{error/n}}$$

Valor obtenido

$$S = 34,625.977$$

Tabla 17. Resultados de los valores absolutos de las diferencias entre  $Y_{.1}$ ,  $Y_{.2}$ ,  $Y_{.3}$

	$Y_{.1}$	$Y_{.2}$	$Y_{.3}$
$Y_{.1}$	---	1,076,000	522,000
$Y_{.2}$	---	---	-554,000
$Y_{.3}$	---	---	---

Todas las diferencias entre los pares de medias son menores que 34,625.977, por lo que no hay diferencia significativa.

Conclusión: Se concluye que entre la línea celular U-937 con la proteína MICB de LMA humana y el control hay una diferencia y entonces se acepta la hipótesis alterna (Ha) con un valor de  $F = 5.453$ . Ya que el valor de  $S$  de la prueba de Scheffé es mayor al de cada una de las medias y por lo tanto se corrobora que existe una diferencia entre los valores obtenidos de cada una de las concentraciones.

Tabla 18. Tabla de ANADEVIA con los resultados obtenidos de las concentraciones de los sobrenadantes de la línea celular HL-60 con la proteína MICA para el diseño de un factor de bloques completos al azar.

		Factor HL-60 con MICA			
Días\Conc.		$C_1$	$C_2$	$C_3$	$Y_{.i}$
Bloques (D)	0 (Control)	39,000	30,000	25,000	94,000
	1	8,000	8,000	1,000	17,000
	2	24,000	30,000	10,000	64,000
	3	43,000	56,000	30,000	129,000
	4	62,000	72,000	53,000	187,000
	5	85,000	87,000	83,000	255,000
	6	105,000	113,000	100,000	318,000
	7	119,000	134,000	130,000	383,000
	8	138,000	155,000	154,000	447,000
	9	149,000	176,000	190,000	515,000
	10	165,000	202,000	213,000	580,000
	11	146,000	181,000	195,000	522,000
	12	134,000	150,000	160,000	444,000
	13	119,000	134,000	130,000	383,000
	14	97,000	103,000	100,000	300,000
	$n_i$	15	15	15	$N = 45$
	$Y_{.j}$	1,433,000	1,631,000	1,574,000	$Y_{..} = 4,638,000$



Tabla 19. Valores obtenidos a través de la tabla de ANADEVa con los resultados de las concentraciones de los sobrenadantes de la línea celular HL-60 con la proteína MICA.

Fuente	g.l.	S.C.	C.M.	F <sub>cal</sub>	F <sub>Teórica</sub>
Tratamiento	2	1,385,200,000.000	461,733,332.333	3.435	5.453
Bloques	44	150,447,466,666.667	-----		
Error	28	3,764,133,333	134,433,333.333		
Total	44	155,596,800,000	-----		

Ho: Si las leucemias provocan un estrés fisiológico debido a que se desarrolla un proceso de neotransformación, entonces es posible que los niveles de la proteína MICA en células sean igual a las líneas celulares de leucemia humana.

Ha: Si las leucemias provocan un estrés fisiológico debido a que se desarrolla un proceso de neotransformación, entonces es posible que los niveles de la proteína MICA en células sean diferentes a las líneas celulares de leucemia humana.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

$$H_a: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$$

Conclusión: Se concluye que entre la línea celular HL-60 con la proteína MICA de LMA humana y el control no hay una diferencia y entonces se acepta la hipótesis nula (Ho) con un valor de F= 5.453. Ya que el valor de  $F_{cal} < F_{Teórica}$ , y por lo tanto no se hace la prueba de Scheffé.

Tabla 20. Tabla de ANADEVa con los resultados obtenidos de las concentraciones de los sobrenadantes de la línea celular HL-60 con la proteína MICB para el diseño de un factor de bloques completos al azar.

