



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza
(UMIEZ)

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer
Laboratorio de Oncología Celular

Identificación de Receptores de Membrana en las Líneas
Celulares de Cáncer de Cérnix CALO e INBL
Mediante Citometría de Flujo

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

ANAHÍ LETICIA AGUILAR LÓPEZ

Directora de Tesis: M. en C. Rosalva Rangel Corona

Asesor de Tesis: Dr. Benny Weiss Steider



México, D.F. Mayo 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE.

Comunico a usted que la alumna **AGUILAR LÓPEZ ANAHÍ LETICIA**, con número de cuenta **105000376**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **18 de mayo de 2016** a las **15:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE M. en C. CARLOS BAUTISTA REYES

VOCAL M. en C. ROSALVA RANGEL CORONA

SECRETARIO Dr. BENNY WEISS STEIDER

SUPLENTE Dra. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

SUPLENTE Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

El título de la tesis que presenta es: **Identificación de receptores de membrana en las líneas celulares de cáncer de Cérvix CALO e INBL mediante Citometría de Flujo.**

Opción de titulación: Tesis

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
México, D. F., a 21 de abril de 2016

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR



RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VÓ. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Oncología Celular (Lab. 4 P.B.), perteneciente a la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC) de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ) de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FES-Z) en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Bajo la dirección de la M. en C. Rosalva Rangel Corona y asesorado por el Dr. Benny Weiss Steider.

Asimismo, el proyecto contó con el apoyo financiero del programa PAPIIT de la DGAPA, clave del proyecto IN215713. Igualmente, se reconoce la beca otorgada del programa PAPIME de la DGAPA, clave de proyecto PE206615.

México, D.F., Mayo 2016.



“La ciencia es una sola luz, e iluminar con
ella cualquier parte, es iluminar con ella el
mundo entero.” -Isaac Asimov-

“Quiero conocer lo desconocido, investigarlo hasta hacerlo conocido....”

“La ciencia es respecto del alma
lo que es la luz respecto de los ojos,
y si las raíces son amargas, los frutos son muy dulces”
– Aristóteles-



DEDICATORIAS

A mi abuelo “Eulalio López Ramírez” y mi abuela “Josafat Aguilar Marín” quienes no están físicamente presentes, pero permanecerán por siempre en mi corazón, cada que los busco en mi pensamiento vuelven desde donde quiera que se encuentren, por siempre mi amor infinito y agradecimiento pleno.

A mi papá “Enrique Aguilar Aguilar” quien es el hombre que más admiro, amo y respeto. Por enseñarme el valor de ganarse las cosas de la forma correcta, honesta, mirando a las personas de frente y orgullosos de ser quienes somos. Me has enseñado a sonreír y a que no importa el qué dirán, que a las ideas siempre hay que dejarlas volar. Por ser padre y amigo. Por el infinito amor hacia sus hijas. Por educarme de la mejor manera posible y mostrarse fuerte frente al mundo para levantarnos de cualquier escenario difícil, por cuidarme como lo máspreciado que tiene en el mundo. Porque a pesar de verme frágil e inexperta sé que tengo tu apoyo incondicional y sea cual sea mi decisión a futuro, siempre contare contigo. Llevo mucho de ti en mi persona y espero te sientas orgulloso de la hija que hoy te dedica su tesis.

A mi mamá “Leticia López Vicente” por ser la alegría de mi existencia, por aferrarse a la vida y al amor de su familia una y otra vez, por darme ánimos en esos momentos en los que comienzo a desistir, porque sabes escuchar y aconsejarme, por aguantar mi carácter complicado y orgulloso, porque das serenidad a mis pensamientos y porque apoyas cada cosa que se me ocurre, nunca has dudado de mi capacidad y me alientas a seguir con cada paso que doy enorgullecida de la persona soy. Porque me fascina el amor que profesas por la Biología y porque sé que es exactamente lo que yo siento por ella. Por dejarme ser libre y tomar mi rumbo. Pero sobre todo por el amor que desbordas por tu familia.

A mi hermana “Aline Michelle Aguilar López” sabes que tengo el amor más grande y agradezco no ser hija única, porque definitivamente mi vida sería de lo más aburrida sin ti, me inspiras a querer aprender más cosas, a no dejar de soñar y no volverme aburrida, porque contigo me he reído hasta las lágrimas con tus ocurrencias. Llenas de alegría nuestras vidas con tu autentica forma de ser, y a pesar de que eres muy pequeña, aprendo mucho de ti. Eres mi perfecto complemento.

A mi abuelita “Hortencia” porque sé que de ti amor nunca me va a faltar, por ser fuerte y de corazón valiente, que la vida me permita darte más motivos por los cuales enorgullecerte.



AGRADECIMIENTOS

A la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme las circunstancias perfectas para desplegar mi vida académica.

A la ENP N° 2 “Erasmus Castellanos Quinto”, por ser el primer lugar de educación al que pertenecí en la UNAM, sitio donde despertó mi curiosidad por la ciencia y la investigación y que marco sin duda alguna mi formación tanto personal como académica.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; a la carrera de Biología por proporcionarme el conocimiento a través de la guía de mis profesores. Por proporcionarme el espacio y los recursos necesarios para el pleno desarrollo de mi formación como Bióloga.

Agradezco profundamente y sinceramente a mi directora de tesis la Dra. Rosalva Rangel Corona por guiarme en el proceso final para concluir mi carrera, su paciencia, su apoyo incondicional, la confianza otorgada desde el primer momento, por alentarme en los momentos difíciles, por su gran cariño y sobre todo por darme la oportunidad de pertenecer al Laboratorio de Oncología Celular; y abrirme las puertas a este maravilloso mundo de la investigación científica.

Al Dr. Benny Weiss Steider y la Dr. María Teresa Corona Ortega por sus lecciones, experiencias y apoyo para la realización de este trabajo

A Don José Chavarría (Don Joe), nuestro genial técnico de laboratorio por su compromiso, dedicación y esfuerzo.

A mis compañeros del laboratorio, por las tardes de jugar cartas y de películas, pero sobre todo por el ambiente creado en laboratorio, tan buena vibra, lleno de risas y amistad. Santa, Sergio, Ángel, Marco, Itzel, Carmen, “La China”, José Carlos y obviamente no puedo dejar de mencionar a Isaac, quien la vida me lo presentó hace años como conocido y ahora es parte de mis más queridos amigos.

Al profesor Edgar Torres, por darme siempre sus mejores consejos, ayuda, amistad y alentarme para concluir mi trabajo.



A mis amigos del Lab. 9., el Dr. Arturo Valle Mendiola, Mary, Fer (niño), Vladimir y Roberto por adoptarme como si fuera de su laboratorio y hacerme parte de tantos momentos; mi estancia en la UMIEZ no hubiese sido la misma sin su presencia. Pero sobre todo a mi amiga Fernanda, por darse la oportunidad de conocerme como persona, por compartir maneras similares de pensar, de ver la vida y siempre coincidir en nuestro amor y devoción hacia la ciencia.

A mis amigos de la carrera Aurora, Eric, Julio por la gran amistad que logramos consolidar a lo largo de estos años, agradezco su presencia en el transcurso de este tiempo y hacer más amena y divertida nuestra de vida de estudiantes.

A Saúl, porque con el inicio mi entrenamiento Jedi en el laboratorio, quien me apoyo en cada momento y nunca me dejo caer ni rendirme, en el encontré un amigo como pocos, porque de él aprendí a ser más perseverante, más crítica, más responsable y como siempre nos repetimos para darnos ánimos “!!!Que nada nos detenga 1, 2, 3 TRAIL!!!”

A Fernando por tolerarme y quererme tal como soy, con mis constantes cambios de humor y a veces no tan atinadas actitudes y comentarios, gracias por ser siempre sincero, darme tu afecto incondicional, por cuidarme, quererme y aconsejarme en los momentos alegres y sobre todo en los más difíciles. Además siempre supimos superar las diferencias y malos entendidos. Pocas personas me conocen tanto como tú, y aun así te empeñas en seguir siendo mi amigo.

A mis mejores amigas Rubí y Brenda por saber cultivar y valorar nuestra amistad, por tantos y tantos momentos inolvidables que pase con cada una de ustedes y aun mejor con ambas, ninguna de ustedes me ha faltado en momento difíciles, agradezco sus palabras de aliento para animarme y hacerme fuerte frente a esas situaciones, porque a pesar de mi poca capacidad de expresar mi afecto no tienen duda alguna del inmenso cariño que tengo por ambas, por los momentos en lo que me aislé y pedí tiempo para estar sola, por saber entender y aceptar mis decisiones, me considero afortunada de contar con su cariño e invaluable amistad.

A Monse, Kari, Mara, Sol, Sarah porque en ustedes descubrir lo bien que pueden mezclarse personalidades distintas, formas de ver el mundo, de llevar acabo su vida, sentir, pensar y amar. Definitivamente ustedes complementan mi vida. Juntas sobrellevamos mejor las adversidades y los instantes se colman de diversión, risas y locuras.



A Marco Vásquez por todo lo que hemos pasado juntos en este tiempo, por su cariño absoluto, porque ha demostrado con más de una manera lo importante que soy, por estar presente desde el inicio de este proceso, por dejarme ser tal como soy, y no imponerme ideas, ni cortarme las alas de luchar por mis sueños y aferrarme a ellos, por mostrarme el valor de la confianza y la libertad. Por ser una persona muy especial en mi vida y por crear esta historia que es de otro mundo.

A todos aquellos que forman parte de mi vida, gracias por las experiencias, las muestras de cariño recibidas, los consejos, las risas, las palabras de aliento, por cada momento.

A la vida por darme a los mejores padres que una Anne puede tener, Leticia y Enrique, gracias por su esfuerzo, amor y dedicación, valoro admiro y respeto cada enseñada dada, nunca terminare de corresponder y compensar tanto amor, solo puedo decir que me siento realmente bendecida de contar con tan extraordinarias personas que se complementan perfecto el uno al otro y le dan total equilibrio y felicidad a mi vida.

A Michito, mi hermanita, porque desde el momento en que llego a mi vida nunca más estuve sola, y mis días se llenaron de luz, inmensas alegrías, eres mi persona favorita en el mundo, te admiro por la gran madurez con la que has afrontado tantas y tantas cosas, y más que cuidarte yo a ti, la que siempre me protegió de desistir en cualquier momento fuiste tú, con tu inmenso amor y actitud positiva, mucho de todo lo que me impulso a seguir fuiste tú y tu bienestar. Siempre juntas y fuertes.

A Dios y a mi familia por darle fuerza, sentido y convicción a mi vida. Gracias por el amor incondicional y desmedido.



ÍNDICE

ABREVIATURAS	10
RESUMEN	12
1. MARCO TEÓRICO.....	14
1.1. CÁNCER	14
1.2. CÁNCER CÉRVICO UTERINO (CaCu)	16
1.3. VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)	22
1.4. SISTEMA INMUNOLÓGICO	27
1.4.1. INMUNIDAD INNATA	29
1.4.2. INMUNIDAD ADAPTATIVA	31
1.4.3. INMUNIDAD CELULAR	33
1.4.4. INMUNIDAD HUMORAL	35
1.5. ANTICUERPOS	36
1.6. FAMILIA DE RECEPTORES Fc	41
1.6.1. FcγRIII o CD16	49
1.6.2. FcRn	51
1.7. INMUNOVIGILANCIA TUMORAL	53
1.8. INMUNOTERAPIA.....	57
1.8.1. INMUNOTERAPIA DEL CÁNCER CÉRVICO UTERINO	58
1.8.2. CITOCINAS	59
1.8.3. IL-2	60
2. ANTECEDENTES DIRECTOS	63
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	64
4. HIPÓTESIS	65
5. OBJETIVOS.....	66
5.1. OBJETIVO GENERAL	66
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES	66
6. METODOLOGÍA	67
6.1. MATERIAL BIOLÓGICO	67
6.1.1. LINEAS CELULARES DE CaCu	67
6.2. CONDICIONES DE CULTIVO Y PROLIFERACIÓN CELULAR	67
6.3. TRATAMIENTO CELULAR CON IL.2 RECOMBINANTE	68



6.4. OBTENCION DE CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS	68
6.5. CITOMETRÍA DE FLUJO	69
7. RESULTADOS	70
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	76
9. CONCLUSIONES	79
10. PERSPECTIVAS.....	80
11. BIBLIOGRAFÍA	81
APÉNDICE	86



ABREVIATURAS

APC: Células Presentadoras de Antígenos
BCR: Complejo Receptor de Antígeno
CaCu: Cáncer Cérvico Uterino
CCDA: Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos
CI: Complejos Inmunes
CTL: Linfocitos T citotóxicos
DC: Células dendríticas
DNA: Acido Desoxirribonucleico
E: Región Temprana
EC: Estadios Clínicos
FcR: Receptores para las Regiones Constantes de los anticuerpos
FcRn: Receptor Neonatal para la Fracción Cristalizable
FcR γ : Receptores Fc gamma
FIGO: Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia
GM-CSF: Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos Granulocitos
GPI: Glicosilfosfatidilinositol
ICAM-1: Moléculas de Adhesión Intercelular 1
ICTV: Comité Internacional en Taxonomía de Virus
IFN- γ : Interferón gamma
Ig: linmunoglobulina
IgA: linmunoglobulina A
IgE: linmunoglobulina E
IgG: linmunoglobulina G
IgM: linmunoglobulina M
IL-10: Interleucina 10
IL-12: Interleucina 12
IL-2: Interleucina 2
IL2-R: Receptor de IL-2
IL-4: Interleucina 4
IL-6: Interleucina 6
IMF: Intensidad Media de Fluorescencia
INF α : Interferón alfa
ITAM: Motivos de Activación en Inmunorreceptores basados en Tirosina
ITIM: Motivos de Inhibición en Inmunorreceptores basados en Tirosina
KDa: Kilodaltones
L: Región Tardía



LAK: Linfocitos Asesinos Activados por Linfoquinas
LCR: Región Larga de Control
LEI: Lesiones Escamosas Intraepiteliales
LMC: Leucemia Mielocítica Crónica
LPS: Lipopolisacarido
LSPH: Linfocitos de Sangre Periférica Humana
MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad
NIC: Neoplasias Intraepiteliales Cervicales
NK: Linfocitos Citolíticos Naturales
pH: Potencial Hidrógeno
PMN: Neutrófilos Polimorfonucleares
PV: Papillomarivus
QT-RT: Quimioterapia y Radioterapia
RNA_m: Ácido Ribonucleico mensajero
SFB: Suero Fetal Bovino
T CD4⁺: Linfocitos Cooperadores
T CD8⁺: Linfocitos Citóxicos
TCR: T-Cell Receptor ó Receptor de Linfocito T
TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante- β
TIL: Linfocitos Infiltrantes de Tumores
UEC: Unión Escamo Columnar
UI/ml: Unidades Internacionales/ mililitro
VPH: Virus de Papiloma Humano
VPHAR: Virus del Papiloma Humano de alto riesgo oncogénico
VPHBR: Virus de Papiloma Humano de bajo riesgo oncogénico



RESUMEN

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células malignas que poseen alteraciones irreversibles en su material genético, estas células derivan de tejidos normales que han sufrido transformaciones y que incitan a una proliferación incontrolada asociada a cambios en el metabolismo y la diferenciación celular, dichas células transformadas invaden tejidos vecinos y con frecuencia colonizan sitios distantes al tejido de origen, fenómeno conocido como metástasis. Puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. Este padecimiento es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial de manera que es indispensable sumar esfuerzos que conlleven a descubrir alternativas terapéuticas para su tratamiento, un porcentaje importante de cánceres pueden curarse mediante cirugía, radioterapia o quimioterapia, especialmente si se detectan en una fase temprana.

El Cáncer Cérvico Uterino (CaCu) es un problema importante de salud pública en nuestro país, ya que constituye una de las principales causas de muerte entre la población femenina mexicana. Su desarrollo se asocia etiológicamente con la infección por Virus de Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo. No obstante, otros factores ambientales e intrínsecos del huésped, pueden contribuir al proceso carcinogénico del VPH. Esta enfermedad puede ser prevenida con detección y tratamiento oportuno; sin embargo, frecuentemente es detectada en estadios avanzados.

Los tratamientos existentes para combatir el CaCu son eficientes en estadios tempranos de la enfermedad y/o tumores únicos, sin embargo en estadios avanzados o en pacientes con metástasis resultan ser ineficientes. Además de ser agresivos y poco selectivos, generando efectos secundarios que son perjudiciales para el paciente. Por tal motivo hoy en día se ha generado un nuevo interés por la búsqueda de nuevas alternativas contra esta patología que presente una mayor selectividad entre células normales y células transformadas. Al respecto la inmunoterapia se ha empleado a lo largo de estas dos últimas décadas como alternativa terapéutica para este padecimiento, ya que posee ventajas sobre la terapia convencional, como la especificidad. En particular nuestro grupo de trabajo se ha especializado



en el uso de la citocina Interleucina 2 (IL-2) recombinante que es un conocido agente antitumoral, ya que estimula células NK y linfocitos T para inducir una respuesta citotóxica de rechazo tumoral. El Laboratorio de Oncología Celular de la FES-Z ha demostrado que las células de CaCu responden de manera diferencial a IL-2 dependiendo de la concentración utilizada, ya que proliferan a bajas dosis y son inducidas a apoptosis a altas. Otro resultado que ha llamado la atención consiste en que diversos anticuerpos estimulan la proliferación de las células de CaCu, lo que nos ha dado indicios de la presencia de receptores Fc en estas células. Al respecto se ha publicado que las células epiteliales normales del cérvix expresan los receptores para Fc γ RIII (CD16) y FcRn.

En los últimos años se ha trabajado arduamente para esclarecer los mecanismos moleculares que regula IL-2 para inhibir o estimular la proliferación de las líneas de CaCu; CALO e INBL. Resultados previos indican que IL-2 induce la regulación diferencial de RNA mensajero (RNAm) de algunos genes que pueden estar involucrados con la transformación maligna de las células de CaCu. En consecuencia el presente estudio tuvo como finalidad analizar la posible expresión de los receptores FcRn y Fc γ RIII (CD16) en las células de CaCu de las líneas CALO e INBL y si ésta expresión puede ser estimulada con IL-2.



1. MARCO TEÓRICO

1.1 Cáncer

Cáncer es un término utilizado para agrupar a más de 100 enfermedades, potencialmente fatales y de origen multifactorial, todas ellas, son el resultado de una continua e irregular proliferación de células en algún órgano o tejido del organismo. Dichas células en esencia, dejan de responder a las señales apropiadas que controlan su funcionamiento normal, a través de la desregulación de los mecanismos de proliferación y muerte propios, ocasionando la continua multiplicación, que si no se detecta y detiene, puede invadir tejidos adyacentes y eventualmente esparcirse a órganos distantes dentro del organismo, provocando la muerte. La pérdida del control en dichos procesos de crecimiento es resultado de la acumulación de múltiples anomalías en el genoma celular, provocadas por múltiples etiologías y es reflejado en diversos aspectos del comportamiento de las células afectadas (Cooper, 2007).

Existen características fundamentales para definir a una célula tumoral, como lo son el mantenimiento de señales proliferativas, inmortalidad inducción de invasión y metástasis, evasión de supresores de crecimiento, inducción de angiogénesis y resistencia a la muerte entre otras (Figura 1.).

Su diversa etiología y la gran variedad de tipos celulares que pueden ser afectados por este padecimiento, provocan todo un desafío para el sector salud a nivel mundial incidiendo directamente en la investigación y desarrollo de terapias o tratamientos que controlen o eliminen este mal.

El cáncer es un problema de salud a nivel mundial, ya que es la principal causa de muerte en países desarrollados económicamente y la segunda causa de muerte en países en vías de desarrollo. La incidencia de esta enfermedad se ve incrementada en países en vía de desarrollo como resultado del envejecimiento y crecimiento de la población, así como, cada vez más la adopción de estilos de vida asociados con esta enfermedad, como el tabaquismo, alcoholismo y una mala alimentación. (Jemal *et al*, 2011).



Figura 1. Conjunto de ventajas adquiridas por las células tumorales durante el desarrollo cancerígeno. (Modificado de Hanahan, D. & R.A. Weinberg, 2011)

Entre las enfermedades crónicas degenerativas el cáncer, actualmente ocupa el tercer lugar como causa de muerte en México, sólo superado por enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus. Desde hace dos décadas México atraviesa por una transición epidemiológica relacionada con la disminución de las enfermedades infecciosas y el aumento en la frecuencia de enfermedades crónico-degenerativas. En esta transición contribuye la transformación de las zonas rurales en urbanas, cambios económicos, demográficos y ambientales (Stevens *et al.* 2008) se asocian los cambios en la dieta y sedentarismo, mejor acceso a los servicios de salud y mayor esperanza de vida (Compendio del Registro Histopatológico de las Neoplasias Malignas en México. Secretaría de Salud. Dirección General de Epidemiología; 1998). Dentro de los cambios en el estilo de vida figuran el aumento del tabaquismo y alcoholismo, en el consumo de alimentos con alto contenido de grasas saturadas y transmisión de



enfermedades virales y bacterianas (Meneses *et al.* 2012). También intervienen defectos de los genes que reparan el ADN. Los genes que promueven el crecimiento normal de la célula se denominan protooncogenes y la activación de dichos genes por mutación puntual, amplificación o alteración de la regulación, los convierte en oncogenes que promueven la proliferación del cáncer. A pesar de que todos los cánceres son genéticos, no todos son hereditarios (Guyton, 2001). Si bien se suele hacer referencia a esto como cáncer hereditario, lo que se hereda no es el cáncer en sí, sino el gen anormal que puede ocasionar el cáncer.

El resultado de la interacción de factores genéticos y externos (físicos, químicos y biológicos) produce la degeneración de las células, con lo que se originan lesiones precancerosas y finalmente tumores malignos. Dichos tumores suelen estar localizados, pero eventualmente pueden diseminarse a otros órganos. (INEGI, 2013).

De manera normal el sistema inmune controla la proliferación de células potencialmente cancerosas, es capaz de reconocer las proteínas anómalas que sintetizan las células tumorales e identificarlas como extrañas (Soler-Gómez, 2007). Aquellas células tumorales reconocidas se eliminan y algunas células son capaces de evadir la respuesta antitumoral y sobrevivir. De esta manera, el desarrollo de un tumor involucra una serie de procesos de control por parte del hospedero para reducir el crecimiento tumoral el cual, además de escapar a este proceso, se adapta al microambiente adquiriendo resistencia a las células inmunológicas efectoras (Rangel- Corona, 2003.)