		Factor HL-60 con MICB			
Días\Conc.		C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	Y <sub>i</sub>
Bloques (D)	0 (Control)	64,000	65,000	48,000	177,000
	1	27,000	18,000	25,000	70,000
	2	45,000	57,000	97,000	199,000
	3	78,000	87,000	120,000	285,000
	4	96,000	110,000	138,000	344,000
	5	119,000	140,000	160,000	419,000
	6	142,000	177,000	202,000	521,000
	7	174,000	208,000	226,000	608,000
	8	188,000	230,000	241,000	659,000
	9	218,000	269,000	277,000	764,000
	10	240,000	318,000	307,000	865,000
	11	222,000	284,000	277,000	783,000
	12	195,000	255,000	258,000	708,000
	13	178,000	216,000	210,000	604,000
	14	165,000	170,000	185,000	520,000
	n <sub>j</sub>	15	15	15	N= 45
	Y <sub>.j</sub>	2,151,000	2,604,000	2,771,000	Y <sub>..</sub> = 7,526,000

Tabla 21. Valores obtenidos a través de la tabla de ANADEVa con los resultados de las concentraciones de los sobrenadantes de la línea celular HL-60 con la proteína MICB.

Fuente	g.l.	S.C.	C.M.	F <sub>cal</sub>	F <sub>Teórica</sub>
Tratamiento	2	13,722,177,777.778	4,574,059,258.259	18.314	5.453
Bloques	44	277,260,977,777.778	-----		
Error	28	6,993,155,556	249,755,555.556		
Total	44	297,976,311,111	-----		

Ho: Si las leucemias provocan un estrés fisiológico debido a que se desarrolla un proceso de neotransformación, entonces es posible que los niveles de la proteína MICB en células sean igual a las líneas celulares de leucemia humana.

Ha: Si las leucemias provocan un estrés fisiológico debido a que se desarrolla un proceso de neotransformación, entonces es posible que los niveles de la proteína MICB en células sean diferentes a las líneas celulares de leucemia humana.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

$$H_a: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$$

Prueba de Scheffé

Ecuación

$$S = \sqrt{(K-1)F_{1-\alpha, K-1, gl_{error}}} \sqrt{2CM_{error/n}}$$

Valor obtenido

$$S = 19,057.116$$

Tabla 22. Resultados de los valores absolutos de las diferencias entre Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>3</sub>

	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>
Y <sub>1</sub>	---	453,000	620,000
Y <sub>2</sub>	---	---	167,000
Y <sub>3</sub>	---	---	---

Todas las diferencias entre los pares de medias son menores que 19,057.116, por lo que no hay diferencia significativa.

Conclusión: Se concluye que entre la línea celular HL-60 con la proteína MICB de LMA humana y el control hay una diferencia y entonces se acepta la hipótesis alterna (Ha) con un valor de F= 5.453. Ya que el valor de S de la prueba de Scheffé es mayor al de cada una de las medias y por lo tanto se corrobora que existe una diferencia entre los valores obtenidos de cada una de las concentraciones.

## X. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Es importante resaltar que al estandarizar la técnica encontramos que las condiciones más adecuadas fueron sustancialmente diferentes a las reportadas en trabajos preliminares como es el caso de que ya se habían realizado estudios con sueros de pacientes con leucemia linfoblástica y mieloide humana<sup>47, 48</sup>.

Al estandarizar la técnica de ELISA y modificar algunas variables, tal fue el caso del tiempo de la primera incubación y la temperatura, la concentración de la leche descremada y la marca del sustrato que sirvió como revelador, nos permitió obtener mejores resultados y que fueran confiables.

La detección de la forma soluble de MICA/MICB en los sobrenadantes (14 días) de líneas celulares de leucemia mieloide humana, se observó que hay un incremento constante en la concentración de las proteínas MICA y MICB conforme avanzan los días hasta llegar a un máximo. Como se observa en la tabla 1 y gráfica 1 los resultados de las muestras de los sobrenadantes obtenidos de la línea celular Thp-1 la concentración de MICA y MICB se incrementa con respecto a los días de cultivo y alcanza un máximo a los 11 días y posteriormente empieza a disminuir su concentración.

También como se observa en la tabla 2 y gráfica 2 los resultados de las muestras de los sobrenadantes a 14 días obtenidos de la línea celular U-937 la concentración de MICA y MICB se incrementa con respecto a los días de cultivo y alcanza un máximo a los 10 días y posteriormente empieza a disminuir su concentración.

Y en los sobrenadantes tomados a 14 días de la línea celular HL-60 se observó en la tabla 3 y gráfica 3 la concentración de MICA y MICB se incrementa con respecto a los días de cultivo y alcanza un máximo a los 10 días y posteriormente empieza a disminuir su concentración.

Cabe hacer notar que esta disminución se presentó ya que existió una saturación de las células y al no tener los nutrientes necesarios empezaron a morir.

Cada uno de los ensayos realizados para cada una de las líneas celulares se realizó por triplicado, pero se muestra únicamente una tabla y una gráfica, ya que los otros dos valores eran muy semejantes.

En la parte estadística se observó que al realizar la tabla de análisis de varianza (ANADEVA) con los resultados de las concentraciones obtenidas de los sobrenadantes de cada línea celular y con las proteínas MICA y MICB, existe una diferencia. Ya que al comparar la  $F_{cal}$  con la  $F_{Teórica}$  a través de la tabla de ANADEVA, podemos observar que la  $F_{cal} > F_{Teórica}$  para la línea celular Thp-1 con la proteína MICA y MICB, para lo cual se acepta la  $H_a$  propuesta y se realizó la prueba de Scheffé, donde se demostró que el valor de  $S$  es mayor al de cada una de las medias de las concentraciones y por lo tanto se corrobora que existe una diferencia entre los valores obtenidos de cada una de las concentraciones y se reafirma la  $H_a$  con lo obtenido en la parte experimental.

En el caso de la línea celular U-937 con la proteína MICA y MICB se realizó lo mismo, se comparó la  $F_{cal}$  con la  $F_{Teórica}$  observando que la  $F_{cal} > F_{Teórica}$  para la línea celular con dichas proteínas, para lo cual se acepta la  $H_a$  propuesta y se realizó la prueba de Scheffé, donde se demostró que el valor de  $S$  es mayor al de cada una de las medias de las concentraciones y por lo tanto se corrobora que existe una diferencia entre los valores obtenidos de cada una de las concentraciones y se reafirma la  $H_a$  con lo obtenido en la parte experimental.

La línea celular HL-60 con la proteína MICA se comparó la  $F_{cal}$  con la  $F_{Teórica}$  observando que la  $F_{cal} < F_{Teórica}$  para la línea celular con dicha proteína, para lo cual se acepta la  $H_o$  propuesta y no se realizó la prueba de Scheffé, ya que esta prueba sirve únicamente para comprobar cuando se acepta la  $H_a$ . Pero con la proteína MICB al comparar la  $F_{cal}$  con la  $F_{Teórica}$  se observó que la  $F_{cal} > F_{Teórica}$  para la línea celular con dicha proteína, para lo cual se acepta la  $H_a$  propuesta y se realizó la prueba de Scheffé, donde se demostró que el valor de  $S$  es mayor al de cada una de las medias de las concentraciones y por lo tanto se corrobora que existe una diferencia entre los valores obtenidos de cada una de las concentraciones y se reafirma la  $H_a$  con lo obtenido en la parte experimental.

## XI. CONCLUSIONES

Por medio de la técnica de ELISA es posible determinar la proteína de estrés fisiológico MICA y MICB en líneas celulares de leucemia mieloide aguda humana.

Se detecto que la concentración de la proteína MICA y MICB conforme se incrementan los días hasta alcanzar un máximo, hay una secreción de dichas proteínas en cada una de las líneas celulares de leucemia mieloide aguda humana como se observa en las tablas y gráficas de cada línea celular. Y a su vez se observa la diferencia en los resultados obtenidos de las concentraciones de los sobrenadantes obtenidos por día comparados con el control.

En el tratamiento estadístico se mostro que efectivamente hay una diferencia entre el control y cada una de las concentraciones obtenidas para lo cual se acepta la  $H_a$  y se rechaza la  $H_o$ . Y para corroborar dicha hipótesis, se utilizó la prueba de Scheffé y la comparación entre  $F_{cal}$  con la  $F_{Teórica}$ .