1.2 Cáncer Cérvico Uterino (CaCu)

El CaCu es una enfermedad multifactorial, que se desarrolla generalmente en la zona de transformación de la unión escamo columnar del cuello uterino, a partir de lesiones precursoras después que ha ocurrido una infección por el VPH, en presencia de otros cofactores: genéticos y ambientales (Murphy *et al.* 1995). Este tipo de cáncer se ha convertido en el más común de los cánceres del aparato genital femenino en Europa y



E.U y es el cuarto en incidencia en la mujer después del cáncer de mama, pulmón y colon (Sanabria *et al.* 2011).

El CaCu continua siendo un problema de salud en todo el mundo, en el año 2008 representó el 9% de las neoplasias malignas en mujeres a nivel mundial (529, 800 casos) y 8% (275, 100) de las muertes por cáncer en mujeres (DiSaia; 2002). En México, el registro histopatológico de neoplasias malignas del año 2003 mostró una incidencia de 24, 094 casos de CaCu invasor y 14, 867 casos de carcinoma *in situ*. (Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas, 2003). Pese a los modelos de prevención contra este tipo de padecimiento, se le atribuye el segundo lugar con mayor incidencia en México y es la tercera causa de muerte a nivel mundial. Desafortunadamente afecta a mujeres con desventaja económica, social y cultural y por ende, es mucho más común en países en vías de desarrollo donde ocurre el 85% de los casos. En contraste en países desarrollados ocurre únicamente el 3.6% de nuevos casos. Este padecimiento es uno de los problemas de salud más importantes en la población femenina mexicana, a pesar de que los servicios de salud han concentrado los esfuerzos preventivos y de atención sobre los aspectos reproductivos; figura como una prioridad nacional, ya que al año mueren alrededor de 5, 000 mujeres por esta causa no obstante, que la tasa de mortalidad en la última década ha ido en descenso, este padecimiento persiste como un problema prioritario de salud pública (Gómez y Vázquez *et al.* 2003)

El cérvix normal se compone de diferentes tipos de células epiteliales, el canal cervical medio y el cérvix superior están compuestos por epitelio columnar secretor (Yoshikazu *et al.* 2003). La vagina y el ectocérvix distal están compuestos de epitelio escamoso (Warren *et al.* 2009).

La Unión Escamo Columnar (UEC) es el punto donde las células escamosas y columnares se encuentran. Esta unión se encuentra típicamente entre el ectocérvix central y el canal cervical inferior, pero la localización varia a lo largo de la vida de la mujer. La Unión Escamo Columnar original es una zona de transformación. La transformación normal de un tipo celular maduro en otro es llamada metaplasia. Cuando la metaplasia ocurre, existe un potencial neoplásico (Chavaro *et al.* 2009).



En las mujeres en edad reproductiva, la UEC se mueve hacia afuera por influencia hormonal. El pH ácido vaginal provoca irritación mecánica que induce el proceso de metaplasia escamosa, resultando una nueva UEC. Esta área entre la original y la nueva UEC es referida como la zona de transición. Las células escamosas inmaduras metaplásicas en esta zona de transición son teóricamente las más vulnerables a neoplasia (Warren *et al.* 2009).

La mayoría de los carcinomas de células escamosas se originan en la UEC. En mujeres jóvenes la UEC es localizada fuera del orificio cervical externo y el tumor tiende a crecer hacia afuera (crecimiento exofítico), en contraste, en pacientes con mayor edad, la UEC es localizada en el canal cervical, por lo que el cáncer cervical tiende a crecer hacia adentro, a lo largo del canal cervical (crecimiento endofítico). Las células de reserva en la unión escamo columnar han sido vigiladas con interés como origen del adenocarcinoma cervical. Sin embargo, la mayoría de los adenocarcinomas cervicales surgen en la Unión Escamo Columnar (Jhingran *et al.* 2008).

Se reconocen dos tipos histológicos principales de cáncer de cuello uterino: el epidermoide, espinocelular o de células escamosas y el adenocarcinoma. El primero se origina en el epitelio plano estratificado que recubre el ectocérnix y el segundo en el epitelio cilíndrico que tapiza el canal endocervical. El resto lo constituyen carcinomas adenoescamosos y carcinomas de células pequeñas, los cuales son relativamente raros (De Ruiz & col., 2000).

El CaCu es una alteración celular que se origina en la zona de transformación escamo columnar del cérvix uterino y es precedido e implica la progresión gradual hacia diferentes etapas pre malignas conocidas como Neoplasias Intraepiteliales Cervicales (NIC) o Lesiones Escamosas Intraepiteliales (LEI) de bajo o de alto grado (Figura 2) (Serman, 2002). El cáncer puede evolucionar *in situ* (circunscrito a la superficie epitelial) o ser cáncer invasor (que traspasa la membrana basal).

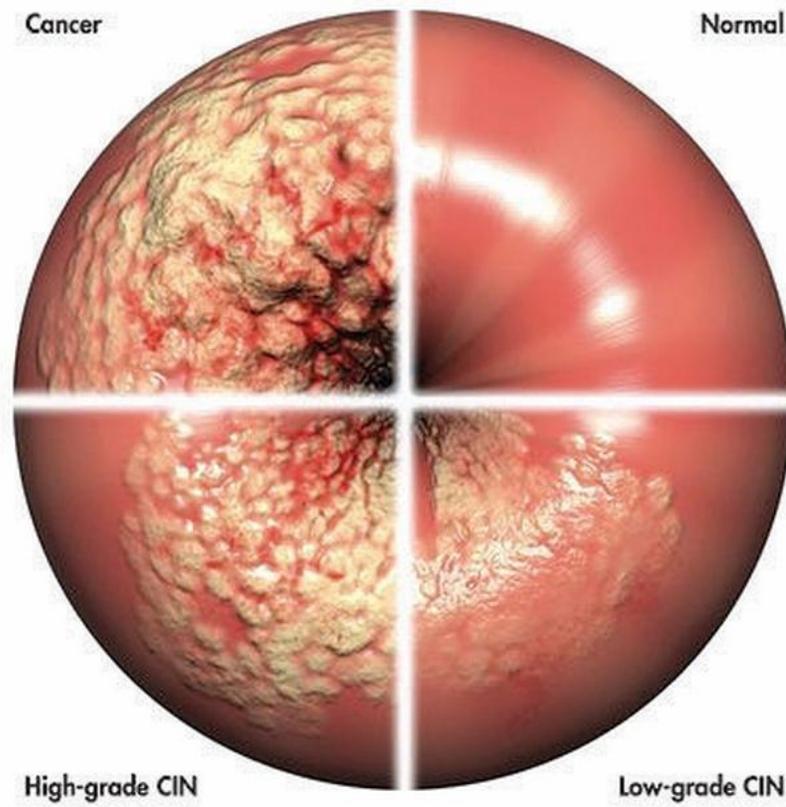


Figura 2. Cuello uterino mostrando un estado normal, lesiones de alto y bajo grado (NIC) y cáncer (Tomado de www.nlm.nih.gov).

El CaCu está actualmente estatificado de acuerdo a los lineamientos de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) (Pecorelli *et al.* 2009). Dueñas *et al.*, 2010) (Tabla 1). En términos de tratamientos, el CaCu puede dividirse en tres grandes grupos: estadios clínicos (EC) tempranos desde IA1 (enfermedad microinvasiva) hasta el IIA1 (tumores que miden <4cm sin invasión parametrial), los cuales usualmente son tratados con procedimientos quirúrgicos logrando supervivencias hasta el 90%, en el CaCu localmente avanzado que puede ser considerado desde estadios clínicos IB2/IIA2 a IVA, la QT-RT (quimioterapia y radioterapia) es el tratamiento de elección alcanzando un 60-80% de supervivencias dependiendo del EC; sin embargo, existen instituciones donde se emplea en forma rutinaria como tratamiento primario la cirugía en EC IB2-IIA2. En la enfermedad avanzada o metastásica considerada EC IVB, recurrente o



persistente las pacientes tienen poca probabilidad de supervivencia y oscila con los mejores tratamientos del 15-30% y consistente en tratamientos de quimioterapia paliativa y otros tratamientos como blancos moleculares (Dueñas *et al.* 2010).

Existen varios factores que participan en la inducción de la transformación neoplásica, actuando como carcinógenos, lo cuales alteran el ciclo celular por interacción con varias proteínas reguladoras (Ministerio de Salud, 2004). Se considera que el principal factor implicado en el desarrollo del CaCu es el VPH. Actualmente es conocido, que en más del 99% de los casos se detecta la presencia de secuencias virales de algún tipo de VPH, con lo que se puede asegurar el papel causal que tiene dicho virus en el desarrollo del este tipo de cáncer (Alarcón, 2006).

ESTADIO	CRITERIOS
CARCINOMA DE ESTADIO I	Se limita estrictamente al cuello uterino. No se debe tomar en cuenta la extensión al cuerpo uterino. El diagnóstico de los estadios IA1 y IA2 debe hacerse a partir de los exámenes microscópicos de un tejido extirpado, preferentemente un cono, que rodee la lesión entera
ESTADIO IA	Cáncer invasor identificado a través de un examen microscópico únicamente. La invasión se limita a la invasión del estroma medida con un máximo de 5 mm de profundidad y 7 mm de extensión horizontal.
ESTADIO IA1	La invasión medida en el estroma no supera 3 mm de profundidad y 7 mm de diámetro.
ESTADIO IA2	La invasión medida en el estroma está entre 3 y 5 mm de profundidad y no supera 7 mm de diámetro.



ESTADIO IB	Las lesiones clínicas se limitan al cérvix, o las lesiones preclínicas son mayores que en el estadio IA. Toda lesión macroscópicamente visible incluso con una invasión superficial es un cáncer de estadio IB
ESTADIO IB1	Lesiones clínicas de tamaño máximo de 4 cm
ESTADIO IB2	Lesiones clínicas de tamaño superior a 4 cm
CARCINOMA DE ESTADIO II	Se extiende más allá del cérvix, pero sin alcanzar las paredes pelvianas. Afecta la vagina, pero no más allá de sus dos tercios superiores
ESTADIO IIA	Ninguna afección parametrial evidente. La invasión afecta los dos tercios superiores de la vagina
ESTADIO IIB	Afección parametrial evidente, pero la pared pelviana no está afectada.
CARCINOMA DE ESTADIO III	Se extiende hacia la pared pelviana. En el examen rectal, todas las zonas están invadidas por el cáncer entre el tumor y la pared pelviana. El tumor afecta el tercio inferior de la vagina. Todos los cánceres con una hidronefrosis o una disfunción renal son cánceres de estadio III
ESTADIO IIIA	Ninguna extensión en la pared pelviana, pero afección del tercio inferior de la vagina.
ESTADIO IIIB	Extensión a la pared pelviana, hidronefrosis o disfunción renal.
CARCINOMA DE ESTADIO IV	Se extiende más allá de la pelvis verdadera o invade la mucosa de la vejiga y/o del recto



ESTADIO IVA	Extensión del tumor a los órganos pelvianos cercanos
ESTADIO IVB	Extensión a los órganos distantes

Tabla 1. Clasificación estadificada dependiendo el grado de invasión que presenta el carcinoma, de acuerdo a los siguientes criterios establecidos por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO).

1.3 Virus Del Papiloma Humano (VPH)

Un importante papel en la etiología del varios cánceres es jugado por un factor viral como los virus oncogénicos, tal como el VPH. Aproximadamente el 20% de los cánceres humanos están asociados con infecciones virales (Howley *et al.* 2006).

Los *papilomavirus* son un grupo grande de pequeños virus de DNA sin envoltura, que pueden inducir tumores en el epitelio escamoso (verrugas y papilomas) en varios sitios anatómicos distintos. Una fuerte correlación entre VPH y CaCu (Bosch *et al.* 2013) pene, vulva, vagina, ano, cavidad oral y orofaríngea, laringe ha sido registrada por la Agencia Internacional para la Investigación sobre Cáncer. De los aproximadamente 12.7 millones de nuevos casos de cáncer ocurridos en 2008 en todo el mundo, 4.8% eran atribuibles a la infección por VPH.

En 1977, Harald zur Hausen publicó una hipótesis de que el VPH juega un papel importante en la causa de CaCu. (zur Hausen *et al.* 1977). En 1983 y 1984 zur Hausen y sus colaboradores identificaron a los HPV 16 y HPV 18 en el CaCu (Gissmann *et al.* 1984) y en el curso de los próximos 12 años de investigación se ha reconocido como un carcinogénico que influye en su desarrollo.

De acuerdo a recomendaciones recientes del Comité Internacional en Taxonomía de Virus (ICTV) (<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>) este virus pertenece a la familia *Papillomaviridae*, la cual contiene 29 géneros (30 géneros de acuerdo con ICTV) formados por 189 tipos de Papillomarivirus (PV) aislados de humanos (120 tipos), mamíferos no humanos, aves y reptiles (64, 3 y 2 tipos respectivamente) (Bernard *et al.*;

2010) ampliamente distribuidos en la naturaleza e infectan específicamente el epitelio escamoso (López y Lizano, 2006).

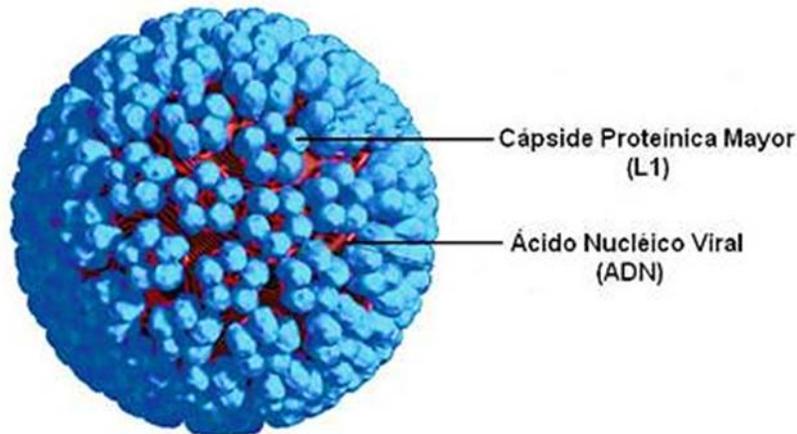
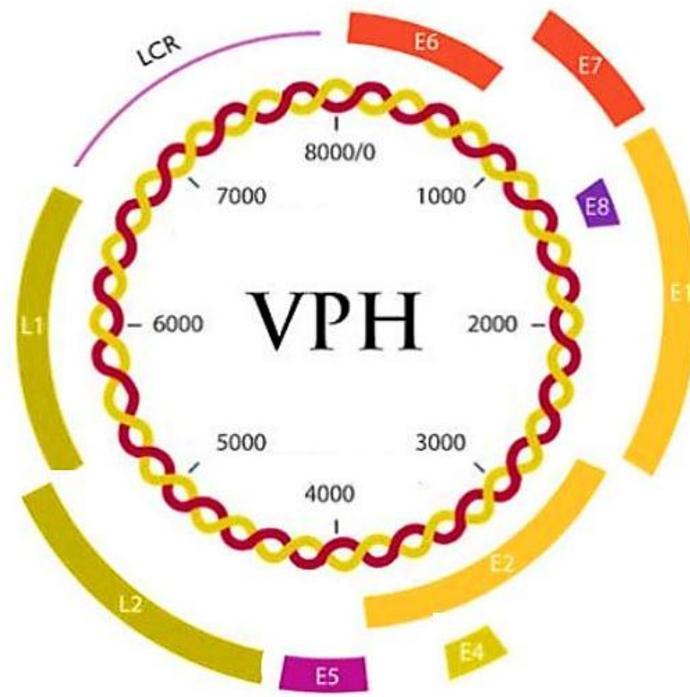


Figura 3. Virus del Papiloma Humano. Muestra ADN circular de doble cadena protegido por una cápside proteica. (Tomado de <http://webcindario.com/31.html>).

EL VPH (Figura 3) no posee envoltura, mide de 45 a 55 nm de diámetro, con una cápside icosaédrica formada por 72 capsómeros que encierran un genoma de DNA circular de doble cadena y que se replica en el núcleo de las células epiteliales escamosas (Burd, 2003). La cápside del virión está formada por 2 proteínas. La proteína L1 es el elemento estructural primario la cual tiene un peso molecular aproximado de 55 kilodaltones (KDa) y representa aproximadamente el 80% del peso y la proteína L2 que posee un peso molecular de 70KDa (Urbano *et al.* 2007). Esta proteína interviene en la entrada del virus a las células, en la localización de los componentes virales en el núcleo, en la unión al ADN, en la formación de la cápside y en la estabilidad (Martinic *et al.* 2008).



circular del Virus del Papiloma Humano mostrando la disposición de las proteínas no estructurales (región no temprana) E1, E2, E4, E5, E6 y E7. (Tomado de López *et al.* 2006).

El genoma del VPH (Figura 4) está formado por 8 000 pares de bases, y todos los virus del papiloma comparten la misma organización genómica. Desde el punto de vista funcional, el genoma se divide en 3 regiones: una reguladora denominada región larga de control (LCR), que tiene secuencias para la replicación y la transcripción; una región temprana (E) que codifica para proteínas involucradas en la replicación viral (E1), la regulación de la transcripción (E2) y la transformación celular (E6, E7, E5); y por último, una región tardía (L) que codifica para las proteínas estructurales que conforman la cápside (L1 y L2) (Tabla 2) (Münger *et al.* 2004).



PROTEINAS	CARACTERISTICAS
E1	Codifica una helicasa para la replicación del ADN viral
E2	Regula la expresión temprana de los genes E6 y E7, facilitando la replicación del virus.
E4	Permite el ensamblaje viral y altera el citoesqueleto para facilitar la liberación del virus.
E5	Altera el pH endosomal y el reciclamiento de receptores de (EGF) a la superficie celular.
E6	Inactiva la función de p53 e inhibe la apoptosis
E7	Se une a pRB y reactiva la síntesis de ADN huésped
L1	Constituye el 95% de la cápside (cubierta viral)
L2	Constituye el 5% de la cápside viral.

Tabla 2. Función de las proteínas virales del VPH (tomado de Cid- Arregui, 2009)

Hoy en día se conocen más de 100 tipos diferentes de VPH, clasificados de acuerdo con su potencial para inducir transformaciones malignas en: bajo, intermedio y alto riesgo (Schiffman *et al.* 2007). Se catalogan en cutáneos y mucosos. Los tipos de VPH mucosos asociados con lesiones benignas (tipos 6 y 11 principalmente) son conocidos como tipos de “bajo riesgo” y se encuentran preferentemente en los condilomas acuminados, mientras que aquellos tipos asociados a lesiones malignas (tipos 16, 18, 30, 31, 33, 35, 45, 51 y 52, principalmente) son conocidos como virus de “alto riesgo” (Castellsagué *et al.* 2008). Entre ellos, los VPH 16 y 18 son los oncogénicos más comunes, que causan aproximadamente el 70 % de los CaCu en todo el mundo (Castro *et al.* 2006).

Los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 50, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 64, 66, 68, y 70 son considerados como VPH de alto riesgo oncogénico (VPHAR), debido a que están altamente asociados a carcinomas y displasias (Motoyama, *et al.* 2004. Burd, 2003). Por otra parte los virus tipos 6, 11, 70, 72, 81 y 89 son considerados como VPH de bajo riesgo oncogénico (VPHBR) por que están más asociados a lesiones displásicas que a carcinomas (Alarcón, 2006).

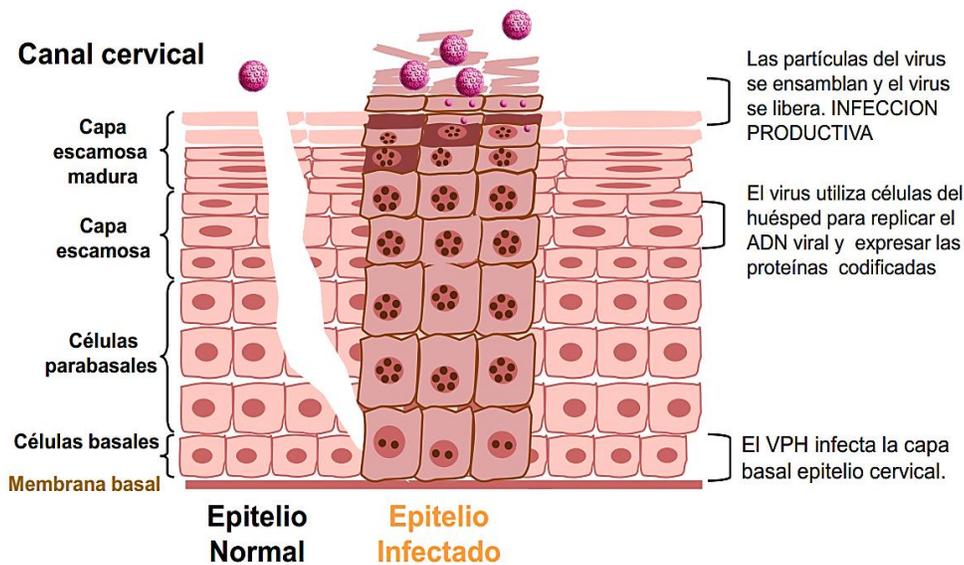


Figura 5. Imagen del mecanismo de infección del Virus del Papiloma humano en cervix, mostrando la entrada del virus a la capa basal del epitelio, así como la integración aleatoria en el genoma del hospedero y posterior transformación celular (Adaptado de Frazer *et al*; 2004)

Debido a la etiología viral de este cáncer las investigaciones unen sus esfuerzos en entender la interacción molecular en la progresión del CaCu desde los oncogenes para genes supresores de tumor y su asociación con el VPH. Estos esfuerzos han desencadenado el desarrollo de vacunas profilácticas contra el VPH, las cuales son altamente efectivas en prevenir la infección por el VPH y lesiones precancerosas (Kane *et al.* 2012).