## XII. REFERENCIAS

1. Cotran, R.S, Kumar V, Collins. Patología estructural y funcional. McGraw-Hill-Interamericana. 6<sup>o</sup> edición. 2000.
2. Lawrence Tierney et al. Diagnostico clínico y tratamiento. Manual Moderno. 35<sup>o</sup> edición. 2000.
3. G.J Ruiz Argüelles. Fundamentos de hematología. Editorial Médica Panamericana. 2<sup>o</sup> edición. 1998.
4. Derek L. Stirewalt, Kenneth J. Kopecky, Soheil Meshinchi, Frederick R. Appelbaum, Marilyn L. Slovak, Cheryl L. Willman, and Jerald P. Radich "FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia". Blood. Ingles. Junio 2001. 97:3589-3595.
5. Abbas A.K., Lichtman A. H., Pober J. S. Inmunología celular y molecular. Ed. McGraw-Hill. Madrid España 1999. pp 63-67, 218- 220.
6. Bahram, S. MIC genes: from genetics to biology. Adv. Immunol. 2000. 76, 1-60
7. Groh V., Rhinehart R., Scecrist H., Vauer S., Grabstein K., and Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived  $\gamma\delta$  Tcells of MICA and MICB. Proc. Natl. Acad.Sci. USA. 1999. Vol.96:6879-6884.
8. Guillermo J. R. Hematología. México: Editorial Panamericana, 2003: 225-245.
9. Patricia C. cocom-Góngora, Mirza C. Los receptores de los linfocitos de la inmunidad innata. Rev. Biomed 20004. 15:113-122.
10. Ando H, Mizuki N, Ota M, Yamazaki M, Ohno S, Goto K, Miyata Y, Wakisaka K, Bahram S and Inoko H. Allelic variants of the human MHC class I chain-related B gene (MICB). Immunogenetics. 1997. 46:499-508.
11. Bahram S and Spies T. The MIC gene family. Non-polimorphic antigen presentation molecules. Res Immunol. 1996a. 147:328-33.
12. Bahram S and Spies T. Nucleotide sequence of a human MHC class I MICB cDNA. Immunogenetics. 1996b. 43:230-33.
13. Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE and Spies T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. 91:6259-63.
14. Bahram S, Mizuki N, Inoko H and Spies T. Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene. Immunogenetics. 1996. 44:80-1.
15. Bahram S, Shiina T, Oka A, Tamiya G and Inoko H. Genomic structure of the human MHC class I MICB gene. Immunogenetics. 1996. 45:161-2.
16. Fischer G, Argüello JR, Pérez-Rodríguez M, McWhinnie A, Marsh SGE, Travers PJ and Madrigal JA. Sequence-specific oligonucleotide probing for MICB alleles reveals associations with MICA and HLA-B. Immunogenetics. 2000. 51:591-9.
17. Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N, Inoko H, Spies T, Theodorou I and Bahram S. Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene. Immunogenetics. 1996. 44:351-7.
18. Fodil N, Pellet P, Laloux L, Hauptmann G, Theodorou I and Bahram S. MICA haplotypic diversity. Immunogenetics. 1999. 49:557-60.
19. Gaudieri S, Leelayuwat C, Townend DC, Mullberg J; Cosman D and Dawkins RL. Allelic and interlocus comparison of the PERB11 multigene family in the MHC. Immunogenetics. 1997. 45:209-16.