Sin embargo, actualmente se carece de conclusiones concretas para detener la progresión del CaCu. El pronóstico disminuye dramáticamente a medida que el cáncer produce metástasis en otras partes del cuerpo debido a que el tratamiento de las lesiones locales es más eficaz que los tratamientos de todo el cuerpo, tales como la quimioterapia. El CaCu detectado en estadios tempranos (Figura 5) puede ser tratado mediante cirugía o radioterapia con gran efectividad. (Landoni *et al.* 1997). Sin embargo, más del 35% de los pacientes podría desarrollar enfermedades recurrentes por lo que los resultados del tratamiento son pobres. Esto es una gran necesidad para desarrollar terapias dirigidas a pacientes con CaCu quienes tienen fallas en quimioterapia, radiación y/o cirugía.



1.4 Sistema Inmunológico

El término Inmunidad deriva de la palabra latina *inmunitas*, que hace referencia a la exención de diversas obligaciones civiles procesamiento legales ofrecidas a los senadores romanos durante el desempeño de sus cargos. En un sentido histórico inmunidad significa protección contra la enfermedad más concretamente, contra una enfermedad infecciosa (Abbas *et al.* 2008).

La función del sistema inmune es reconocer y eliminar los organismos invasores extraños. La respuesta inmune debe ser rápida, específica y dirigida contra moléculas extrañas o células portadoras de un agente infeccioso, pero nunca contra las células normales propias (Passarge, 2004).

El sistema inmunológico está conformado por un conjunto de tejidos, células y moléculas involucradas en la defensa del organismo. La cooperación de estos elementos sirve para proteger al individuo contra enfermedades y agentes infecciosos. Para ello debe existir reconocimiento inmunológico, funciones efectoras del sistema inmunológico y memoria inmunológica (Murphy *et al.* 2009).

El reconocimiento inmunológico se lleva a cabo mediante células del sistema inmunológico innato, el cual provee una respuesta inmediata y poco específica, en donde participan receptores moleculares celulares capaces de reconocer determinantes comunes a muchos patógenos sin necesidad de una sensibilidad previa; en cambio en la respuesta adaptativa participan linfocitos T y B con receptores específicos para un antígeno particular, que han sido seleccionados por su capacidad de reconocerlo, siendo un sistema tardío pero específico. Para contener y/o eliminar la infección son necesarias las funciones efectoras del sistema inmunológico, las cuales actúan mediante proteínas en sangre (proteínas del complemento), anticuerpos y células del sistema inmunológico (leucocitos). Ambas respuestas dependen de las actividades de los glóbulos blancos o leucocitos. Cada tipo de respuesta utiliza distintos mecanismos de



reconocimiento y también mecanismos efectores característicos (Murphy *et al.* 2009).

La inmunidad adaptativa, es la respuesta montada por linfocitos específicos para un antígeno, células accesorias especializadas que participan en la activación linfocitaria y células efectoras cuya función consiste en eliminar al antígeno (Ravetch *et al.* 2001). Las células accesorias (clásicamente se han denominado así a aquellas que cooperan con los anticuerpos en sus acciones microbicidas o pro inflamatorias) tienen receptores para las regiones constantes de los anticuerpos (FcR) que reconocen a los patógenos recubiertos de anticuerpos y participan en la iniciación de las respuestas de los linfocitos frente a los antígenos. La unión cruzada de los receptores Fc ocupados por inmunoglobulinas que reconocen el antígeno provoca la activación de estas células que atacan al patógeno reconocido por las moléculas de anticuerpos (Jones *et al.* 1999). En esta respuesta adaptativa, los linfocitos dirigidos contra un antígeno específico proliferan y se diferencian en linfocitos efectoras que eliminan al patógeno (Figura 6). En el proceso de eliminación de un patógeno, el sistema inmunológico adaptativo genera un aumento en el número de linfocitos de memoria diferenciados, lo cual permite una respuesta más efectiva y rápida en caso de reincidencia del patógeno, la memoria inmunológica es una característica única del sistema inmunológico adaptativo y gracias a ésta los individuos pueden estar protegidos contra enfermedades recurrentes (Murphy *et al.* 2009).

El sistema inmunológico es una red intrincada en la que participan diferentes tipos de células y de moléculas (Figura 6). La acción coordinada de todos sus elementos permite que se desarrolle una respuesta eficaz contra la célula tumoral. Sin embargo, los tumores presentan diversos mecanismos de evasión que permiten el desarrollo del mismo y la respuesta inmune no es lo suficientemente efectiva para controlar el crecimiento celular anormal (Barrera *et al.* 1995).

Inmunidad Innata y adaptativa

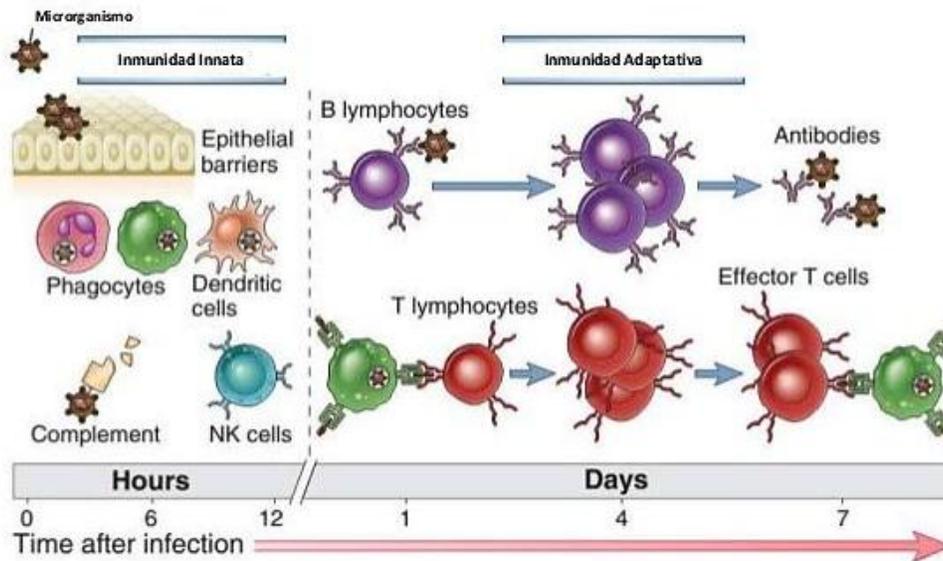


Figura 6. Representación de la inmunidad innata y adaptativa (Tomado de Abbas *et al.* 2008).

1.4.1 Inmunidad Innata

Las respuestas inmunitarias innatas tienen como objetivo impedir que los microorganismos logren acceder al cuerpo y de ser posible erradicarlos antes de una infección (Tortota *et al.* 2007).

Es incapaz de generar memoria; es decir, aun cuando el cuerpo haya presentado una infección previa por el mismo agente, la respuesta de los mecanismos innatos es igual, situación que se diferencia de la inmunidad adaptativa, ya que ésta presenta una respuesta más agresiva cuando ha tenido una exposición previa al agente.

La respuesta inmune innata establece la primera línea de defensa contra los microorganismos, pues consta de mecanismos de defensas celulares y bioquímicos que figuran antes incluso de la infección y que pueden responder con rapidez a ella. Estos mecanismos reaccionan con los microorganismos y con los productos de células dañadas. Los elementos de reconocimiento de los principales componentes de la inmunidad innata son:



- a) Barreras físicas y químicas, como el epitelio y las sustancias químicas antimicrobianas producidas en las superficies epiteliales.
- b) Células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos), células dendríticas y linfocitos citolíticos naturales (NK)
- c) Proteínas sanguíneas, incluidos miembros del sistema de complemento y otros mediadores de la inflamación
- d) Proteínas llamadas citocinas, que regulan y coordinan muchas de las actividades de las células de la inmunidad innata.

Los mecanismos de la inmunidad innata son específicos frente a estructuras que son comunes a grupos de microorganismos relacionados, pero no están especializados para distinguir diferencias ligeras entre microorganismos (Abbas *et al.* 2008).

El sistema inmunitario innato obstaculiza la entrada de los microorganismos y elimina o limita el crecimiento de muchos de ellos capaces de colonizar los tejidos; la piel y los epitelios mucosos que revisten las vías respiratorias y el intestino son la primera defensa contra agentes patógenos invasores; formando una barrera física y química contra la infección. Los microorganismos que violan estas defensas son enfrentados por células y moléculas que montan una respuesta inmunitaria innata inmediata; tal respuesta consiste en dos tipos principales de reacciones: inflamación y defensa antivírica. (Abbas *et al.* 2008. Murphy *et al.* 2009)

Las citocinas y quimiocinas liberadas por macrófagos activados, células dendríticas, y otros tipos celulares durante las reacciones inmunitarias innatas inician el proceso conocido como inflamación. La inflamación de un tejido infectado tiene diversos efectos favorables en el combate de la infección. Es el proceso de reclutamiento de leucocitos y proteínas plasmáticas que salen desde la sangre, y entran en los tejidos donde se necesitan para destruir al agente patógeno de modo directo (Murphy *et al.* 2009).

Los principales leucocitos que se reclutan en la inflamación son los fagocitos: los neutrófilos y los monocitos. Estos expresan en su superficie



receptores que se unen a los microbios a los que fagocitan y otros receptores que reconocen diferentes moléculas microbianas y activan las células. La unión de estos receptores a sus ligandos induce la producción en los fagocitos de especies reactivas de oxígeno, nitrógeno y enzimas lisosómicas, que destruyen los microbios ingeridos. La defensa antivírica consiste en una reacción mediada por citocinas en las que las células adquieren resistencia frente a la infección vírica y los linfocitos NK matan a las células infectadas por virus (Abbas *et al.* 2008).

Los microbios capaces de resistir estas reacciones defensivas de los tejidos pueden entrar en la sangre, donde son reconocidos por las proteínas circulantes de la inmunidad innata. Entre las proteínas plasmáticas más importantes de esta respuesta inmunitaria se encuentran los componentes de la vía alternativa del sistema de complemento. Cuando superficies microbianas activan esta vía, se generan productos de la escisión proteolítica que median las respuestas inflamatorias, cubren a los microbios para potenciar su fagocitosis y provocan su lisis directamente. Muchas de las proteínas circulantes entran en las zonas de infección durante las reacciones inflamatorias y así ayudan a combatir a los microbios en los tejidos extravasculares (Abbas *et al.* 2008).

Además, en el proceso inflamatorio, se incrementa el flujo de linfa que porta microbios y células portadoras de antígeno hacia tejidos linfoides cercanos, donde activan linfocitos e iniciarán la respuesta inmunitaria adaptativa. Por último, una vez que se ha desencadenado la respuesta inmunitaria adaptativa, la inflamación también recluta a los efectores del sistema inmunitario adaptativo (moléculas de anticuerpo y células T efectoras) hacia el sitio de infección (Murphy *et al.* 2009).

1.4.2 Inmunidad Adaptativa

Se induce una respuesta adaptativa cuando una infección satura los mecanismos de defensa innata. El agente patógeno sigue multiplicándose y se acumula antígeno. Debido a que esta forma de inmunidad surge como una respuesta a la infección y se adapta a ella, se denomina inmunidad adaptativa (Murphy *et al.* 2009).



El sistema inmune adaptativo es capaz de reconocer y reaccionar a un gran número de sustancias microbianas y de otro tipo. Además, tiene una extraordinaria capacidad para distinguir entre diferentes microorganismos y moléculas, incluso estrechamente relacionadas, de manera que también se denomina inmunidad específica. Igualmente se denomina inmunidad adquirida, para subrayar que se “adquiere” por medio de la experiencia (Abbas *et al.* 2008).

Las características que definen este tipo de inmunidad son una increíble especificidad frente a moléculas diferentes y una capacidad de “recordar” (memoria), esto es, la capacidad para ser regulada por medio de su experiencia previa de manera que los contactos subsecuentes con un organismo o antígeno extraño en particular provocara una respuesta mucho más rápida e intensa que aquella observada en el primer encuentro (Stites *et al.* 2003).

Esta respuesta inmunológica discrimina entre lo propio y lo extraño, de tal manera que sus componentes, normalmente coexisten en armonía con todas las proteínas y otros materiales orgánicos que constituyen al huésped, pero responden vigorosamente contra organismos extraños e incluso contra células y tejidos de otras personas (Stites *et al.* 2003).

Los principales componentes de la inmunidad adaptativa son unas células llamadas linfocitos y sus productos de secreción, como los anticuerpos. Las sustancias ajenas que suscitan respuestas inmunitarias específicas o son reconocidas por linfocitos o anticuerpos se llaman antígenos (Abbas *et al.* 2008). Al contrario de la inmunidad innata, la inmunidad adaptativa es más lenta para responder, pero tiene un componente de memoria e involucra a los linfocitos denominados linfocitos T y linfocitos B (Tortora *et al.*; 2007). El inicio de las respuestas inmunitarias adaptativas y su desarrollo requiere la captación de los antígenos y su exposición ante unos linfocitos específicos (Abbas *et al.* 2008).

Existen dos tipos de respuestas inmunitarias adaptativas, llamadas inmunidad humoral e inmunidad celular, en las que intervienen componentes diferentes del sistema inmunitario y que sirven para eliminar



microbios de distintos tipos. Todas las respuestas inmunitarias humoral y celular dirigidas contra antígenos extraños poseen una serie de propiedades fundamentales que reflejan la característica de los linfocitos encargados de su producción (Abbas *et al.* 2008).

Los linfocitos T (células T) son los responsables de la inmunidad celular, son llamados así por el timo, en donde se lleva a cabo su diferenciación. Dependiendo de su función son divididos en linfocitos T citotóxicos y linfocitos T cooperadores (Koolman y Roehm, 2005). Los linfocitos T, como los B, responden a los antígenos por medio de receptores ubicados en su superficie, los receptores de linfocitos T (TCR, T-cell receptor). El contacto con un antígeno complementario de un TCR puede determinar que ciertos tipos de linfocitos T proliferen y segreguen citocinas (Tatora *et al.* 2007).

La inmunidad humoral está basada en la activación de linfocitos B (células B), las cuales maduran en la médula ósea. Después de la activación de los linfocitos T, los linfocitos B pueden liberarse de forma soluble en el plasma sanguíneo. Estas células tienen la particularidad de ser células de larga vida y pueden surgir de cualquier tipo de linfocitos previamente descritos (Koolman y Roehm, 2005). Estos linfocitos reconocen antígenos diferentes por medio de las inmunoglobulinas que recubren su superficie con receptores para los antígenos (Tatora *et al.* 2007).

Al término de la respuesta inmunitaria, el sistema inmune recupera su estado basal en reposo, debido en gran parte a que la mayoría de la progenie de linfocitos estimulados por el antígeno muere por apoptosis (Abbas *et al.* 2008).

1.4.3 Inmunidad Celular

La inmunidad celular queda a cargo de los linfocitos T. La activación de células T indiferenciadas en respuesta a un antígeno, y su posterior proliferación inmediata y diferenciación en células efectoras, constituyen una reacción inmunológica celular primaria. Las células T efectoras difieren en muchos aspectos de sus precursoras indiferenciadas, y estos cambios las facultan para reaccionar con rapidez y eficiencia cuando encuentran su antígeno específico en células efectoras. (Murphy *et al.* 2009)



Los microbios intracelulares, como virus y algunas bacterias, sobreviven y proliferan en el interior de los fagocitos y de otras células del anfitrión, donde los anticuerpos circulantes no los tienen a su alcance. La defensa contra estas infecciones corresponde a la inmunidad celular, que fomentan la destrucción de los microorganismos residentes en los fagocitos o la desaparición de las células infectadas para suprimir los reservorios de la infección (Abbas *et al.* 2008).

Los linfocitos T no producen anticuerpos. Sus receptores de antígeno son moléculas de membrana distintas de ellos, pero dotadas de una estructura afín. Los linfocitos T presentan una especificidad restringida hacia los antígenos; reconocen péptidos derivados de proteínas extrañas que están unidas a proteínas propias llamadas moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), que se expresa en la superficie de otras células. Como resultado de ello, estos linfocitos T reconocen y responden a antígenos asociados a la superficie celular, aunque insolubles. (Abbas *et al.* 2008).

Los linfocitos T constan de poblaciones con funciones diferentes, entre las cuales las mejor definidas son las de los linfocitos T cooperadores y los linfocitos T citotóxicos (CTL). (Abbas *et al.* 2008).

En respuesta a un estímulo antigénico, los linfocitos T cooperadores, secretan proteínas llamadas citocinas, que son responsables de muchas respuestas celulares de la inmunidad innata y adaptativa, y actúan así como “moléculas mensajeras” del sistema inmunitario. Las citocinas secretadas por los linfocitos T cooperadores estimulan la proliferación y diferenciación de los propios linfocitos T y activan otras células, incluidos los linfocitos B, los macrófagos y otros leucocitos. Los CTL matan a las células que producen antígenos extraños, como las células infectadas por virus y otros microbios intracelulares. Algunos linfocitos T, que se denominan linfocitos T reguladores, actúan sobre todo, inhibiendo respuestas inmunitarias. Una tercera clase de leucocitos, los citolíticos naturales (NK), participan en la inmunidad innata contra los virus y otros microbios intracelulares (Abbas *et al.* 2008).



1.4.4 Inmunidad Humoral

La inmunidad humoral está basada en la activación de linfocitos B (células B), los cuales se caracterizan por secretar anticuerpos.

Los linfocitos B en los adultos proceden de precursores originados en la médula ósea que, antes de haber estado en contacto con algún antígeno, migran hacia los tejidos linfáticos periféricos (bazo, ganglios linfáticos y tejidos mucosos linfáticos).

Existen dos subgrupos de linfocitos B:

- Linfocitos B de la zona marginal
- Linfocitos B foliculares

Los linfocitos de la zona marginal poseen una diversidad limitada, reaccionan con mucha rapidez ante polisacáridos y lípidos microbianos frecuentes y se diferencian en células plasmáticas secretoras de IgM de vida corta.

Los linfocitos B foliculares son el subgrupo de células B más abundante, se caracterizan por expresar IgD e IgM, lo que le brinda la capacidad de recircular en el torrente sanguíneo y de adquirir competencia funcional, en esta situación un linfocito B se puede considerar virgen al no ser activado aun por ningún antígeno.

Para desencadenar la activación de un linfocito B es requisito indispensable la interacción con un antígeno en los nódulos linfáticos, para esto los linfocitos B se encuentran en constante migración de un órgano linfático secundario a otro. A diferencia de la presentación que se da en la activación de los linfocitos T, los linfocitos B se activan en contacto directo con el antígeno, que generalmente no ha cambiado su estructura tridimensional original, ya que no ha sido procesado por células presentadoras de antígenos (APC).

Los antígenos llegan hasta los folículos de los nódulos linfáticos por los vasos linfáticos aferentes o bien con ayuda de macrófagos y células dendríticas.



La detección de un antígeno por parte del linfocito B se lleva a cabo por la acción de moléculas Ig en membrana que conforman un complejo receptor de antígeno (BCR), el cual tiene dos funciones clave: la activación del linfocito B y el procesamiento del antígeno para funcionar como célula presentadora para linfocitos T cooperadores.

El contacto del antígeno con el linfocito B puede activarlo, sin embargo esta activación no es capaz de estimular una proliferación y diferenciación significativa del linfocito, para esto es necesaria la acción de otras moléculas como las proteínas del complemento, los receptores de reconocimiento de patrones o bien la acción de linfocitos T cooperadores.

Una vez que la activación se ha llevado a cabo el linfocito B es capaz de segregar anticuerpos contra antígenos específicos. (Abbas *et al.* 2008)

1.5 Anticuerpos.

Las inmunoglobulinas son los elementos fundamentales en cada etapa de una respuesta inmunitaria humoral. Cuando se expresa sobre la superficie de linfocitos B en reposo, actúan como receptores que pueden detectar y distinguir entre la vasta gama de posibles antígenos que se encuentran en el ambiente. Al fijar sus antígenos afines, las inmunoglobulinas de superficie pueden iniciar una cascada de procesos de señalización que quizás culminen en la activación de células B, proliferación clonal y generación de células plasmáticas. Las inmunoglobulinas secretadas como resultado de la activación de las células B, funcionan entonces como anticuerpos, desplazándose a través de los líquidos de los tejidos para buscar y fijar antígenos específicos que desencadenaron su producción. Las dos características fundamentales de las inmunoglobulinas como proteínas fijadoras de antígeno son, la especificidad de cada una de ellas para una estructura antigénica en particular y su diversidad como grupo. Sin embargo, además de la unión de antígenos, las inmunoglobulinas poseen actividades biológicas secundarias que son fundamentales para la defensa del huésped (opsonizar, activación del complemento o cruzar la barrera placentaria) (Stites *et al.* 2003.)



Los patógenos pueden ingresar en el organismo a través de las mucosas, la piel e incluso, directamente en la sangre. Los diferentes isotipos de anticuerpos contribuyen en forma diferente a la protección antimicrobiana en los distintos compartimientos.

- IgM desempeña una función central en los mecanismos de defensa que se desarrollan en el compartimiento vascular. Esto se atribuye a su estructura polimérica, que le otorga una alta capacidad para actuar como anticuerpos neutralizante y para activar la vía clásica del complemento.
- IgG se distribuye tanto en el compartimiento vascular como en el extravascular y actúa en ambos sitios. Funciona como anticuerpo neutralizante y como activador de las respuestas inflamatorias. Estas últimas son inducidas por la activación de la vía clásica del complemento o por la activación de respuestas celulares inducidas a través de FcR expresados en leucocitos. Los anticuerpos de este tipo representan una primera línea de defensa en el recién nacido, ya que es la única inmunoglobulina capaz de atravesar la placenta., lo que permite a la IgG materna contribuir a la defensa del niño en los primeros meses de vida.
- IgA bajo su forma secretoria cumple un papel fundamental en los mecanismos de defensa antimicrobianos operativos en las mucosas, donde actúa como anticuerpo neutralizante.
- IgE cumple una función importante en el control de la funcionalidad de la barrera endotelial y, en consecuencia, en el desarrollo de los fenómenos inflamatorios gracias a su capacidad de inducir la activación de los mastocitos mediante Fc ϵ 1. También tiene un papel destacado en la inmunidad frente a los helmintos. (Fainboim & Geffner; 2011)

Las funciones efectoras y de reconocimiento están separadas de forma estructural en la molécula de anticuerpo, la parte que se une de un modo específico al antígeno, mientras que la otra emprende los diversos mecanismos de eliminación. La región de unión a antígeno varía mucho entre moléculas de anticuerpo, y se conoce como la región variable o región V. La variabilidad de las moléculas de anticuerpos permite que cada



anticuerpo se una a un antígeno específico diferente, y el repertorio total de anticuerpos sintetizados por un individuo es suficientemente grande para asegurar que pueda reconocerse casi cualquier estructura. La región de la molécula de anticuerpo que ejecuta las funciones efectoras del sistema inmunitario no varía de la misma manera, por lo que se conoce como región constante o región C. (Murphy *et al.* 2009).