20. Gaudieri S, Giles KM, Kulski JK and Dawkins RL. 1997b. Duplication and polymorphism in the MHC: Alu generated diversity and polymorphism within the PERB11 gene family. *Hereditas*. 127:37-46.
21. Rodríguez-Rodero S, Rodrigo L, Fdez-Morera JL, Martínez-Borra J, Lopez-Vázquez A, Fuentes D, et al. MHC class I chain-related gene B promoter polymorphisms and celiac disease. *Hum Immunol*. 2006. 67:208-214.
22. López-Arbesu R, Ballina-García FJ, Alperi-López M, López-Soto A, Rodríguez-Rodero S, Martínez-Borra J, et al. MHC class I chain-related gene B (MICB) is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Rheumatology (Oxford)*. 2007. 46:426-340.
23. Rodríguez-Rodero S, González S, Rodrigo L, Fernández-Morera JL, Martínez-Borra J, López-Vázquez A, et al. Transcriptional regulation of MICA and MICB: a novel polymorphism in MICB promoter alters transcriptional regulation by Sp1. *Eur J Immunol*. 2007.37:1938-1953.
24. Ogasawara K, Hamerman JA, Ehrlich LR, Bour-Jordan H, Santamaria P, Bluestone JA, et al. NKG2D blockade prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Immunity*. 2004. 20:757-767.
25. Saikali P, Antel JP, Newcombe J, Chen Z, Freedman M, Blain M, et al. NKG2D-mediated cytotoxicity toward oligodendrocytes suggests a mechanism for tissue injury in multiple sclerosis. *J Neurosci*. 2007. 27:1220-1228.
26. Bahram, S., Inoko, H., Shiina, T., Radosavljevic, M. MIC and other NKG2D ligands: from none to too many. *Curr Opin Immunol*. 2005. 17, 505-509.
27. Groh, V., Wu, J., Yee, C., Spies, T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*. 2002. 419, 734-738.
28. Molinero, L.L., Domaica, C.I., Fuertes, M.B., Girart, M.V., Rossi, L.E., Zwirner, N.W. Intracellular Expression of MICA in Activated CD4 T Lymphocytes and Protection from NK Cell-Mediated MICA-Dependent Cytotoxicity. *Human Immunology*. 2006. 67, 170-182.
29. Molinero, L.L., Fuertes, M.B., Rabinovich, G.A., Fainboim, L., Zwirner, N.W. Activation-induced expression of MICA on T lymphocytes involves engagement of CD3 and CD28. *J Leukoc Biol*. 2002. 71, 791-797.
30. Kennedy C., Naipian A., Gruis A., Strujik L., Ter S. J., Doxiadis I. N. MICA gene polymorphism is not associated with an creased risk for skin cancer. *The journal of investigative dermatology*. 2002. 118:686-691.
31. Harmening M. Denise. *Clinical hematology and fundamentals of hemostasis*. F.A Davis company. 2edición. 1995.
32. Claudia F.M. Purificación de antígenos específicos de *Leishmania mexicana mexicana*. Usando una columna de intercambio iónico, reconocidos por sueros de pacientes con leishmaniasis. Tesis 2000.
33. R Oscar. *Inmunología (de memoria)*. México: Editorial Panamericana, 1996.
34. Dameshek W., Gunz Frederick. *La Leucemia*. Editorial Científico Médica. 1967. 243-636.
35. <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/LMAinfantil/patient>
36. Martha Dubin, Silvia H. Fernández Villamil, Andrés O.M. Stoppani. Centro de Investigaciones Bioenergéticas, Facultad de Medicina (Buenos Aires), Universidad de Buenos Aires. Volumen 61. No.3. 2001. 61: 343-350
37. Sociedad Iberoamericana de Información Científica. *Current Medicinal Chemistry*:

- Anti-Cancer Agents 4(3):199-230, 2004.
38. Núñez García L. Ortega Soto E. Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas. La diferenciación de células monocíticas thp-1 con vd3 modula la asociación de syk con las proteínas shp-1 y grb2.
  39. Eur J Biochem. La modulación de la producción del factor activador de plaquetas, mediante la incorporación de 1-0-alkilgliceroles naturales en fosfolípidos en células monolitos de leucemia THP-1 1997; 250(2):242-8.
  40. Brodsky, A; Davio, C; Shayo, C; Lemos, B; Barboza, M; Baldi, A; Sanchez Avalos, J. C. Receptores histamínicos H2, AMPc y diferenciación celular leucémica / H2 histaminic receptora, AMPc and leukemia celular differentiation. Hematología (B. Aires); 4(2):57-76, mayo-ago. 2000.
  41. Ríos Pérez M., Millán Pérez Peña, L., Herrera Camacho, I., Torres Márquez, M. Regulación de la expresión del gen de interleucina 10 (il-10) a través de las vías de señalización de  $\text{I} \text{ nf-}\kappa\text{b}$  y la cinasa map p38 en macrófagos U937 estimulados con lps. Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Centro de Química del Instituto de Ciencias. Universidad Autónoma de Puebla.
  42. Figueroa-Robles Víctor Hugo, Ortiz-Lazareno P. Producción de  $\text{fnt-e il-1b}$  en células u937 y su efecto en la expresión de par-2. Laboratorio de inmunología. CUCS. UDG. 2 Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente, Guadalajara, Jalisco, México.
  43. Durfort, M. Vilaró, S. Renau, J y Serratosa, J. Técnicas de Inmunocitoquímica en Microscopía Electrónica. Publicaciones Universidad de Barcelona. 1991. 48-62.
  44. Vilaró, S. Soriano, E. Técnicas de Inmunocitoquímica. Biología Celular. Departamento de Bioquímica y Fisiología. Universidad de Barcelona. 1993. 125-150.
  45. Adams, R.L.P. "Cell culture for biochemists". Col. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, gen. edit. R.H. Burdon y P.H. van Knippenberg. Elsevier. Amsterdam-New York. 1990.
  46. Barnes, D. y Sato, G. "Methods for growth of cultured cells in serum free-medium". Anal. Biochem. 2001. 102: 255-270.
  47. Mendoza- Rincón JF. Human MICA and MICB genes: their biological functions and relevance to infection and cancer. In: Mas Oliva, Jaime. Ninomiya Alarcón, Jesús Guillermo. García Carrancá, Alejandro. Advances in Cancer Research at UNAM. Manual Moderno. 2007. 127-135.
  48. Pacheco Marin, Sergio. Análisis Inmunoabsorbente Unido a Enzima (ELISA) de la Proteína de Estrés Fisiológico MICA en el Suero de Pacientes con Leucemia Linfoblástica y Mieloide Humana. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (UNAM-FESZ), México, D.F. Tesis 2006.



### XIII. APÉNDICE

#### *Preparación de Soluciones*

##### Mezcla de carbonatos

Pesar 2.11g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y 1.68g de  $\text{NaHCO}_3$  y diluir en 100mL de agua destilada. Medir el pH y ajustar a 9.6.

##### Preparación de la proteína (recombinant Human MICA y MICB/Fc Chimera)

1. Tomar 3 $\mu\text{L}$  de la proteína rh MICA y diluirlo en 1497 $\mu\text{L}$  de amortiguador de carbonatos (concentración 100ng).
2. Posteriormente tomar 150 $\mu\text{L}$  de la proteína rh MICA de la concentración de 100ng y diluirlo en 1350 $\mu\text{L}$  de amortiguador de carbonatos (concentración 10ng).
3. Tomar 150 $\mu\text{L}$  de la proteína rh MICA de la concentración de 10ng y diluirlo en 1350 $\mu\text{L}$  de amortiguador de carbonatos (concentración 1ng).
4. Posteriormente tomar 150 $\mu\text{L}$  de la proteína rh MICA de la concentración de 1ng y diluirlo en 1350 $\mu\text{L}$  de amortiguador de carbonatos (concentración 0.1ng).

Se hace lo mismo para rh MICB.

##### PBS 1x.

Cloruro de potasio.....0.2g

Fosfato de potasio monobásico.....0.2g

Cloruro de sodio.....8.0g

Fosfato de sodio monobásico.....2.16g

Disolver en agua destilada y aforar a un litro. Medir el pH y ajustar a 7.2 con NaOH 0.1N. Esterilizar 15 min a 120 lb.

##### PBS-T (0.05%)

Tomar 50 $\mu\text{L}$  de Tween (20) y diluirlo en 100mL de PBS 1X.

##### Leche descremada svelty (1%)

Pesar 0.2g de leche descremada svelty y diluirlo en 20mL de PBS-T (0.05%)

##### Anticuerpo primario (1:100)

Tomar 40 $\mu\text{L}$  de anti-MICA y diluirlo en 4mL de la mezcla leche descremada svelty al 1%.

Tomar 40 $\mu\text{L}$  de anti-MICB y diluirlo en 4mL de la mezcla leche descremada svelty al 1%.

##### Anticuerpo secundario (1:4000)

Tomar 1 $\mu\text{L}$  de HRP/RyM y diluirlo en 4mL de la mezcla leche descremada svelty al 1%.