Todos los anticuerpos son inmunoglobulinas. Fundamentalmente, todas las inmunoglobulinas constan solo de dos clases de cadenas polipeptídicas: las cadenas pesadas (H) de un peso molecular de 53 000 a 71 000 y cadenas ligeras (L) de un peso molecular aproximado de 23 000. En el humano existen cinco principales clases de inmunoglobulinas (Rose *et al.*, 1983), cada una de las cuales se especializa para activar diferentes mecanismos efectores. (Janeway *et al.* 2009).

Como ya se ha mencionado, la molécula de anticuerpo (inmunoglobulina) se compone a partir de cadenas polipeptídicas pesadas (H) y cadenas polipeptídicas ligeras pareadas (L). Las cadenas se mantienen unidas por fuerzas no covalentes y también por fuerzas covalentes de disulfuro entre las cadenas; formando una estructura bilateralmente simétrica (Figura 7). Todas las inmunoglobulinas normales se conforman con esta estructura básica. (Stites *et al.* 2003).

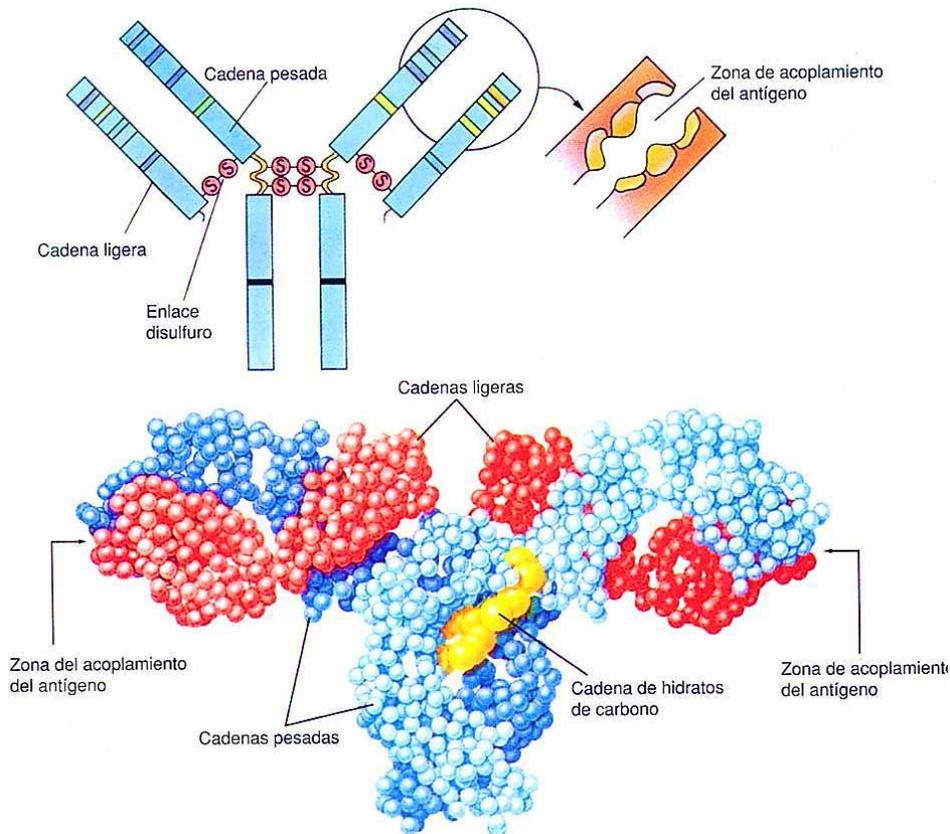


Figura 7. Estructura de una molécula de inmunoglobulina. (Tomado de Hickman *et al.* 2006)

Las cadenas pesadas y ligeras constan de una serie de secuencias similares, aunque no idénticas, cada una de aproximadamente 110 aminoácidos de largo. Cada una de estas repeticiones corresponde a una región distinta, plegada de modo compacto, de estructura proteínica conocida como un dominio de proteína. La cadena ligera está formada de dos de esos dominios de inmunoglobulina, mientras que la cadena pesada posee ya sea 4 o 5. Otra característica relevante es que las secuencias amino terminal de las cadenas pesadas y ligeras varía mucho entre diferentes anticuerpos. (Murphy *et al.* 2009).

Por esta razón, el dominio N- terminal de la cadena pesada o ligera se llama “región variable” y se abrevia como VH o VL, respectivamente (Stites *et al.* 2003); juntas conforman la región V del anticuerpo y le confieren la capacidad para unirse a antígenos específicos. Los otros dominios se designan en conjunto “región constante” y se abrevian como



CH o CL y constituyen la región C (Murphy *et al.* 2009). Los múltiples dominios de C de cadenas pesadas se enumeran desde el extremo amino terminal hasta el grupo carboxilo terminal, por ejemplo, CH1, CH2 y así de manera sucesiva. (Stites *et al.* 2003).

En cada molécula de anticuerpo las cadenas pesada y ligera se alinean de manera paralela. Cada dominio VH siempre está ubicado en un punto directamente adyacente a un dominio VL, y dicho par de dominios, juntos forman el sitio de unión al antígeno. Por lo tanto, cada unidad básica de cuatro cadenas contiene dos sitios de unión de antígenos, separados pero idénticos, por lo que se dice que es divalente con respecto al enlace de antígenos. La especificidad al antígeno de una proteína dada se determina por las secuencias combinadas de sus dominios VH y VL, por esta razón, varía ampliamente entre los anticuerpos (Stites *et al.* 2003).

Cada dominio CH1 interactúa de cerca con el dominio CL, y en la mayoría de los tipos de anticuerpos los dos se enlazan de manera covalente por uno o más puentes disulfuro. En términos generales, el anticuerpo tiene una configuración en forma de T o Y cuando se observa de forma esquemática. La región de la base de cada brazo de la T o Y, localizada entre los dominios CH1 y CH2, se llama región bisagra; en la mayoría de los anticuerpos tiene una estructura secundaria laxa que le confiere flexibilidad, lo cual le permite que los dos brazos se muevan con relativa libertad entre sí (Stites *et al.* 2003).

Como ya hemos mencionado los linfocitos B se activan para diferenciarse en células productoras de anticuerpos (células plasmáticas) que son capaces de reaccionar con los diversos antígenos presentes en el organismo. Los mecanismos a través de los cuales los anticuerpos median su actividad funcional en el establecimiento de un proceso infeccioso suele involucrar, como primer paso, el reconocimiento de moléculas presentes en las células diana (o blanco) a través de receptores expresados por el microorganismo infeccioso. Los anticuerpos con especificidad hacia esas moléculas receptoras pueden, en ocasiones, inhibir el proceso infeccioso bloqueando la penetración del patógeno. Estos anticuerpos se denominan anticuerpos neutralizantes. Un mecanismo similar suele ser eficaz en la



inmunidad contra las toxinas, en los cuales los anticuerpos dirigidos contra el sitio activo de las toxinas pueden, por sí solo, neutralizar su actividad tóxica.

No obstante, en la mayoría de los procesos infecciosos, el anticuerpo es incapaz de neutralizar la capacidad patogénica del microorganismo y promover su eliminación. Por lo tanto, debe reclutar mecanismos efectores adicionales.

Los mecanismos más importantes son:

- 1) la activación del sistema de complemento.
- 2) la activación de respuestas celulares mediadas a través de los receptores para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas.

Ambos mecanismos requieren, para su puesta en marcha, la interacción del anticuerpo con el antígeno, proceso que conduce a la formación de asociaciones macromoleculares denominadas complejos inmunes (CI). Son los anticuerpos integrados en CI, y no los anticuerpos libres, los encargados de llevar a cabo la destrucción y eliminación de los microorganismos patógenos. El microorganismo opsonizado por anticuerpos, o por componentes activos del complemento, puede ser entonces eliminado por el sistema mononuclear fagocítico (Fainboim & Geffner; 2011).

La formación de CI constituye una consecuencia natural de la respuesta inmune humoral y es necesaria para lograr la depuración eficaz del antígeno. Los complejos inmunes son una herramienta esencial en la depuración de los antígenos microbianos. Por otra parte, los complejos inmunes permiten a los anticuerpos mediar funciones efectoras, como la activación del sistema de complemento, la fagocitosis y la producción de mediadores inflamatorios por células fagocíticas (Fainboim & Geffner; 2011).

1.6 Familia de Receptores Fc

La eficacia de la respuesta inmune depende en gran medida de las interacciones que se establecen entre los sistemas inmune innato y adaptativo. A su vez, esta respuesta depende de varios mecanismos, entre



los que se encuentran las interacciones entre los anticuerpos y los receptores para la porción Fc (FcRs) de estas moléculas. Los FcRs son glicoproteínas de membrana que se expresan en todas las células hematopoyéticas, a excepción de los eritrocitos y son esenciales para los mecanismos efectores de los anticuerpos. Una vez que han reconocido al antígeno, los anticuerpos interactúan con estos receptores para activar las distintas células efectoras que forman parte de los mecanismos de defensa del organismo. Por lo tanto, la interacción entre los anticuerpos y los FcR en leucocitos (Figura 8) es de gran importancia para obtener una pronta eliminación del antígeno. Así mismo tienen un papel fundamental en la regulación de la respuesta inmune.

Como se ha mencionado anteriormente la capacidad de los anticuerpos de alta afinidad para neutralizar toxinas, virus o bacterias puede proteger contra infecciones, pero por sí sola no resuelve el problema de cómo eliminar del organismo a los agentes patógenos y sus productos. Muchos agentes patógenos no se pueden neutralizar mediante anticuerpos y deben destruirse por otros medios. Un mecanismo de defensa importante es la activación de diversas células efectoras accesorias que portan FcR, estos receptores facilitan la fagocitosis de microorganismos neutralizados y de agentes patógenos extracelulares resistentes, mediante macrófagos, células dendríticas y neutrófilos. La secreción de mediadores almacenados por otras células no fagocíticas (linfocitos NK, eosinófilos, basófilos y células cebadas) se desencadena cuando sus receptores Fc están ocupados. Estos mecanismos maximizan la eficacia de todos los anticuerpos independientemente del lugar al que se unen. Las células que portan FcR se activan cuando éstos se agregan por unión a las regiones Fc múltiples de moléculas de anticuerpo que cubren un agente patógeno, o también pueden activarse mediante mediadores solubles (Murphy *et al.* 2009).

Los FcR se expresan en la membrana celular y constituyen una familia de receptores que reconocen motivos presentes en la porción Fc de los anticuerpos, pertenecen a la superfamilia de genes de inmunoglobulina. En este sentido, la única excepción lo constituye el receptor de tipo II para IgE (FcεRII), que no pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas,

sino a la superfamilia de las lectinas de tipo C. (Fainboim & Geffner; 2011).

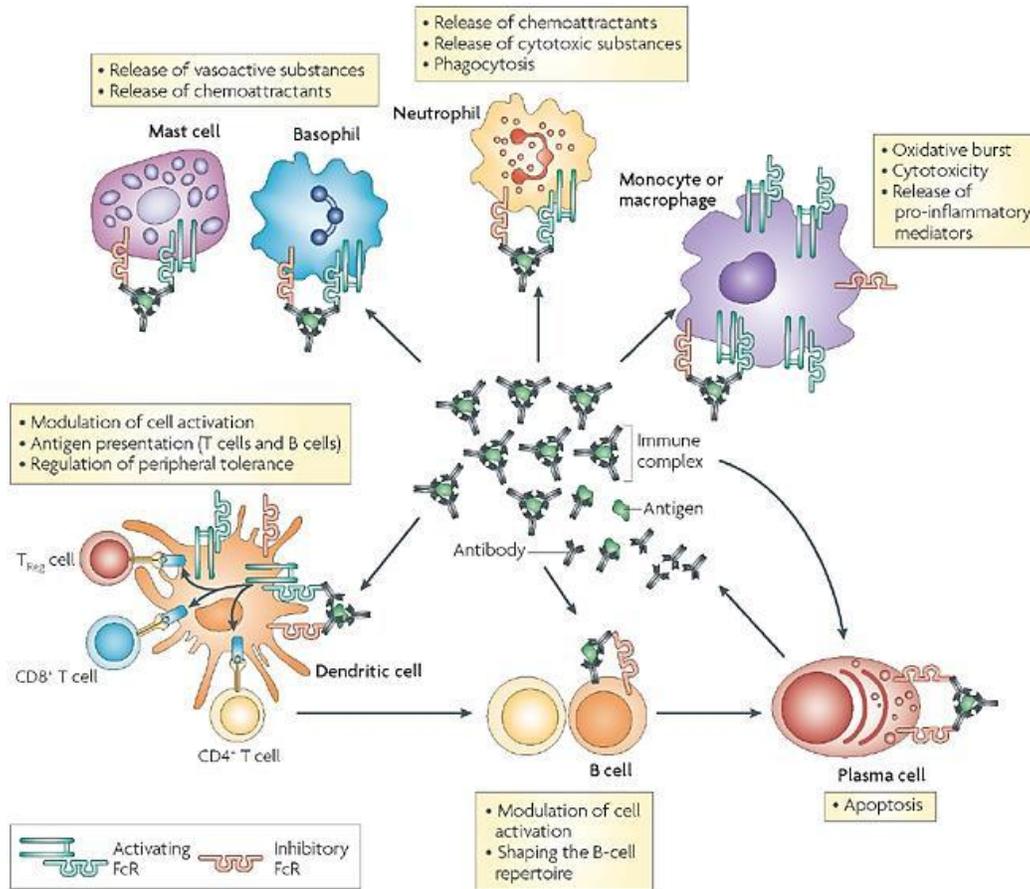


Figura 8. FcR presentes en células de la inmunidad innata y adaptativas. (Tomado de Nimmerjahn *et al.*, 2008).

Diferentes tipos de células portan diferentes juegos de receptores Fc y de esta manera el isotipo de anticuerpo determina qué tipo de células participaran en una respuesta dada. (Murphy *et al.* 2009). Los FcR se expresan en las células de la inmunidad innata y en los linfocitos B (Figura 9); y establecen un vínculo entre la especificidad de la inmunidad adaptativa conferida por los anticuerpos y las funciones efectoras mediadas por las células de la inmunidad innata. (Fainboim & Geffner; 2011)



Receptor	FcγRI (CD64)	FcγRII-A (CD32)	FcγRII-B2 (CD32)	FcγRII-B1 (CD32)	FcγRIII (CD16)	FcεRI	FcαRI (CD89)	Fcα/μR
Estructura								
Unión	IgG1 10^8 M^{-1}	IgG1 $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	IgG1 $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	IgG1 $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	IgG1 $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$	IgE 10^{10} M^{-1}	IgA1, IgA2 10^7 M^{-1}	IgA, IgM $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$
Orden de afinidad	1) IgG1=IgG3 2) IgG4 3) IgG2	1) IgG1 2) IgG3=IgG2* 3) IgG4	1) IgG1=IgG3 2) IgG4 3) IgG2	1) IgG1=IgG3 2) IgG4 3) IgG2	IgG1=IgG3		IgA1=IgA2	1) IgM 2) IgA
Tipo de célula	Macrófagos Neutrófilos† Eosinófilos† Células dendríticas	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Plaquetas Células de Langerhans	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos	Células B Células cebadas	Linfocitos NK Eosinófilos Macrófagos Neutrófilos Células cebadas	Células cebadas Eosinófilos† Basófilos	Macrófagos Eosinófilos† Neutrófilos	Macrófagos Células B
Efecto de ligadura	Captación Estimulación Activación de la explosión respiratoria Inducción de muerte	Captación Liberación de gránulo (eosinófilos)	Captación Inhibición de estimulación	Captación nula Inhibición de la estimulación	Inducción de muerte (linfocitos NK)	Secreción de gránulos	Captación Inducción de muerte	Captación

Figura 9. Distintos receptores Fc para la región Fc de las diferentes clases de inmunoglobulinas se expresan sobre diferentes células accesorias. Se muestran la estructura de subunidades y las propiedades de unión de estos receptores y los tipos de células que los expresan. La composición catenaria exacta de cualquier receptor puede variar de un tipo de células a otro. (Tomado de Murphy *et al*, 2009).

Algunos de estos receptores presentan una cadena única, mientras que otros están formados por una cadena alfa, encargada del reconocimiento de la porción Fc del anticuerpo (dominio de unión a inmunoglobulina extracelular), y una o más cadenas adicionales (dominio transmembranal y dominio intracelular) que median la transducción de señales en el interior de la célula cuando una región Fc está unida (Fainboim & Geffner; 2011).

Las propiedades del dominio intracelular determinan el resultado de la señalización mediada por FcR y dependen de motivos ITAM (motivos de activación en inmunorreceptores basados en tirosina) o ITIM (motivos de inhibición en inmunorreceptores basados en tirosina). Los FcRs de activación tienen motivos ITAM, mientras que los de inhibición tienen un motivo ITIM (Blank *et al.* 2009). Estas señales antagonistas juegan un papel clave en el control de las repuestas celulares. Este balance es de gran importancia para prevenir daño a los tejidos a través de una



activación exagerada del sistema inmune y el mantenimiento de la homeostasis (Blank *et al.* 2009).

Existen 5 tipos de FcR dependiendo de la especificidad de sus ligandos:

- Fc α R el cual se une a IgA
- Fc δ R el cual se une a IgD
- Fc ϵ R el cual se une a IgE
- Fc γ R el cual se une a IgG
- Finalmente Fc μ R que se une a IgM (Monteiro & Winkel; 2003).

La nomenclatura de estos receptores, como su nombre lo sugiere, está basada en la capacidad para unirse a la porción Fc de una clase particular de anticuerpos. La letra R designa a un receptor y un número romano designa un subtipo particular de FcR, por ejemplo, Fc γ RII. Éstos pueden ser subclasificados por letras a, b, c, etc; por ejemplo, FcRIIa. Algunos receptores de este tipo también se les da una designación alternativa como parte del grupo de diferenciación (CD), sistema de clasificación de moléculas de superficie de leucocitos; por lo tanto, Fc γ R I se conoce también como CD64, CD32 como el Fc γ R II, el Fc γ R III como CD16 y CD23 como Fc ϵ R II (Monteiro & Winkel; 2003).

Muchos tipos celulares tienen la capacidad de fijar anticuerpos circulantes o complejos inmunes (antígeno-anticuerpo) con el uso de FcR y su función varía entre diferentes tipos celulares (Stites *et al.* 2003). Los FcR presentes sobre la superficie de una célula se unen a partículas cubiertas con anticuerpos con mayor avidéz, que a los monómeros de inmunoglobulina. Este es el principal mecanismo mediante el cual los anticuerpos unidos se distinguen de la inmunoglobulina libre. El resultado es que los FcR permiten a las células detectar agentes patógenos por medio de moléculas de anticuerpo unidas. De este modo, un anticuerpo específico unido a su receptor Fc, le confiere a las células fagocíticas que carecen de especificidad intrínseca la capacidad de identificar y eliminar agentes patógenos y sus productos de los espacios extracelulares. Las células portadoras de FcR más importantes en las respuestas inmunitarias humorales son las células fagocíticas de los linajes monocítico y



mielocítico, en particular macrófagos y neutrófilos (Janeway *et al.* 2009). Por lo tanto el evento crítico de la activación de estos receptores es su microagregación, un fenómeno también conocido como entrecruzamiento de receptores. Este fenómeno no es inducido por las inmunoglobulinas libres, sino por las que interactúan con el antígeno que dan lugar a la formación de asociaciones antígeno-anticuerpo, denominadas CI (complejos inmunes). De manera que los anticuerpos IgG contenidos en los CI son los ligandos fisiológicos de los FcR (Fainboim & Geffner; 2011).

Las inmunoglobulinas presentes bajo la forma de CI muestran dos características diferenciales respecto a las inmunoglobulinas libres:

- a) Son capaces de microagregar y, en consecuencia, activar FcR
- b) Son reconocidos por los FcR con una afinidad incrementada respecto de las inmunoglobulinas libres

En otras palabras, el CI confiere a los anticuerpos que lo integran, la capacidad de interactuar con los FcR con alta avidéz, e inducir su activación al microagregarlos sobre la superficie celular (Fainboim & Geffner; 2011).

Solo los receptores de gran afinidad de cada tipo (FcγRI y FcεRI) tiene la capacidad de enlazar inmunoglobulinas monómeras en un grado significativo a las concentraciones que se encuentran normalmente en la sangre. Las células que expresan estos FcR de gran afinidad pueden, por tanto, adsorber anticuerpos circulantes en sus superficies, donde estos actúan como receptores de antígenos (Stites *et al.* 2003). Por otro lado; las células que poseen solo FcR de baja afinidad (FcγRII, FcγRIII y FcεRII) no pueden adsorber cantidades apreciables de anticuerpo libre, pero en lugar de eso enlazan su inmunoglobulina afín únicamente en complejos inmunes, donde aumenta su concentración eficaz. El enlace de estos complejos multivalentes también sirve para unir de manera cruzada a los FcR y transmitir señales al interior de la célula. Las interacciones de este tipo tienen la responsabilidad de facilitar la fagocitosis a través del fenómeno de opsonización y también son importantes para desencadenar quimiotaxia y degranulación de neutrófilos y otros fagocitos. Además, los



FcR de escasa afinidad en las células B permiten a éstas detectar la presencia de complejos de inmunes y proporcionar una importante vía de señalización de retroalimentación que limita la producción posterior de anticuerpos en las etapas tardías de una respuesta inmunitaria (Stites *et al.* 2003).

La diversidad entre los FcR es debido a la afinidad que poseen hacia sus ligandos. Todos los FcR, a excepción del FcεRII y el FcγRII, expresan baja afinidad hacia los anticuerpos que reconocen, por lo tanto, solo pueden unir efectivamente anticuerpos que formen parte de complejos inmunes. Por el contrario, el FcεRI y el FcγRI expresan alta afinidad hacia los anticuerpos IgE e IgG, respectivamente. Ellos les permite unir efectivamente anticuerpos IgE e IgG libres, es decir anticuerpos que no integran complejos inmunes (Fainboim & Geffner; 2011).

Es importante destacar que el hecho de unir anticuerpos libres con alta afinidad no conduce a la microagregación de los receptores, ya que los anticuerpos se comportan como ligandos univalentes. Por lo tanto, la unión de anticuerpos libres a los FcεRI y FcγRI no conduce a la activación celular, la cual tendrá lugar recién cuando los antígenos tomen contacto con los anticuerpos unidos a la superficie celular a través de estos FcR (Fainboim & Geffner; 2011).

Los FcR cumplen una función destacada en la inmunidad antimicrobiana y antitumoral, también en los fenómenos de autoinmunidad, al mediar la activación de diferentes respuestas efectoras propias de la inmunidad innata sobre las dianas celulares reconocidas por los anticuerpos. Entre las principales funciones efectoras activadas a través de los FcR, debemos mencionar: endocitosis, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA), degranulación celular y estimulación de la producción de citocinas, quimiocinas y mediadores lipídicos proinflamatorios. (Fainboim & Geffner; 2011).

Este tipo de receptores pueden mediar la internalización de moléculas o microorganismos opsonizados por anticuerpos, dando lugar a la formación de una vacuola endocítica. La fagocitosis representa, en realidad, una

forma particular de endocitosis en la cual lo que se internaliza es un elemento particulado, por ejemplo, un microorganismo. Entre los FcR, los receptores Fc gamma (FcR γ) (Figura 10), particularmente los FcR γ de tipo I, IIa y IIIa, son los encargados de mediar la endocitosis de moléculas y microorganismos. Los dos tipos celulares especialmente capacitados para fagocitar microorganismos y destruirlos son los granulocitos neutrófilos y los macrófagos. La endocitosis mediada por Fc γ R cumple también un papel crítico en la depuración de los complejos inmunes circulantes. Frente a un proceso infeccioso, (y también frente a la aparición de procesos neoplásicos y autoinmunes), los anticuerpos séricos reaccionan con antígenos, dando lugar a la formación de CI, que deben ser depurados de la circulación (Fainboim & Geffner; 2011).

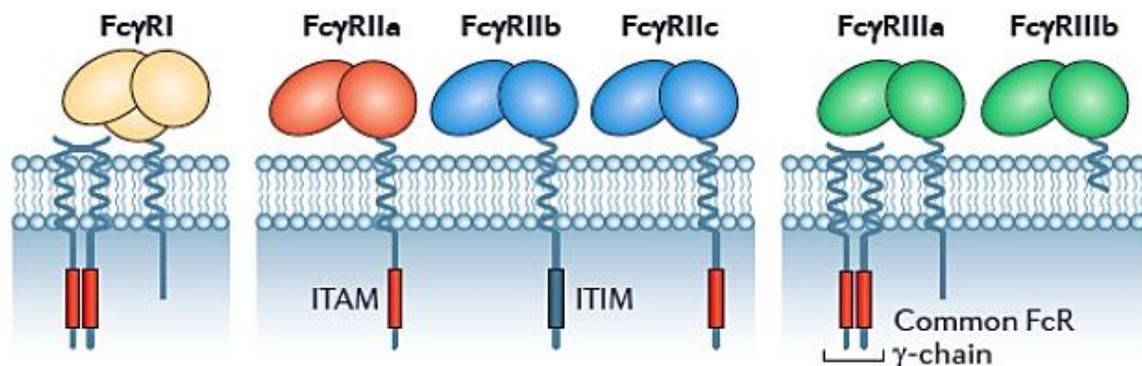


Figura 10. Representación de FcR en leucocitos humanos. (Tomado de Hogarth & Pietersz, 2012)

La endocitosis mediada por los Fc γ R tiene una tercera función relevante, pues promueve la endocitosis de antígenos (asociados con anticuerpos IgG) por las células presentadoras de antígenos profesionales, fundamentalmente células dendríticas y macrófagos. Ello redundara, en última instancia, en una mayor capacidad de la célula presentadora para activar los linfocitos T (Fainboim & Geffner; 2011).

La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) es un mecanismo a través del cual células “diana o blanco” recubiertas por anticuerpo son destruidas por células efectoras de la inmunidad innata que reconocen a estos anticuerpos a través de sus FcR. Este mecanismo



no involucra la fagocitosis de la célula diana, si no su destrucción por acción de mediadores citotóxicos liberados por la célula efectora. La CCDA es, en realidad, un mecanismo mediado por diferentes FcR y diversas poblaciones celulares. La CCDA puede ser inducida a través de anticuerpos IgG e IgE, reconocidos por Fc γ (Fc γ RI, Fc γ RIIa y Fc γ RIIIa) y Fc ϵ RII, respectivamente. La CCDA inducida por anticuerpos IgG es mediada por granulocitos neutrófilos y eosinófilos, monocitos, macrófagos y células NK (Fainboim & Geffner; 2011).

Si bien la función más notoria de los receptores Fc es la activación de células accesorias para atacar agentes patógenos, también contribuyen de otras maneras a respuestas inmunitarias. Por ejemplo, los receptores Fc γ RIIB regulan de modo negativo a las células B, a las células cebadas, a los macrófagos y a los neutrófilos mediante el ajuste del umbral al cual los complejos inmunitarios activarán a dichas células. Los receptores Fc expresados por células dendríticas les permiten ingerir complejos antígenos: anticuerpo y presentar péptidos antigénicos a células T.

1.6.1. Fc γ RIII ó CD16

Los receptores Fc gamma (Fc γ R) constituyen uno de los ejes centrales del sistema inmunológico humano. Su ligando es la porción cristalizable (Fc) de las inmunoglobulinas G (IgG). Se encuentran distribuidos en la superficie de macrófagos/monocitos y otras células mieloides así como en células no mieloides, linfocitos B, células Natural Killer (NK) y células epiteliales. Los Fc γ R constituyen el puente de unión entre el sistema inmune adaptativo (anticuerpos específicos producidos tras la exposición antigénica) y el sistema inmune innato (células inmunes efectoras como los macrófagos, neutrófilos, mastocitos o células NK). Además de constituir un sistema de control en la tolerancia inmunológica y de la génesis de anticuerpos, mediante la regulación en la maduración de las células dendríticas y linfocitos B, y en la supervivencia de las células plasmáticas (Nimmerjahn *et al.* 2008).

Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIC, Fc γ RIIIA y Fc γ RIIIB son los Fc γ R propios del ser humano. Los genes correspondientes a los Fc γ R se encuentran

agrupados en la proximidad del brazo largo de cromosoma 1. (Chen *et al.* 2006).

El Fc γ RIII o CD16 tiene dos isoformas: Fc γ RIIIA y Fc γ RIIIB. El Fc γ RIIIA está formado por una cadena α que une IgG y por un homodímero de cadenas γ que contiene cada una un ITAM. El Fc γ RIIIA es un receptor que se expresa en macrófagos, células NK y en células dendríticas (Figura 11) (Ravetch *et al.* 2001) como una glicoproteína de membrana integral anclada a través de un péptido transmembranal, mientras que el Fc γ RIIIB se expresa exclusivamente en neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y es un receptor sin porción citoplasmática unido a la membrana por un enlace glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Mora *et al.* 2009).

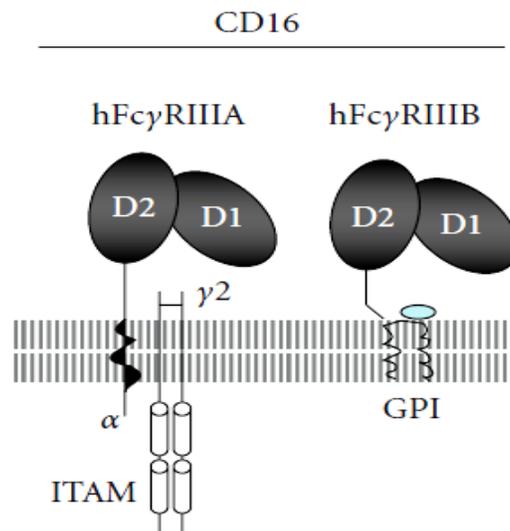


Figura 11. Isoformas en las que se presenta el receptor Fc γ RIII (CD16). (Tomado de Cohen *et al.*, 2009)

El Fc γ RIIIA en las células asesinas naturales (NK) reconocen las moléculas de IgG que están unidas a la membrana de una célula blanco infectada. (Mora *et al.* 2009). La activación de Fc γ RIIIA por IgG causa entonces la liberación de sustancias citotóxicas como la perforina y granzima. Estas sustancias entran a la célula blanco y promueven su muerte por el proceso de apoptosis. (Sun; 2003). Este proceso de muerte celular es conocido como citotoxicidad dependiente de anticuerpos. Debido a que este tipo de citotoxicidad puede ser un mecanismo muy efectivo para destruir células, los anticuerpos se han vuelto el centro de atención para



el tratamiento de algunos tipos de cáncer. La idea es administrar un anticuerpo que se une específicamente a una célula tumoral. Este anticuerpo unido a la célula tumoral, se puede unir también a los receptores Fc en las células del sistema inmunológico, induciendo la respuesta de citotoxicidad dependiente de anticuerpos (Eccles, 2001). Finalmente mencionaremos que este receptor ha sido identificado en células epiteliales del cérvix donde probablemente juega un papel de presentador de antígenos a los linfocitos para mediar una respuesta inmunológica (Patyka *et al.* 2015).

1.6.2. FcRn

Existe otro tipo de receptor Fc que se diferencia de los anteriormente descritos, tanto en estructura como en función y cumple un rol clave en las respuestas inmunitarias mediadas por anticuerpos, que se especializa en la unión con inmunoglobulinas de tipo G, el cual fue inicialmente identificado en el intestino de roedores neonatales, por lo que fue denominado Receptor neonatal Fc (FcRn).

Los FcRn fueron teorizados por primera vez por Brambell en 1951 al detectar que embriones de roedores poseían anticuerpos, posteriormente Neil Simister y Keith Mostov lograron purificar y secuenciar esta molécula reportando que poseen características del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) de clase I, los péptidos que conforman esta molécula están codificados en el cromosoma 19 (Junghans *et al.* 1997).

Durante la gestación la placenta ejerce numerosas funciones: permite que el oxígeno y los nutrientes pasen de la sangre materna a la sangre fetal y transporta dióxido de carbono y productos de desecho en dirección opuesta, además sintetiza colesterol, ácidos grasos y glucógeno en etapas tempranas que nutren al feto, además tiene una gran importancia en el intercambio de sustancias como electrolitos, hormonas, medicamentos y anticuerpos (Lencer *et al.* 2005).

La mórula compuesta por una masa celular externa y una masa celular interna dará origen al embrión y al trofoblasto respectivamente. El

trofoblasto dará origen a la parte fetal de la placenta y se diferencia en una capa interna de células mononucleadas, el citotrofoblasto y una masa celular externa, el sincitiotrofoblasto.

Los anticuerpos maternos atraviesan la membrana placentaria como excepción del resto de las sustancias proteicas, por endocitosis mediada por FcRn que se localizan en el sincitiotrofoblasto. Los FcRn cumplen su función en el intestino de neonatos captando IgG de la leche materna para trasladarlas al feto. También se ha reportado que estos receptores están involucrados en la protección de IgG del catabolismo (Figura 12) (Chaudury ,2003).

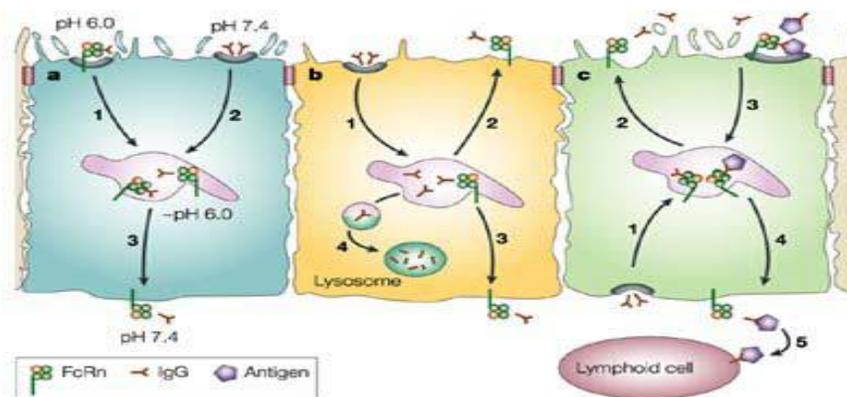


Figura 12. Funciones de FcRn (a) Transporte a través de membrana de IgG. A un pH ácido (6- 6.5) las IgG se unen con los FcRn en la membrana celular, cuando el pH es neutral (7- 7.4) las IgGson internalizadas por endocitosis uniéndose a FcRn en compartimentos intracelulares de pH ácido. El complejo IgG-FcRn va ser transportado hasta la superficie basolateral donde el pH vuelve a ser básico permitiendo así la liberación del anticuerpo. (b) Control de la homeostasis de IgG. Cuando ocurre la endocitosis de IgG por células epiteliales, se da una interacción en los endosomas con FcRn, lo cual evita la degradación de IgG reciclando anticuerpos con la posterior liberación al torrente sanguíneo, o bien promoviendo el transporte hacia la superficie basolateral. Se ha detectado que IgG que no se unen a FcRn activan una vía de degradación en lisosomas. (c) Papel del complejo IgG-FcRn en el sistema inmune y tolerancia. IgG endocitadas por células epiteliales provenientes de la superficie basolateral interactúan con FcRn para su liberación en el polo apical, de la misma forma, IgG unidas a algún antígeno pueden utilizar el transporte mediado por FcRn y activar células del sistema inmune o tolerancia. Tomada de Rojas y Apodaca (2002)



La expresión de FcRn ha sido reportada en diferentes tejidos sanos como pulmón, riñón, cerebro, así como en células intestinales de neonatos y en algunos tipos de cáncer (corion, mama, ovario, colorectal, leucemia monocítica aguda) (Derry *et al.* 2007). Sin embargo se desconoce su expresión en células de CaCu.

1.7. Inmunovigilancia Tumoral

En los últimos años las investigaciones se han enfocado en el estudio y comprensión de los mecanismos inmunológicos capaces de reconocer y destruir las células tumorales; lo que permite comprender mejor la biología de los tumores y favorece el desarrollo de estrategias terapéuticas que permitan combatir este grupo de enfermedades. El papel que desempeña el sistema inmune en el control de tumores fue propuesto inicialmente por Thomas y Burnet en 1957, con la teoría de la “vigilancia inmunológica”. Esta teoría postula que, dentro de un organismo, continuamente se están generando células malignas, pero que estas son identificadas y destruidas rápidamente por el sistema inmune (Barrera *et al.* 1995).

La inmunovigilancia tumoral se mide mediante dos tipos de mecanismos: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa. La respuesta inmune innata se considera como la primera barrera contra las células tumorales, las cuales son reconocidas por un proceso independiente de antígeno. Este mecanismo es mediado por un patrón de receptores y de moléculas de superficie celular expresados en la célula tumoral. Entre las principales células que reconocen a la célula tumoral se encuentran las células NK, las cuales reconocen la baja o nula expresión de moléculas MHC I sobre la célula tumoral, así como proteínas relacionadas con estrés, como la expresión de MIC A y MIC B, que son ligandos de los receptores NKG2D expresados por células NK (Bermúdez *et al.* 2005).

En relación con la respuesta inmune adaptativa, ésta requiere del reconocimiento de antígenos tumorales para eliminar la célula tumoral por medio de las células efectoras de la respuesta inmune. Se ha demostrado que la respuesta inmune mediada por células es la más importante para



eliminar células neoplásicas. Esta respuesta es dependiente de la activación de los linfocitos T y de las células presentadoras de antígenos profesionales (APC) (Sadelain *et al.* 2003). La activación de los linfocitos T, requiere que las células dendríticas (CD) capturen y procesen el detritus celular tumoral, migren a los nódulos linfáticos regionales para presentar los antígenos tumorales a los linfocitos T CD8+ mediante las moléculas del MHC clase I. En este proceso se activan tanto los linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos contra péptidos tumorales, los cuales son reconocidos a través de las moléculas del MHC. Los linfocitos T CD8+ citotóxicos son los responsables de lisar y eliminar las células tumorales, por el reconocimiento de péptidos tumorales, mediante el reconocimiento del MHC clase I expresado en la superficie de la célula tumoral. Por otro lado, los linfocitos T CD4+ cooperadores, son los encargados de orquestar la respuesta inmune antitumoral, ya que están involucrados en la inducción y activación de los linfocitos T CD8+ citotóxicos a través de la producción de citocinas. Además, los linfocitos T CD4+ cooperadores son capaces de interactuar con las células APC en el proceso de presentación de antígenos tumorales (priming) y activar a los precursores de linfocitos T CD8+ (Toes *et al.* 1999).

El linfocito T citotóxico tiene un papel crítico en la respuesta inmunológica que finalmente resulta en la lisis de las células tumorales en un antígeno de una manera específica. La activación se inicia cuando las células T reconocen y se unen a los antígenos o fragmentos de péptido expresados en la superficie de las células presentadoras de antígenos que están enlazados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I (MHC I). La activación también requiere la presencia de moléculas coestimuladoras. En las células T activadas, hay reclutamiento de células T auxiliares que secretan citocinas tales como la interleucina 2 (IL-2) y factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), que mejora aún más la activación y proliferación de células T (Figura 13). A pesar de estas respuestas inmunológicas a la presencia de células cancerosas, la inmunidad efectiva no se desarrolla en contra de la gran mayoría de los cánceres debido al deterioro en el reconocimiento del tumor por las células inmunes, la mala inmunogenicidad tumoral y la

presencia de un medio inmunosupresor en el microambiente tumoral (Fernando *et al.* 2015).

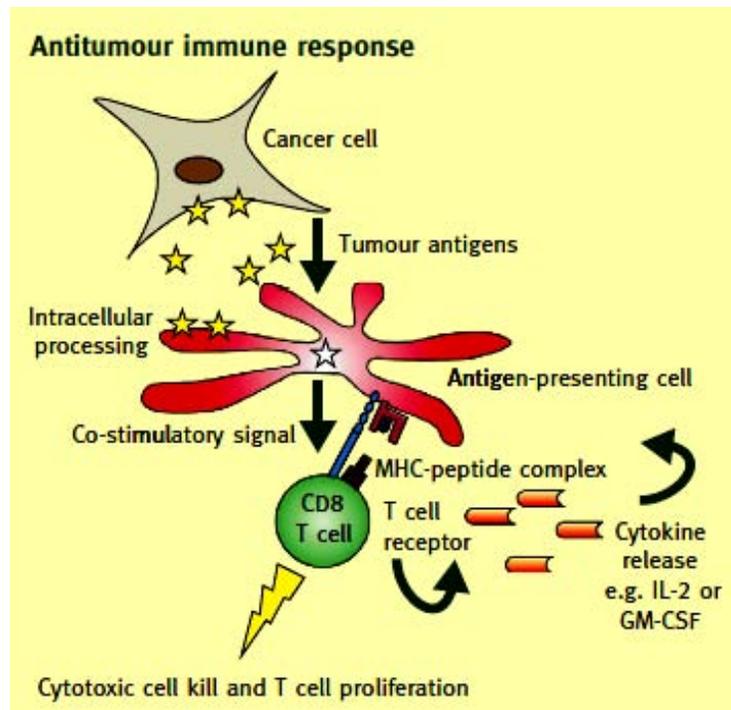


Figura 13. Las DC capturan antígenos liberados por las células tumorales. Después del procesamiento intracelular, péptidos antigénicos se cargan en las moléculas del MHC en la superficie de las DC. Los linfocitos T se encuentran con estos complejos MHC-péptido y en conjunción con una señal coestimuladora, se activan, proliferan y secretan citocinas (IL-2, GM-CFS). (Tomado de Fernando *et al.*, 2015).



Las células tumorales comúnmente presentan mecanismos de evasión a la respuesta inmune permitiendo su crecimiento eficiente. Algunos de los mecanismos hasta ahora identificados son: a) escasa inmunogenicidad de los antígenos tumorales; b) mayor crecimiento tumoral que supera la velocidad de la respuesta inmune; c) ausencia o enmascaramiento de los antígenos del MHC I; d) activación de una respuesta inflamatoria local que impide el reclutamiento de las células efectoras contra el tumor; y e) secreción de factores que inhiben la activación de la respuesta inmune. (Barrera *et al.* 1995.). Asimismo, Rangel-Corona, et., al 2011, proporcionas evidencias de que las células de carcinoma de cérvix expresan el receptor de alta afinidad (cadenas α , γ , β) para IL-2 (RIL-2). También, demuestran que dichas células producen y secretan IL-2 y proponen que el RIL-2, en células de carcinoma de cérvix, es parte de un mecanismo autócrino de proliferación, similar al de los linfocitos. Menciona que las células de carcinoma de cérvix son parcialmente dependientes de este factor de crecimiento por lo que estarían compitiendo con los linfocitos por IL-2, en consecuencia el uso de IL-2 por parte de las células tumorales provocaría una depleción de este factor de crecimiento en el ambiente tumoral, impidiendo la activación a la diferenciación y proliferación de linfocitos citotóxicos.

Además, Caceres-Cortes et.; al (2001), publicó que las células de las líneas CALO e INBL expresan el receptor c-kit y que la adición de IL-2 externa aumenta su expresión. La co-expresión de c-kit con el RIL-2 disminuye la cantidad de IL-2 para inducir la proliferación de las células tumorales. Planteando la hipótesis de que existe un mecanismo de competencia por IL-2 entre las células de carcinoma y los linfocitos, el cual podría favorecer a las células de CaCu por el hecho de que necesitan menor cantidad de IL-2 para su proliferación, a diferencia de la IL-2 requerida por los linfocitos para diferenciarse y montar una respuesta inmune antitumoral específica.



Estas respuestas antitumorales son mediadas sobre todo por linfocitos T, con la contribución mínima de una respuesta mediada por anticuerpos. Sin embargo, las células tumorales, pobremente inmunogénicas, escapan de la inmunovigilancia haciendo al huésped incapaz de producir una respuesta inmune adecuada, dirigida hacia la metástasis del tumor (Martín & Bermejo, 2011).

1.8 Inmunoterapia

El uso de la inmunoterapia depende de la inducción de una respuesta inmune antitumoral específica. Numerosos estudios han demostrado que tanto la inmunidad innata como la adquirida son capaces de reconocer muchos antígenos del tumor y desencadenar una respuesta antitumoral frente a tumores en desarrollo. El conocimiento cada vez mayor de la biología del cáncer y de las diferentes rutas mediante las cuales el sistema inmunológico es suprimido durante la progresión del tumor, ha conducido al desarrollo de diversas estrategias inmunoterapéuticas que incrementen la capacidad del huésped para iniciar una respuesta eficaz en la supresión de tumores emergentes. Pese al desarrollo de modernas técnicas de cirugía y trasplantes, nuevas y más efectivas drogas citotóxicas y mejores métodos de irradiación, que han permitido tratar con éxito algunas patologías neoplásicas, como la leucemia infantil, frecuentemente algunas de estas células malignas sobreviven a estas terapias y se diseminan en el organismo, haciendo necesario el desarrollo de nuevos tratamientos complementarios a los actuales. Uno de estos métodos es la manipulación del sistema inmune para combatir tumores, lo que se denomina inmunoterapia del cáncer (López *et al.* 2004). Para ello se emplean citocinas como IL-2, interferón gamma (IFN- γ) e interferón alfa (IFN- α) que se utilizan como adyuvantes en algunas terapias contra el cáncer (Vey *et al.* 1997). Por su parte Rosenberg en la década de los 80s, diseñó una terapia inmunológica, llamada inmunoterapia adoptiva. La cual tiene como objetivo generar linfocitos T Citotóxicos (CTLs) *in vitro*, utilizando como agente mitogénico y diferenciador IL-2. Dichos CTLs fueron probados en algunos protocolos clínicos, en los cuales además de los



linfocitos citotóxicos se administraba IL-2 vía sistémica para mantener la actividad citotóxica de los CTLs.

Estudios recientes indican que la inmunoterapia se encuentra entre las estrategias más prometedoras de la terapia moderna contra el cáncer. Su objetivo es robustecer la inmunidad innata y adquirida, altamente específica para las células tumorales, y con baja toxicidad para las células sanas del huésped. Aún existen muchas vías moleculares involucradas en el desarrollo tumoral que no han sido descritas detalladamente y que se encuentran bajo constante investigación con fines terapéuticos. Uno de los ejemplos mejor estudiados en inmunoterapia es el efecto de las citocinas sobre el desarrollo tumoral.

1.8.1. Inmunoterapia del CaCu

El CaCu es el tercer tipo de cáncer más comúnmente diagnosticado y la cuarta causa de muerte por cáncer en todo el mundo. Los enfoques convencionales de la cirugía, radioterapia y / o quimioterapia no pueden proporcionar resultados terapéuticos satisfactorios para el CaCu avanzado o recurrente. Por lo tanto, la inmunoterapia para estos pacientes ha sido el modo de tratamiento (Cheng-Tao *et al.*, 2013)

Alrededor del 30% de las pacientes con cáncer de cérvix va a experimentar el fracaso después del tratamiento definitivo, incluyendo cirugía, radioterapia y/o quimioterapia. El pronóstico para los pacientes con reincidencia tumoral es pésimo. Las tasas de supervivencia a 5 años de las pacientes con cáncer de cérvix avanzado y tratadas con terapia paliativa van desde 5% a 15% según los informes. (Monk *et al.* 2005) (Einstein *et al.* 2007). Las pacientes que sufren de CaCu recurrente tendrán un mal pronóstico en la modalidad convencional de tratamiento. Las tasas de supervivencia a 1 año oscilaron entre el 15% y el 20%. Por lo tanto, son necesarios nuevos enfoques para la prevención o el tratamiento de CaCu recurrente. (Cheng-Tao *et al.* 2013)

La inmunoterapia o terapia biológica del cáncer es la cuarta modalidad de tratamiento de las neoplasias malignas, completando las tres clásicas (cirugía, radioterapia y quimioterapia). Esta terapia es muy prometedora y a



partir de ella se están desarrollando nuevas estrategias para el tratamiento de este padecimiento (Mayordomo *et al.* 1999).

El concepto de la inmunoterapia como una modalidad para tratar el cáncer fue reconocido hace más de cien años. Altas dosis de IL-2 fue uno de los primeros agentes para demostrar que el sistema inmunológico del huésped puede ser aprovechado para el tratamiento de neoplasias malignas incluso avanzadas, como se demostró en un grupo de pacientes con cáncer renal y melanoma (Cohen-Solal *et al.* 2010). Muchos tumores son inmunogénicos y provocan una respuesta inmune en el huésped, pero esto normalmente no es suficiente para superar la tolerancia del huésped. Durante décadas, los investigadores han intentado varios métodos para mejorar las respuestas inmunológicas del huésped, como el uso de citocinas inmunoterapéuticas no específicas, vacunas tumorales, inmunoterapia adoptiva y el uso de anticuerpos monoclonales contra una amplia variedad de moléculas (Fernando & Kumar, 2015).

1.8.2. Citocinas

Las citocinas son polipéptidos o glicoproteínas extracelulares, hidrosolubles, que van desde los 8 a los 30KDa. Son secretadas por diversos tipos celulares en la región de la lesión y por células del sistema inmunológico a través de la activación de proteínas de tipo cinasas activadas por mitógeno. Estas moléculas no se almacenan como moléculas preformadas, y actúan especialmente por mecanismos parácrino (en células vecinas) y autócrino (en las propias células productoras) (Lin *et al.* 2010).

Diferentes tipos celulares segregan la misma citocina, y una única citocina puede actuar en diversos tipos de células, fenómenos denominado pleiotropía. Las citocinas son redundantes en sus actividades, es decir, acciones similares pueden ser desencadenadas por diferentes citocinas. A menudo se secretan en cascada, es decir, una citocina estimula sus células blanco para que produzcan más citocinas (Zhang *et al.* 2007).

Las citocinas influyen en la actividad, la diferenciación, la proliferación y la supervivencia de la célula inmunológica, además de regular la producción y la actividad de otras citocinas, que pueden aumentar (proinflamatorias) o



atenuar (antiinflamatorias) la respuesta inflamatoria (Curfs *et al.* 1997). Las citocinas sirven para iniciar la respuesta inflamatoria, y para definir la magnitud y naturaleza de la respuesta inmune específica. (Hernández y Alvarado, 2001).

Las citocinas se unen a receptores específicos que se encuentran en la membrana de las células blanco, iniciando una cascada de transducción intracelular que alteran el patrón de expresión génica, provocando una determinada respuesta biológica (Roitt *et al.* 2006).

Se ha encontrado que muchas citocinas muestran la capacidad de estimular el sistema inmunológico, tales como interferón INF- α , INF- β o INF- γ , IL-2 e interleucina 12 (IL-12) que contribuyen a la proliferación de poblaciones específicas de leucocitos implicados en la inmunidad antitumoral. Éstas se han utilizado en numerosos ensayos clínicos con resultados consistentes. Los resultados de la estimulación de la secreción de citocinas, tales como IFNs tipo I (INF- α , INF- β , INF- γ), TNF- α , IL-6 e IL-12, han mostrado regular a la alza algunas moléculas de superficie, como las moléculas de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), CD40, B7-1, B7-2 y MHC I y II. Los IFNs de tipo I han demostrado propiedades antitumorales complejas, incluyendo la inducción directa de la apoptosis de células cancerosas y potente mejora de las respuestas inmunitarias antitumorales a través de la estimulación de DCs. (Cheng Tao-Lin *et al.* 2013).

1.8.3. IL-2

La IL-2 recombinante es una de las citocinas empleadas en la inmunoterapia contra tumores sólidos, dado su capacidad de activar algunos sistemas citotóxicos antitumorales del huésped. La terapia con IL-2 recombinante se inició en 1984, basada en su papel como factor de crecimiento de linfocitos

IL-2 juega un papel importante en la activación de la respuesta inmune contra tumores; tiene mayor actividad antitumoral, *in vitro* e *in vivo*. Se ha demostrado que la aplicación de IL-2 estimula la actividad citotóxica de linfocitos T contra tumores y permite que se lleve a cabo el rechazo de tumores. En experimentos con células tumorales poco inmunogénicas



transfretadas con el gen de IL-2, se suprime en forma marcada el crecimiento *in vitro*. El grado de supresión del crecimiento se correlaciona directamente con la cantidad de IL-2 producida por la célula tumoral. En estos modelos se observó además, que las células efectoras que participan en el rechazo de los tumores son del fenotipo CD4+. (Barrera *et al.* 1995)

En estudios clínicos se ha demostrado que la administración de IL-2 recombinante en pacientes con cáncer, en algunas ocasiones es capaz de provocar fases de remisión. En pacientes con melanoma metastásico y carcinoma de riñón, el tratamiento con IL-2 presento un 25% de respuesta (algunos pacientes sin evidencia de tumor) (Barrera *et al.* 1995).

En pacientes con leucemia mielocítica crónica (LMC), la aplicación de IL-2 posterior al trasplante de médula ósea (TMO) mostró elevación en la actividad de células NK con reactividad hacia las células tumorales. Estos pacientes tuvieron una mejor respuesta que aquellos que no mostraron elevación de sus niveles de NK (Hauch *et al.* 1990).

La activación y propagación inducida con IL-2 sobre linfocitos no específicos, resulta en la generación de células con actividad citotóxica o Linfocitos Asesinos Activados por linfocinas (LAK), que tienen la capacidad de atacar a las células tumorales *in vitro* esta condición, creo esperanzas y llevó al establecimiento de protocolos de fase I en paciente con cáncer terminal. En pacientes con melanoma metastásico y carcinoma renal, el tratamiento con IL-2 y células LAK autólogas produjo disminución en el tamaño de los tumores (Rosenberg *et al.* 1985) sin embargo, la frecuencia de respuesta completa en estos pacientes fue solo del 15 al 20%.

A pesar de que los resultado preclínicos con el uso de citocinas con o sin células LAK, fueron al principio alentadores, la mayoría de los pacientes con cáncer no se ha beneficiado con el uso de esta forma de inmunoterapia y los efecto tóxicos colaterales supera considerablemente las pocas ganancias alcanzadas. Debido a estos inconvenientes se ha pensado en utilizar células con mayor especificidad hacia las células tumorales, conocidas como Linfocitos Infiltrantes de Tumores (TIL) y que pueden ser aisladas a partir de las células que infiltran los tumores como



parte de la respuesta inflamatoria. En pacientes con melanoma metastásico, el tratamiento con IL-2 y TIL resultó en un 50% de mejoría (Rosenberg *et al.* 1988) si bien todos estos resultados parecen alentadores, la gran mayoría de los pacientes con los tipos de cáncer más comunes como son el carcinoma de colón, de pulmón, y de mama, no se ha beneficiado con este tipo de inmunoterapia.



2. ANTECEDENTES DIRECTOS

El grupo de trabajo del Laboratorio de Oncología Celular de la FES-Zaragoza, ha demostrado la presencia de las cadenas alfa, beta y gamma del receptor para IL-2 (IL-2R) en las líneas celulares de CaCu, CALO e INBL (Rocha *et al.* 2004). Asimismo, se ha reportado que IL-2 ejerce un efecto dual sobre la proliferación *in vitro* en dichas líneas celulares y que este efecto depende de la concentración de IL-2, en donde 100UI/ml inhibe la proliferación mientras que 10UI/ml la promueven (Rangel *et al.* 2010).

Cáceres-Cortes en 2001, demuestra que IL-2 aumenta la expresión del receptor c-Kit en células de las líneas de CaCu, CALO e INBL. Y que la co-expresión de c-Kit y IL-2R en estas mismas células, disminuye los requerimientos necesarios de IL-2 externa para su proliferación.

Por otra parte Tapia Orozco en 2014, proporcionó evidencia de la existencia del mensajero para el receptor Fc neonatal (FcRn) en células de las líneas de CaCu CALO e INBL. De manera normal el FcRn se expresa en el sincitiotrofoblasto durante la etapa fetal y tiene como función principal el transporte de inmunoglobulinas (IgGs) de la circulación sanguínea materna a los capilares fetales de las vellosidades placentarias. En adultos, el FcRn prolonga la vida media de las IgGs presentes en el suero, ayudando a mantener altas concentraciones de esta clase de anticuerpos protectores en la circulación.

Asimismo, Díaz-Cupa (2014), demostró que existe inducción a la proliferación en las células de CaCu de las líneas CALO e INBL, cuando son cultivadas en presencia de diversos anticuerpos, lo que sugiere que las células de CaCu pueden estar expresando receptores de tipo Fc (FcR) en su membrana celular. Tomando en cuenta que las células epiteliales normales del endocervix expresan FcγRIII (CD16), consideramos que es probable que sea éste el receptor involucrado en el reconocimiento de anticuerpos que inducen a las células de CaCu a proliferar.



3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El CaCu es la segunda causa de muerte en el mundo. Este tipo de cáncer es un problema de salud pública muy importante en México, hasta 2002 ocupó el primer lugar entre los tumores malignos entre la población femenina. Por lo cual, actualmente se buscan alternativas para el tratamiento de este tipo de cáncer. Al respecto el Laboratorio de Oncología y Diferenciación Celular, desarrolla diferentes líneas de investigación con el fin de contribuir al conocimiento de la regulación en la proliferación de las células de CaCu. Hasta el momento se ha demostrado, la presencia del receptor para IL-2 (IL-2R), el receptor para c-Kit y el ARNm del FcRn, en las líneas de CaCu CALO e INBL. Asimismo, se cuenta con datos que indican que la proliferación de estas células se regula tanto en presencia de IL-2, como con anticuerpos dirigidos contra antígenos membranales, lo que sugiere que además de la presencia IL-2R también pueden estar presentes receptores para Fc.

Tomando en consideración que las células epiteliales normales de cérvix expresan receptores para $Fc\gamma RIII$ y FcRn, y que sabemos que existe el RNAm para la FcRn en las células de CaCu, en este trabajo se indagó sobre la posible presencia de estos receptores en la membrana celular de éstas. En caso de encontrar la presencia de estos receptores en las células de CaCu, consideramos también pertinente evaluar si la expresión de éstos, puede ser regulada por la IL-2.



4. HIPÓTESIS

Se sabe que las células de CaCu pueden ser inducidas a proliferar en presencia de IL-2 y también de diversos anticuerpos, lo que sugiere la presencia no únicamente del IL-2R, sino de receptores Fc. Además se ha encontrado que las células normales de cérvix expresan FcRn y Fc γ RIII (CD16). Por lo tanto se esperaría que las células de CaCu puedan expresar alguno de estos receptores. Por otro lado, sabemos que la IL-2 regula la expresión de varios genes relacionados con la proliferación celular, por lo que también se esperaría, que de estar presente algún receptor Fc, pueda ser regulado por esta citocina.



5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

- Identificar la presencia del receptor FcRn y FcγRIII (CD16) en las líneas celulares de CaCu CALO e INBL y evaluar la posible regulación de éstos por IL-2.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener cultivos celulares de las líneas de CaCu CALO e INBL.
- Evaluación de la posible existencia de FcRn y FcγRIII (CD16) en células de las líneas CaCu CALO e INBL.
- Cultivar ambas líneas celulares en presencia de 10 y 100UI/ml de IL-2 a 24, 48 y 72 horas para evaluar la posible regulación de los Fc.



6. METODOLOGÍA

6.1 MATERIAL BIOLÓGICO

6.1.1 LINEAS CELULARES DE CaCu

El material biológico consistió de líneas celulares de CaCu : CALO e INBL (Tabla 3), las cuales fueron obtenidas de un banco de criopreservación de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, Laboratorio de Oncología Celular de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

LÍNEA CELULAR	ORIGEN	ESTADIO CLÍNICO	VPH
CALO	Carcinoma epidermoide. Metastásico	II B	18
INBL	Carcinoma epidermoide. Metastásico	IV B	18

Tabla 3. Características de las líneas celulares de Cáncer de Cérvix (CALO e INBL) (Cáceres *et al.* 2001; Rangel *et al.* 2010).

6.2 CONDICIONES DE CULTIVO Y PROLIFERACIÓN CELULAR

Las líneas celulares de CaCu, se cultivaron en medio RPMI-1640 ^(MICROLAB) suplementado al 10% con Suero Fetal Bovino (SFB) ^(GIBCO). Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones constantes a 37°C de temperatura, con un pH de 7.0 – 7.2 y con una atmosfera húmeda saturante al 5% de CO₂ en una incubadora ^(FORM SCIENTIFIC EE.UU).

Las líneas celulares se cultivaron en botellas de 75cm³^(Corning) hasta que alcanzaron una proliferación no mayor al 75%; es decir en fase exponencial, sin llegar a la saturación del área total de la botella de cultivo. Las células tumorales adherentes fueron desprendidas del sustrato adicionando 5mL de solución de Verseno (ver Apéndice 1) y se incubaron por 5 minutos, posteriormente se transfirieron a tubos cónicos^(Axygen) de 15mL, centrifugando durante 5 minutos a 1500 rpm en una centrifuga



clínica^(BIOHAZARD) para obtener el botón celular, el cual fue resuspendido en 1 mL de medio RPMI-1640, a continuación se evaluó la viabilidad celular por exclusión con azul de Tripano^(SIGMA); estableciendo como valor mínimo de viabilidad el 95%, posteriormente se calculó la densidad celular por conteo en la cámara de Neubauer^(AMERICAN OPTICAL, U.S.A) para así obtener 1×10^6 células para cada condición a evaluar por citometría de flujo.

Las células fueron transferidas a cajas Petri^(Corning) de 100x20 mm; tratadas para cultivo en monocapa; con medio RPMI-1640 en ausencia de SFB, incubadas durante 24 horas, con el fin de sincronizarlas en G₀, para que entraran al ciclo al mismo tiempo en G₁.

6.3. TRATAMIENTO CELULAR CON IL-2 RECOMBINANTE

Los ensayos experimentales partieron de 1×10^6 células de ambas líneas celulares CALO e INBL, estas fueron cultivadas en presencia de 10 y 100 UI/ml IL-2 recombinante humana (IL-2)^(R&D systems). Los cultivos fueron mantenidos en incubación durante 24, 48 y 72 horas en presencia de la citocina. A la par, se realizaron cultivos celulares en ausencia de IL-2 para emplearlos como controles en el experimento

Los tiempos de cultivo de este ensayo se establecieron con base en trabajos previos, donde se demuestra que ambas líneas celulares, al ser estimuladas por 48hrs con 100 UI/ml de IL-2, potencializa la expresión del IL-2R funcional. Además de desencadenar la activación de vías de señalización, ya que se observa la fosforilación de tirosina-cinasa de diferentes proteínas (Rocha *et al*, 2004).

6.4. OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS

Las células mononucleares humanas fueron obtenidas a partir de una muestra de sangre periférica normal, obtenida por punción venosa, la cual fue heparinizada. La separación se realizó siguiendo el método de gradiente de Ficoll- Hypaque^(Sigma Aldrich). Estas células fueron utilizadas como control positivo en los ensayos de Citometría de Flujo.

En condiciones de esterilidad se obtuvieron 10 ml de sangre periférica, utilizando una jeringa con heparina. La sangre obtenida se centrifugó



durante 10 minutos a 1 500 rpm, para lograr separar el plasma del paquete celular. El plasma fue desechado mediante pipeteo suave, se lavó el paquete celular con RPMI-1640, adicionando un volumen de medio RPMI-1640 igual al del paquete celular, se centrifugó durante 10 minutos a 1 500 rpm, desechando el sobrenadante y resuspendió el paquete celular nuevamente en medio RPMI-1640 para obtener una mezcla homogénea. Se vertió una alícuota de 5ml de la mezcla en tubos que contenían 5 ml de Ficoll - Hypaque, teniendo extremo cuidado de no fusionar las fases, se centrifugó por 30 minutos a 3 000 rpm. Transcurrido el tiempo de centrifugado, se observaron tres fases de separación, situándose a las células mononucleares en la interfase, entre el paquete de eritrocitos, Ficoll- Hypaque y el medio de cultivo. Se colectó el halo blanco de células y se transfirió a un tubo con medio RPMI-1640 suplementado al 20 % de SFB, para realizar un lavado, se obtuvo el botón celular y se resuspendió en RPMI al 20% de SFB. Con las células obtenidas se procedió la inmunotinción para Citometría de Flujo.

6.5. CITOMETRÍA DE FLUJO

Posteriormente al tratamiento con IL-2 recombinante, se realizó un lavado con PBS, se despegaron las células del sustrato agregando Verseno y se centrifugó a 1 500 rpm durante 7 minutos. Se resuspendió en 100 μ L de PSB y se añadió 10 μ L del anticuerpo anti CD16 conjugado con FIT-C (Sigma.Aldrich®), se homogenizó suavemente la suspensión, se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad por 45 minutos. Para la detección del FcRn, se utilizó un anticuerpo anti FcRn (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) (1:500) y un anticuerpo secundario donkey anti-goat IgG FIT-C (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) (1:400). Se siguió con el protocolo establecido por el proveedor. Cumplido el tiempo de incubación se centrifugó a 3 000 rpm durante 5 minutos, el pellet celular fue resuspendido en 1 mL de PBS, se repitió el lavado 2x más. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 250 μ L de solución FACS para evaluar en un Clitómetro de Flujo FACSARIA II^{BD} Biosciences®. Los resultados fueron analizados con el software Flowing Software 2.5.1.

7. RESULTADOS

La determinación del Fc γ RIII (CD16) y FcRn se realizó mediante citometría de flujo adquiriendo 10,000 eventos por ensayo. Los datos obtenidos fueron analizados mediante el software Flowing Software 2.5.

7.1. Expresión de FcRn en leucocitos.

Como control positivo de expresión de receptores FcRn, se utilizaron leucocitos obtenidos de sangre periférica humana y se empleó como anticuerpo primario un anti-FcRn y como anticuerpo secundario un anti-goat conjugado con FIT-C. El histograma muestra en color negro células sin anticuerpo y en rojo las células positivas a FcRn (Figura 14). Se observa que un significativo número de las células expresan FcRn, pero hay un subgrupo que las expresa intensamente.

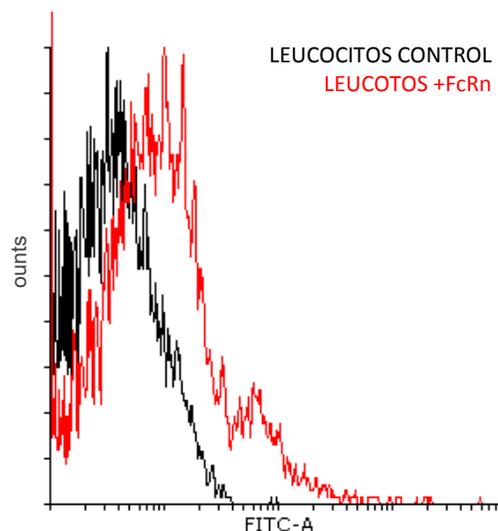


Figura 14. Expresión de FcRn en leucocitos de sangre periférica humana. El % de células positivas a FcRn es de 30.73 %.

7.2. Expresión de FcRn en líneas celulares de CaCu CALO e INBL y su regulación por IL-2.

Mediante citometría de flujo, se analizó la expresión basal del receptor FcRn, así como el efecto de 100 UI/ml de IL-2 sobre la expresión de este receptor en células de las líneas de CaCu CALO e INBL, cultivadas en ausencia y presencia de esta citocina por 48 horas. En los histogramas se muestra en color negro a las células solas (control negativo), en verde células positivas a FcRn cultivadas en ausencia de IL-2 (expresión basal) y en rojo la expresión de FcRn en células cultivadas en presencia de IL-2, tanto para CALO (Figura 15A) como para INBL (Figura 15B).

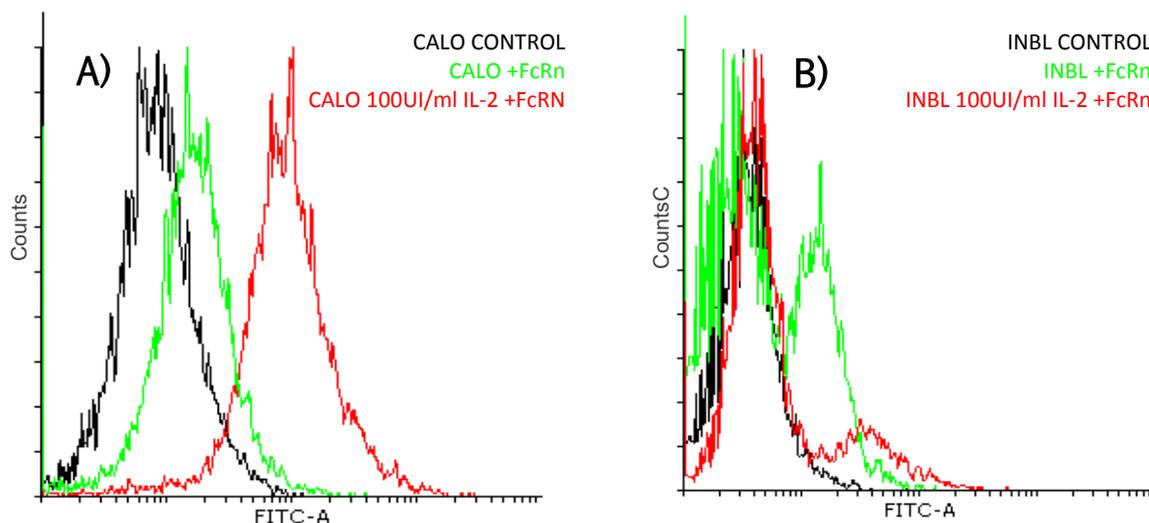


Figura 15. Expresión de FcRn en células de las líneas de CaCu CALO e INBL. Comparación en la expresión de FcRn en las células de las líneas CALO (A) e

	IL-2(-)	IL-2 (+)
CALO	51.29%	94.67 %
INBL	39.96%	46.67%

Tabla 4. % de células positivas a FcRn, en células de CaCu de las líneas CALO e INBL, cultivadas en ausencia y presencia de IL-2 por 48 horas.



Encontramos que CALO expresa constitutivamente el FcRn y que éste es fuertemente inducido por IL-2. Por su cuenta solamente una subpoblación de INBL expresa FcRn, la cual también es inducida a expresar lo por IL-2.

7.3. Expresión de Fc γ RIII (CD16) en leucocitos.

Como control positivo de Fc γ RIII se emplearon leucocitos obtenidos de sangre periférica humana. La determinación se realizó mediante citometría de flujo, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-CD16 (Fc γ RIII) conjugado con FIT-C. El histograma muestra en color negro células sin anticuerpo y en rojo las células positivas a Fc γ RIII (CD16) (Figura 16). Encontramos que en efecto hay un significativo número de células positivas a Fc γ RIII.

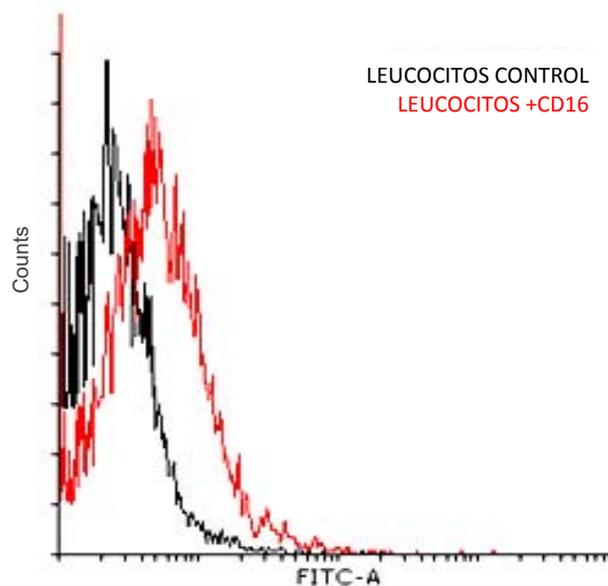


Figura 16. Expresión de Fc γ RIII en leucocitos de sangre periférica humana. El % de células positivas a Fc γ RIII (CD16) es 40.89%.

7.4. Expresión basal de Fc γ RIII (CD16) en las líneas celulares de CaCu CALO e INBL.

Una vez confirmada la especificidad del anticuerpo para reconocer Fc γ RIII en leucocitos de sangre periférica, se procedió a determinar la posible presencia de este receptor en células de las líneas de CaCu CALO e INBL, como de su regulación por IL-2.

Se analizó, mediante citometría de flujo, la expresión basal del receptor Fc γ RIII en células de las líneas CALO e INBL. El histograma muestra en color verde la expresión basal de Fc γ RIII y en color negro células sin anticuerpo. En la línea CALO no se observa presencia en la membrana celular de Fc γ RIII (Figura 17 A), mientras que sí se detecta, aunque con baja intensidad, en INBL (Figura 17 B).

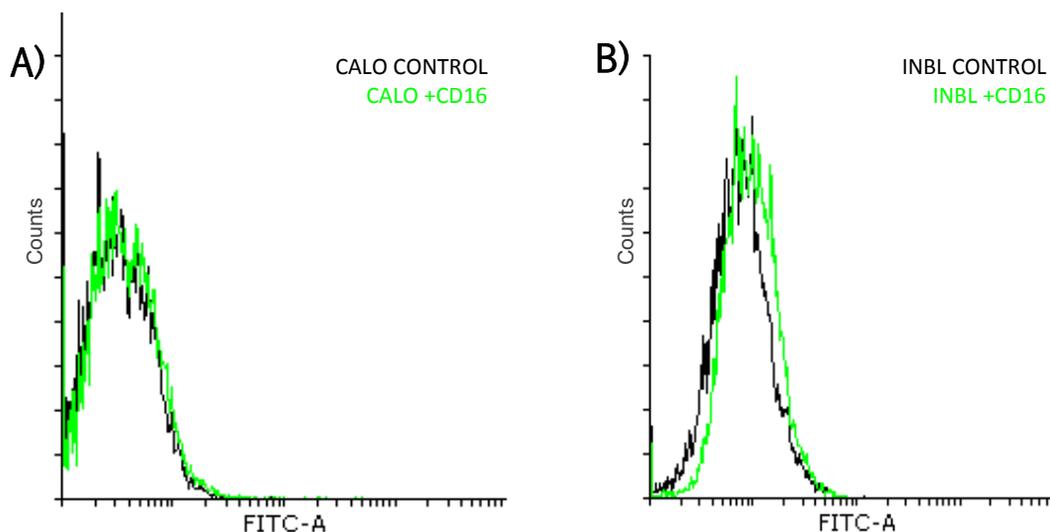


Figura 17. Expresión basal del Fc γ RIII en las líneas celulares de CaCu CALO e INBL.

	Autofluorescencia	Expresión basal Fc γ RIII	Expresión Neta de Fc γ RIII
CALO	2.58%	4.31%	1.73%
INBL	11 %	17.36 %	6.36%

Tabla 5. % de células positivas a Fc γ RIII en células de CaCu de las líneas CALO e INBL, expresión basal del receptor Fc γ RIII.



7.5. Efecto de distintas concentraciones de IL-2 sobre la expresión del receptor FcγRIII en las células de las líneas de CaCu CALO e INBL y su falta de regulación por IL-2.

Dado que hemos observado que IL-2 aumenta la expresión de FcRn en estas líneas celulares, se decidió probar si esta citocina también pudiera inducir la expresión de FcγRIII, para ello las células de ambas líneas fueron cultivadas en ausencia y presencia de 10 y 100UI/ml de IL-2 durante 24, 48 y 72 horas.

Nuestros resultados muestran que con ninguna de las dosis y tiempos de exposición de las células de CaCu a IL-2, se presentó una inducción a la expresión de FcγRIII (Figs. 18, 19 y 20). Es de llamar la atención que en la línea INBL (Figura 18, 19 y 20 B) se presentó una inhibición a la expresión del FcγRIII.

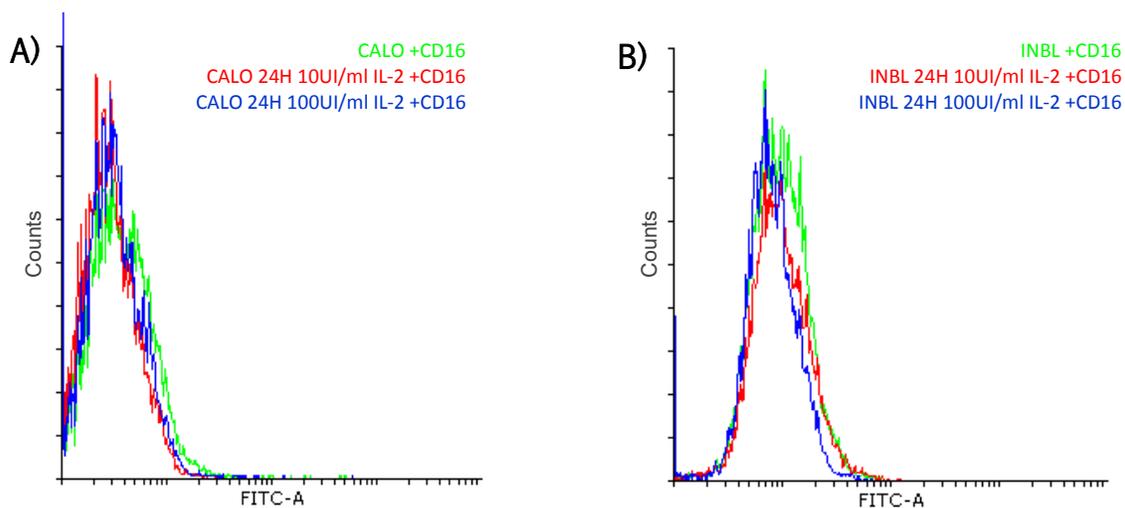


Figura 18. Comparación en la expresión de FcγRIII en células de las líneas CALO (A) e INBL (B) cultivadas por 24hrs en presencia de 10UI/ml (en rojo) y 100 UI/ml (en azul) de IL-2.

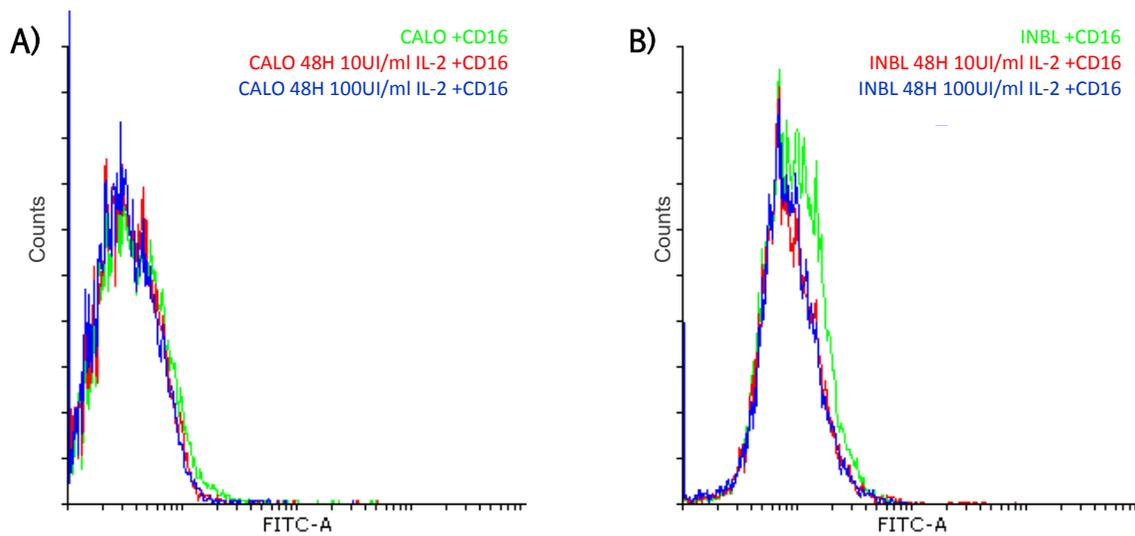


Figura 19. Comparación en la expresión de Fc γ RIII en células de las líneas CALO (A) e INBL (B) cultivadas por 48hrs en presencia de 10UI/ml (histograma rojo) y 100 UI/ml (histograma azul) de IL-2.

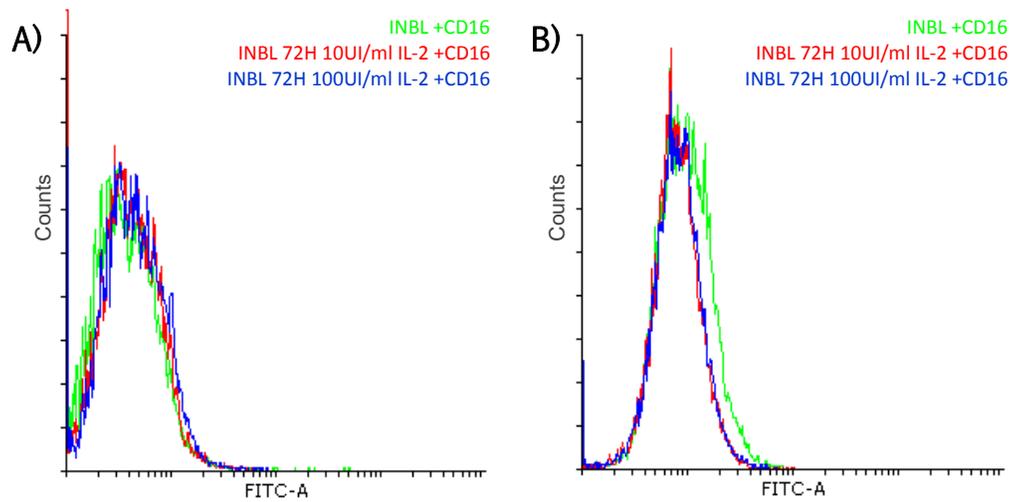


Figura 20. Comparación en la expresión de Fc γ RIII en las células de las líneas CALO (A) e INBL (B) cultivadas por 72hrs en presencia de 10UI/ml (en rojo) y 100 UI/ml (en azul) de IL-2.



8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El FcRn se ha sido descrito como un receptor que tiene como principal función el transporte de anticuerpos para evitar la degradación de estos por los lisosomas que se encuentran en la célula. Esta característica permite el paso de anticuerpos a través de barreras epiteliales, tanto para aumentar la vida media de los anticuerpos, como para ejercer una función inmunológica al presentar antígenos externos a linfocitos en el interior del órgano en cuestión. Se ha reportado que el epitelio columnar del endocérvix, como el epitelio escamoso del exocérvix, expresan FcRn lo cual les confiere una función inmunológica importante (Zili *et al.* 2011). Como el espacio exterior al cérvix, está en contacto con el medio externo, es un lugar susceptible de contener microorganismos patógenos. En consecuencia una función de las células epiteliales en esta zona, consistiría en transportar los anticuerpos que las células plasmáticas han generado en respuesta a una infección y posteriormente una vez que el anticuerpo ha interactuado con el antígeno patológico, transportarlo al interior del organismo, para que permita el reconocimiento por los linfocitos T y así montar una defensa inmunológica más efectiva.

El hecho de haber encontrado en este trabajo, que las células de las líneas de CaCu CALO e INBL expresan FcRn, nos indica que éstas en realidad provienen de un cáncer que se generó en los epitelios cervicales. El haber encontrado que todas las células de la línea CALO expresan este receptor, mientras que sólo una subpoblación de INBL lo hacen, puede indicar que esta es una característica de las células tumorales en un estadio clínico que todavía no ha metastatizado a otros órganos. En efecto CALO pertenece a un tumor en estadio IIB, mientras que INBL pertenece a un estadio metastásico IVB. Sería pertinente el evaluar otras células provenientes, ya sea de líneas celulares en diferentes estadios clínicos, o de cortes histológicos de tumores, para poder generalizar esta observación. Si la pérdida de FcRn es una característica de las células tumorales en estadios avanzados nos indicaría que están perdiendo la capacidad de transportar anticuerpos y por tanto estimular al sistema inmune. En efecto es conocido que las células tumorales desarrollan características que les



hacen escapar a la defensa inmune del organismo y así garantizar tanto su proliferación *in situ*, como facilitar la metástasis.

Una estrategia terapéutica que pudiera trascender de nuestros resultados es mediante el diseño de anticuerpos contra el FcRn, ya sea solos o unidos a elementos citotóxicos, para ser administrados a tumores de CaCu y a focos metastásicos, con la finalidad de eliminar a las células malignas que porten este receptor.

El hecho de haber encontrado que IL-2 induce significativamente la expresión de FcRn en nuestras células de origen epitelial, nos sugieren que en el epitelio normal del cérvix, cuando existe una infección, la IL-2 generada por los linfocitos infiltrados a esa zona, intensifica el transporte tanto de los anticuerpos del interior al exterior, como de los antígenos unidos a éstos del exterior al interior y así amplificar la respuesta inmunológica. Esta característica además puede explicar por qué IL-2 ha resultado ser una citocina con buenos resultados en el tratamiento de tumores de origen epitelial. Nuevamente se abre otra posibilidad de aplicación terapéutica si a los anticuerpos contra FcRn antes descritos se le adiciona la administración de IL-2.

Por otra parte el haber encontrado que el Fc γ RIII (CD16) se expresa en INBL, nos hace pensar que esta línea celular proviene de un tumor que se originó de células columnares epiteliales del endocérvix, ya que solo éstas poseen este receptor (Hussain *et al.* 1992). En efecto, mientras todas las células del cérvix ya sea escamosas o columnares, presentan receptores FcRn, sólo las columnares del endocérvix expresan el Fc γ RIII (CD16). Se ha reportado que los epitelios del endocérvix además presentan el Fc γ RII, por lo cual sería pertinente evaluar si éstos también están presentes en las células de CaCu de las líneas CALO e INBL.

Aunque las células de la línea CALO no expresaron el Fc γ RIII (CD16), se ha encontrado recientemente en nuestro laboratorio (comunicación personal con otro tesista), que en realidad todas lo expresan en el interior de la célula. En efecto al evaluar la presencia de Fc γ RIII (CD16) mediante citometría de flujo en células permeadas, todas ellas resultaron positivas a



la presencia del Fc γ RIII (CD16). Este hecho refuerza una vez más la hipótesis de que las células de CaCu provienen del endocérvix.

La teoría más aceptada actualmente del origen de los tumores de CaCu, aduce que las células escamosas del exocérvix al ser dañadas por una abrasión externa se exponen a las células basales al VPH y así comenzaba la transformación maligna (Robert *et al*, 1994). Según nuestros resultados podríamos proponer otro origen de los tumores de CaCu, consistente en que las células columnares del endocérvix al ser expuestas al espacio exterior, lo que sucede en la época fértil de la mujer, sufren una transformación metaplásica de columnares a estratificadas y es en este momento en el cual el VPH hace su infección celular. En consecuencia no son las células basales del exocérvix, que no contienen el Fc γ RIII (CD16), las cuales son infectadas y posteriormente transformadas por el VPH, sino las columnares del endocérvix que si lo poseen.

Sería recomendable el evaluar más líneas de CaCu o cortes histológicos para poder generalizar nuestra conclusión. No se descartaría que existan tumores negativos al Fc γ RIII (CD16) y que se hayan generado en el exocérvix, pero éstos serían aquellos de mucho menor frecuencia, ya que se sabe que la gran mayoría de los tumores de CaCu, se generan en la zona de transformación, el ectropión, del epitelio columnar a escamoso.

Lo que llama la atención de nuestros resultados es que IL-2 no únicamente no indujo la expresión del Fc γ RIII (CD16), sino que lo inhibió, lo cual nos hace pensar que cuando existe una infección, el cuerpo privilegia el transporte de anticuerpos y antígenos para montar una adecuada defensa inmunológica a través del FcRn, que la ingestión, degradación y presentación de los anticuerpos por el Fc γ RIII (CD16) de las mismas células epiteliales, dejando esta función a las células dendríticas y macrofágas que también se encuentran presentes en la zona.



9. CONCLUSIONES

- Las líneas celulares de CaCu CALO e INBL expresan de manera basal el receptor FcRn, siendo CALO quien expresa mayor cantidad del receptor.
- Solo INBL expresa de manera basal FcγRIII (CD16).
- Las líneas de CaCu en presencia de IL-2 aumentan significativamente la expresión del receptor FcRn, pero no del FcγRIII.



10. PERSPECTIVAS

- Evaluar la presencia del FcRn y FcγRIII (CD16) en células permeabilizadas de las líneas CALO e INBL.
- Evaluar más líneas de CaCu o cortes histológicos para corroborar la presencia de FcγRIII (CD16) o FcRn.
- Evaluar mediante microscopía electrónica la ubicación de los receptores Fc en las células de CaCu.



11. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas A. Lichtman A. Pillai S. (2008). Inmunología celular y molecular. 6ª Edición. Editorial Saunders Elsevier. México.
- Aguilar Solis Eduardo Daniel. (2014). Dilucidación de la vía apoptótica ejercida por IL-2 en las líneas celulares de Carcinoma de Cérnix CALO e INBL. Tesis de Licenciatura. FES ZARAGOZA.UNAM.
- Alarcón Romero L.C. (2006). Expresión de marcadores de proliferación y regulación en lesiones pre malignas y carcinoma cervical con infección por virus del papiloma humano. Doctorado en Ciencias Químico biológicas. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional.
- Barrera R, R. Peralta Z, O. Madrid M, V. (1995). Bases Moleculares de la inmunología del Cáncer. Salud Pública Mex. Vol. 37(4):344-353.
- Bermúdez M, V, H. Peralta Z, O. Madrid M, V. (2005). Terapia génica con citocinas contra cáncer cervicouterino. Salud Pública Méx. Vol. 47(6): 458-468.
- Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. (2010). Classification of Papillomaviruses (PVs) based on 189 types and proposal of taxonomic amendments. Virology; 401:70-79.
- Blank U, Launay P, Benhamou M, Monteiro RC. (2009). Inhibitory ITAMs as novel regulators of immunity. Immunological Reviews.232:59-71.
- Bosch FX, Broker TR, Forman D, Moscicki AB, Gillison ML, Doorbar J, et al. (2013). Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. Vaccine; 31:F1-F3.
- Burd E.M. (2003). Human papillomavirus and cervical cáncer. Clinical microbiology Reviews; 16: 1-17.
- Cáceres Cortes J; Alvarado Moreno J; Waga K; Rangel Corona R; Monroy García A. (2001). Implication of tyrosine kinase receptor and Steel factor in cell density dependent growth in cervical canceres and leukemias. Cancer Research: 6181-6289.
- Castellsagué X. (2008). Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. Gynecol Oncol. 110.S4-7.



- Castro J, M, A. Vera C, L, M. Posso V, H, J. (2006). Epidemiología del cáncer de cuello uterino: estado del arte. *Rev Colomb Obstet Ginecol.* 57(3): 182-189.
- Chaudhury C, Mehnaz S, Robinson JM, et al. The major histocompatibility complex-related Fc receptor for IgG (FcRn) binds albumin and prolongs its lifespan. *J Exp Med* 2003; 1997: 315-322.
- Chavarro V.N, Hernández A.G., Alcázar L.P., Muruchi G.G.W; Zuñiga P. I. (2009). Cáncer cervicouterino. *Anuales de Radiología México;* 1:61-79.
- Chen J, M Wang C, M. Ma C, C. Luo S, F. Edberg J, C. Kimberly R, P. (2006). Association of a transmembrane polymorphism of Fc gamma receptor IIb (FCGR2B) with systemic lupus erythematosus in Taiwanese patients. *Arthritis Rheum;* 54:3908-17.
- Cheng-Tao Lin; Cha-Nin Wang, Chyong-Huey Lai. (2013). Immunotherapy for advanced or relapsed cervical cancer. *Gynecology and Minimally Invasive Therapy* 2(2013)3-7.
- Cid Arregui A. (2009). Therapeutics vaccines Against Human Papillomavirus and cervical cancer. *The open virology journal.* 3:67-83.
- Compendio del Registro Histopatológico de las Neoplasias Malignas en México. (1998).Secretaría de Salud. Dirección General de Epidemiología.
- Cooper G; Hausman R; (2007). *The Cell: A molecular approach.* 4ª edición. Sinauer Associates Inc. Editorial.. United States of America
- Curfs J, H. Meis J, F. Hoogkamp K. (1997). A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev.* 10:742-780.
- Daniel P. Stites; Abba I. Terr; Tristram G. Parslow. (2003). *Inmunología Básica Y Clínica.* 10ª Edición. Manual Moderno. 1026.
- Derry, C; Roopenian &Sheerman Akilesh. (2007). FcRn: the neonatal Fc Receptor come of age. *Nature Reviews Immunology,* 715-725.
- Díaz Cupa Alondra. (2014). El papel de los receptores Fc (FcR) en las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL Tesis de Licenciatura. FES ZARAGOZA. UNAM.



- DiSaia P.J. (2002). *Oncología Ginecológica Clínica*. 6a ed. Madrid, España.
- Dueñas-Gonzalez A, Cetina L, Coronel J, Martínez-Banos D. (2010). Pharmacotherapy options for locally advanced and advanced cervical cancer. *Drugs*. 70(4):403-432.
- Eccles SA. (2001). Monoclonal antibodies targeting cancer: magic bullets or just the trigger? *Breast Cancer Res*; 3: 86-90.
- Einstein M, H. Novetsky A, P. Garg M. (2007). Survival and toxicity differences between 5-day and weekly cisplatin in patients with locally advanced cervical cancer. *Cancer*. 109:48.
- Fainboim L. Geffner J. (2011). *Introducción a La Inmunología Humana*. 6ª Edición. Medica Panamericana. 584 pp.
- Fernando J, Kumar S, (2015). *Principles of cancer treatment by immunotherapy*.
- Gissmann L, Boshart M, Dürst M, Ikenberg H, Wagner D, zur Hausen H. (1984). Presence of human papillomavirus in genital tumors. *J Invest Dermatol*. 83:26S-28S.
- Gómez Dantés H., Vázquez Martínez J.L. y Fernández Cantón S. (2003). Detección de cáncer cérvicoúterino en las mujeres derechohabientes del IMSS. Resultados de la Encuesta Nacional de Salud, 2000:1-11
- Gorini G, Ciotti MT, Starace G, Vigneti E, Raschella G (1992) Fc gamma receptors are expressed on human neuroblastoma cell lines: lack of correlation with N-myc oncogene activity. *Int J Neurosci* 62:287-297
- Guyton-Hall. (2001). *Tratado de Fisiología Médica*. 10ª Edición. Mc Graw Hill.
- Hanahan D.; Weinberg R. (2011). *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell 144.Elsevier Inc.
- Hauch M. Gazzola M, V. Small T. Bordignon C. Barnett L. (1990). Anti-leukemic potential of interleukin- 2 activated natural killer cells after bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 75:2250-2262.



- Hernández U, M, A. Alvarado N, A. (2001). Interleucinas e inmunidad innata. *Rev Biomed*; 12:272-280.
- Hickman C, P. Roberts L, S. Larson A. l'Anson H. & Eisenhour D, J. (2006). *Principios Integrales De Zoología*. 13ª Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid.
- Hogarth P, M. Pietersz A, G. (2012). Fc receptor-targeted therapies for the treatment of inflammation, cancer and beyond. *Nature Reviews. Drug Discovery*. Vol 11: 311-331.
- Howley PM. Warts. (2006). Cancer and ubiquitylation: lessons from the Papillomaviruses. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 117:113-127.
- <http://webcindario.com/31.html>
- <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
- Hussain, L. A., Kelly, C. G., Fellowes, R., Hecht, E. M., Wilson, J., Chapman, M., & Lehner, T. (1992). Expression and gene transcript of Fc receptors for IgG, HLA class II antigens and Langerhans cells in human cervico-vaginal epithelium. *Clinical and Experimental Immunology*, 90(3), 530-538
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2013). Estadísticas a propósito del Día Mundial contra el Cáncer (en línea). Febrero (14 Agosto 2014).
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 61(2): 69-90.
- Jhingran A. Abeloff: *Abeloff's Clinical Oncology*. (2008).4th. Ed. Chap. 91. Cancers of the cervix, vulva, and vagina.
- Jones S, L. Lindberg F, P. Brown E, J. (1999). Phagocytosis. In: *Fundamental Immunology*. Paul WE. Lippincott-Raven Publishers; Philadelphia p. 997-1020.
- Junghans R (1997) Finally! The Brambell receptor (FcRN). *Immunol Res*: 29-57.
- Kane MA. Preventing cancer with vaccines: progress in the global control of cancer. (2012). *Cancer Prev Res (Phila)* 5:24- 29.
- Koolman, J., Roehm, K.H. (2005). *Color Atlas of Biochemistry*. 2ª Edición. Editorial Thiem.



- Landoni F, Maneo A, Colombo A, et al. (1997). Randomized study of radical surgery versus radiotherapy for stage Ib-IIa cervical cancer. *Lancet*; 350:535-40.
- Langer AB, Emmanuel N, Even J, Fridman WH, Gohar O, Gone B, Katz BZ, Ran M, Smorodinsky NI, Witz IP (1992) Phenotypic properties of 3T3 cells transformed in vitro with polyoma virus and passaged once in syngeneic animals. *Immunobiology* 185:281-291.
- Lencer WI, Blumberg RS (2005). A passionate kiss, the run: exocytosis and recycling of IgG by FcRn. *Trends Cell Biol* 15:5-9.
- Lin E, Calvano S, E. Lowry S, F. (2000). Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery*. 127:117-126. 02.
- Liu Y, Masuda E, Blank M, C. Kirou K, A. Gao X, Park M and Luminita Pricop. (2005). Cytokine mediated regulation of activating and inhibitory Fc receptors in human monocytes. *Journal of Leukocyte Biology* Volume 77.
- López A; Lizano M; (2006). Cáncer cérvicoúterino y el virus del Papiloma humano: la historia que no termina. *Cancerología* (1ª Ed.) México: Instituto Nacional de Cancerología. Pp. 31-35
- López M, Escobar A, Alfaro J, Fodor M, Larrondo M, Ferrada C, Salazar O, F. (2004). Avances en inmunoterapia celular contra el melanoma maligno. *Rev Méd Chile*; 132: 1115-1126..
- Mark Schiffman MD. (2007). Integration of human papillomavirus vaccination, cytology, and human papillomavirus testing. *Cancer*. 111(3):145-53.
- Martín A, S. Bermejo B, P. (2011). Inmunoterapia y tratamiento oncológico. Una estrategia prometedora.. Septiembre-Octubre. *Offarm* Vol. 30. Núm.05
- Martinic M, von Herrath, MG. (2008). Novel strategies to eliminate persistent viral infections. *Trends Immunol*. 29:116-24.
- Mayordomo J, I. Cajal R, A. Tres A, García P, M, D. (1999). Terapia Biológica del cáncer. En: Cortés-Funes H, Díaz-Rubio E, García-Conde J, Germà Lluch JR, Guillem Porta V, López López JJ, Moreno Nogueira JA, Pérez Manga G, eds. *Oncología Médica*. (1ª ed.). Biblioteca Aula Médica.. Madrid



- Meneses García A., Ruiz Godoy L.M., Beltrán Ortega A., Sánchez Cervantes F., Tapia Conyer R., Mohar A. (2012). Principales neoplasias malignas en México y su distribución geográfica (1993-2002). *Revista de investigación Clínica*. Vol.64, Núm. 4. pp 322-329.
- Minami Y, Kono T, Miyazaki T, Taniguchi T (1993). The IL-2 receptor complex: its structure, function and target genes. *Annu Rev Immunol*, 11:245-267.
- Ministerio de Salud. Comisión Nacional de Cáncer Cérvico úterino. Diagnóstico y Tratamiento Cáncer Cérvico Uterino. (2004). Chile.
- Monk B, J. Pandite L, N. (2011). Survival data from a phase II, open-label study of pazopanib or lapatinib monotherapy in patients with advanced and recurrent cervical cancer. *J Clin Oncol*. 29:4845.
- Monteiro R, C, Van de Winkel J, G, J. (2003). IgA Fc receptors. *Annu Rev Immunol*. 21: 177-204.
- Motoyama S., Ladine L.C.A., Villanueva S.L. and Maruo T. (2004). The role of human papillomavirus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J. Med Sci*; 50:9-19.
- Münger K. Baldwin A., Edwards K.M., Hayakawa H., Nguyen C.L., Owens M., Grace M. and Huh K.W. (2004). Mechanism of human papillomavirus-induced oncogenesis. *Journal of virology*; 78: 11451-11460.
- Murphy CR. (1995). The cytoskeleton of uterine epithelial cells: a new player in uterine receptivity and the plasma membrane transformation. *Hum Reprod Update*. 1:567-580.
- Murphy K; Traver P; Walport M. (2009). *Inmunología de Janeway*. 7ª Edición. Mc Graw-Hill Interamericana Editores. México.
- Neauport-Sautes C, Daeron M, Teillaud JL, Blank U, Fridman WH (1986) The occurrence, structural and functional properties of immunoglobulin Fc receptors on murine neoplastic cells. *Int Rev Immunol* 1:237-271
- Nimmerjahn F; Ravetch J. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune response. *Nature Reviews, Immunology*, 8: 34-47.
- Nimmerjahn F; Ravetch J.(2007). Antibodies, Fc receptors and cancer. *Current Opinon in Immunology*, 19:239-245.



- Passarge E. (2004). Genética: Texto y Atlas. Segunda Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Patyka, M., Malamud, D., Weissman, D., Abrams, W. R., & Kurago, Z. (2015). Periluminal Distribution of HIV-Binding Target Cells and Gp340 in the Oral, Cervical and Sigmoid/Rectal Mucosae: A Mapping Study. *PLoS ONE*, 10(7), e0132942. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0132942>
- Pecorelli S, Zigliani L, Odicino F. (2009). Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix. *Int J Gynaecol Obstet*. 105(2):107-108.
- Rangel-Corona R; (2003). Inmunoterapia del Cáncer. VERTIENTES. Revista Especializada en Ciencias de la Salud, 6(1):58-62.
- Rangel-Corona R; Corona-Ortega, T; Soto-Cruz I; López-Labra A; Pablo-Arcos T; Torres-Guarneros C; Weiss-Steider B; (2010). Evidence that cervical cancer cells secrete IL-2; which becomes an autocrine growth factor. *Cytokine*; 50:273-277.
- Ravetch, J.V. Bolland, S. (2001) IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 19, 275-290
- Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas. (2003). México.
- Robert L. Ehrmann Igaku. (1994). Benign to malignant progression in cervical squamous epithelium. Author: Shoin Medical Publishers, Inc., New York and Tokyo. 256 pages.
- Rocha Z, Huitron C, Cacéres C, Alvarado M, Valle M, soto C, Weiss S y Rangel C. (2004). Interleukin-2 (IL-2) receptor- $\beta\gamma$ signaling is activated by c-kit in the absence of IL-2, or by exogenous IL-2 via JACK3/STAT5 in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Elsevier Cellular Signaling*. 16: 1239-1247.
- Roitt I; Delves P; Martin S; Burton D. (2006). *Inmunología Fundamentos*. 11ª Edición. Editorial Panamericana. España. 559 pp.
- Rojas. Apodaca, G. (2002). Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells.
- Rose R; Milgrom F; Van O, Carel J. (1983). *Principios De Inmunología*. 1ª Edición. Compañía Editorial Continental. 653 pp.



- Rosenberg S, A. (1988). The development of new immunotherapies for the treatment of cancer using interleukin-2. *Ann Surg.* 208: 121-35.
- Rosenberg S, A. Lotze M, T. Muul L, M. Leitman S. Chang A, F. Ettinghausen S, E. (1985). Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med.* 313:1485-1492.
- Rosenberg S, A. Packard B, S. Aebersold P, M. Solomon D. Topalian S, L. Toy S, T. (1988). Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 319:1676-1680.
- Rosenberg S, A. Spiess P. Lafreniere R. (1986). A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science.* 233: 1318-21.
- Ruiz-Alonso A; Rodríguez-Gallego; Sáez-Bravo L; Lara-Jiménez P. (2004). Hormonoterapia e Inmunoterapia del Cáncer. *BioCancer Research Journal.* 1:1-14.
- Sadelain M, Rivière I, Brentjens R. (2003). Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. *Natl Rev Cancer.*3:35-45.
- Sanabría N, J, G. Fernández M, Z, C. Cruz H, I, C. Oriolo P, L. Llanuch L, M. (2011). El cáncer cervicouterino y las lesiones precursoras: revisión bibliográfica. *Rev Ciencias Médicas.* Vol 15. Núm.4 Pinar del Río.
- Schiffman M, Castle PE. (2003). Human Papillomavirus: Epidemiology and Public Health. *Arch Pathol Lab Med* 127:930-934
- Serman F. (2002). Cáncer cérvico úterino: Epidemiología, historia natural y rol del virus del papiloma humano. *Perspectivas en prevención y tratamiento.* *Rev Chil Obstet Ginecol;* 67:4: 318-323.
- Soler-Gómez M.D; Garces-Honrubia V; Zorilla-Ayllón I. (2007). Cáncer y cuidados enfermeros. Ediciones Difusión Avances de Enfermería. Madrid, España.
- Sommer C, White F, and Pain, Beaulieu P, Lussier D, Porreca F *et al.* (2010) Cytokines, Chemokines .*Pharmacology of Pain.* 1st Ed, Seattle, IASP Press,;279-302.



- Stevens G, Dias RH, Thomas KJA, Rivera JA, Carvalho N, Barquera S, et al. (2008) Characterizing the Epidemiological Transition in Mexico: National and Subnational Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors. PLoS Med 5(6): e125. doi:10.1371/journal.pmed.0050125.
- Sun PD. Structure and function of natural-killer-cell receptors. (2003). Immunol Res; 27: 539-48.
- Takai T. (2002). Roles of Fc Receptors in Autoimmunity. Nature. 2: 580-592.
- Takai T. (2005). Fc Receptors and Their Role in Immune Regulation and Autoimmunity. Journal of Clinical Immunology. 25(1):1-18.
- Tapia Orozco Luis Omar. (2014). Expresión de FcRn en las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL. Tesis de Licenciatura. FES ZARAGOZA.UNAM
- Toes R, E. Ossendorp F. Offringa R. Melief C, J, M. (1999). CD4 T cells and their antitumor immune responses. J Exp Med. 189:753-756.
- Tortora G. J; Funke B. R; Case C. (2007). Introducción a la Microbiología. Editorial Médica Panamericana.. Buenos Aires. Argentina.
- Urbano L; Álvarez R.E., y Acosta C.P. (2007). Virus del Papiloma Humano: Infección y enfermedad. Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud, universidad del Cauca, Colombia; 1-10.
- Vey N, Viens P, Fossat C, Olive D, Sainty D, Baume D. (1997). Clinical and biological effects of gamma interferon and the combination of gamma interferon and interleukin-2 after autologous bone marrow transplantation. Eur Cytokine Netw. 8: 389-94.
- Warren JB, Gullett, H, King V. Cervical Cancer Screening and Update Guidelines. (2009). Primare Care: Clinics in Office .Practice 2009; 36.
- Yoshikazu O, Yumiko T, Masato N. MR Imaging of the Uterine Cervix: ImagingPathologic Correlation. Radiographics 2003; 23: 425-45
- Zhang J, M. (2007). Cytokines, inflammation, and pain. Int Anesthesiol Clin. 45:27-37



-
- Zili L, Senthilkumar P, Rongyu Z, Wenbin T, Derry C, and Xiaoping Z. (2011). Transfer of IgG in the female genital tract by MHC class I-related neonatal Fc receptor (FcRn) confers protective immunity to vaginal infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108(11): 4388-4393
 - Zur Hausen H. (1977). Human papillomavirus and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol*; 78:1-30.
 - Zusman T, Lisansky E, Arons E, Anavi R, Bonnerot C, Sautes C, Fridman WH, Witz IP, Ran M (1996). Contribution of the intracellular domain of murine Fc-gamma receptor type IIb1 to its tumor-enhancing potential. *Int J Cancer* 68:219-227.



APENDICE I

Reactivos y Soluciones utilizados

Soluciones para cultivo

- ❖ RPMI-1640
- ❖ Suero Fetal Bovino (SFB)
- ❖ Solución fisiológica de Verseno
- ❖ Solución de Fosfatos (PBS)

APENDICE II

Preparación de Reactivos y Soluciones

❖ Desactivación del Suero Fetal Bovino (SFB)

El Suero Fetal Bovino ^(Gibco) se deja descongelar a temperatura ambiente, una vez descongelado, se pasa a un baño de agua a 57°C durante 30 minutos. Esto se hace para inactivar proteínas de bajo peso molecular que pueden interferir con el crecimiento celular.

❖ Solución Fisiológica de Verseno

Esta solución se emplea para desprender las células tumorales adherentes y funciona como agente quelante que secuestra iones de calcio y magnesio de las uniones celulares. Para su preparación se usan los siguientes reactivos:

- | | |
|--------------------------------------|--------|
| ○ Tris base | 3.04 g |
| ○ Cloruro de Sodio | 8.00g |
| ○ Cloruro de Potasio | 0.04g |
| ○ Etilen-diamen-tetra-acético (EDTA) | 0.40g |

Los reactivos se disuelven en 800ml de agua bidestilada, se ajusta el pH a 7.7 con HCL 1M y se afora a 1000ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de autoclave a 20lbs durante 20min.



❖ Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS)

Se utiliza para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato. Los componentes se diluyen en un volumen final de 1 litro de agua bidestilada.

○ Cloruro de Magnesio	0.10g
○ Cloruro de Calcio	0.10g
○ Cloruro de Sodio	8.00g
○ Cloruro de potasio	0.20g
○ Fosfato monoácido de sodio	2.16g
○ Fosfato diácico de potasio	0.20g

El cloruro de magnesio y de calcio se disuelven en 100ml de agua bidestilada y después se adicionan los 100ml que contenga el magnesio y de calcio. Se ajusta el pH a 7.2-7.7 utilizando HCL 8N y se afora finalmente a un volumen final de 1000ml. Esta solución se esteriliza por medio de autoclave a 20lbs durante 20 min, la solución se almacena a 4°C hasta el momento de su uso.