

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

Laboratorio de Oncología Molecular

UMIEZ

“Patrón de fosforilación en tirosina en dos líneas tumorales de Leucemia Mieloide Aguda en la proliferación inducida por la proteína MICB. Participación de la cinasa PI3K y de las proteínas adaptadoras VAV y GRB2”.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E T A:

REYNA GONZÁLEZ ORNELAS

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JORGE FLAVIO MENDOZA RINCÓN

México D.F. 2010





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.



*EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO 9
DE ONCOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIDAD
MULTIDICIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN DE LA FACULTAD DE
ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA" UNAM, BAJO LA DIRECCIÓN
DEL DR. JORGE FLAVIO MENDOZA RINCÓN.*

*DURANTE LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO SE CONTÓ CON
EL APOYO ECONÓMICO DE UNA BECA DE LICENCIATURA EL
PROYECTO RECIBIÓ APOYO FINANCIERO DE PAPITT CLAVE [IN-
2213093].*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón, por permitirme participar en su proyecto.

A la Dra. Isabel Soto Cruz y Dr. Arturo Valle Mendiola por su invaluable e incondicional apoyo en cuanto a la realización de las técnicas empleadas, así como a la paciencia que me tuvieron.

A los sinodales del jurado por sus aportaciones para la realización de este trabajo:

Dr. Benny Weiss Steider

Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón

M. en B.E. Enrique Mendieta Márquez

Q.F.B. Rocio Breceda Hernández

M. en C. Yolanda Córdova Galaviz

DEDICATORIA

- ☺ *A mi padre por creer en mí, por su inmensa confianza y apoyo moral que desde pequeña me impulsó a estudiar y realizar uno de los logros más importantes en mi vida.*
- ☺ *A mi mamá, Cecy, Víctor y Armando porque son parte de mi vida, gracias por su apoyo, los quiero mucho.*
- ☺ *A Javier por tantas risas, comprensión y amor.*
- ☺ *A mis amigas Karina, Paola, Rebeca, Blanca por escucharme siempre y por sus consejos.*
- ☺ *Y de una manera especial a mi hija Sophia porque todo el esfuerzo siempre fue pensando ti. Eres el tesoro maspreciado en mi vida.*

▣ TABLA DE CONTENIDO

- 1. **RESÚMEN...1**
- 2. **MARCO TEÓRICO...2**
 - o 2.1. Generalidades del Cáncer...2
 - 2.1.2. *Las células tumorales...2*
 - o 2.2. Cáncer en México...3
 - o 2.3. Leucemias...3
 - 2.3.1. *Leucemia Mieloide Aguda (LMA)...4*
 - 2.3.2. *Clasificación...5*
 - 2.3.3. *Los 5 subtipos de LMA según la OMS...6*
 - 2.3.4. *Síntomas...6*
 - 2.3.5. *Epidemiología...7*
 - 2.3.6. *Etiología...7*
 - 2.3.7. *Patofisiología...8*
 - 2.3.8. *Tratamiento...8*
 - o 2.4. Cultivos celulares...9
 - o 2.5. Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC)...11
 - 2.5.1. *Características generales de los genes del MHC...12*
 - 2.5.2. *Características bioquímicas y estructurales de las moléculas MHC...12*
 - 2.5.3. *Presentación antigénica...13*
 - 2.5.4. *Inhibición de células NK...13*
 - 2.5.5. *Las Moléculas MHC de clase I...13*
 - 2.5.6. *Las Moléculas MHC de Clase I no clásicas...14*
 - o 2.6. Los genes MIC...14

- 2.6.1. Tipos celulares donde se expresan MIC...15
 - 2.6.2. Las proteínas MIC y la respuesta inmune de células NK y linfocitos T...16
 - o 2.7. NKG2D: un receptor para las proteínas MICA y MICB...17
 - 2.7.1. Otros ligandos descubiertos para el receptor NKG2D...18
 - o 2.8. Mecanismos del sistema inmunológico...20
 - o 2.9. Importancia fisiológica y farmacológica de la señalización celular...21
 - o 2.10. Señalización en cascada ruta del ligando receptor y proteínas...23
 - o 2.11. Señalización intracelular por receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTK'S)...26
 - o 2.11.1. Ras y cascada de ERK's...28
 - o 2.12. SOS...30
 - o 2.13. GAP-RAS...30
 - o 2.14. Fosfatidilinositol-3' Cinasa (PI3K)...30
 - o 2.15. Proteína activada por las MAP- Cinasas...31
 - o 2.16. GRB2...31
 - o 2.17. SOS Interacción con Ras...32
 - o 2.18. VAV...33
- 3. **JUSTIFICACIÓN...34**
 - 4. **HIPÓTESIS...35**
 - 5. **OBJETIVOS...36**
 - o 5.1. Objetivo general...36
 - o 5.2. Objetivos particulares...36
 - 6. **DISEÑO EXPERIMENTAL...36**
 - 7. **MATERIAL Y MÉTODOS...37**
 - o 7.1. Método completo...37
 - o 7.2. Diagrama de flujo...39
 - 8. **RESULTADOS...40**
 - 9. **ANÁLISIS DE RESULTADOS...45**
 - 10. **CONCLUSIONES...50**

- 11. **PERSPECTIVAS...51**
- 12. **APÉNDICE...52**
- 13. **BIBLIOGRAFÍA CITADA...55**

■ ■ ■ ■ **Palabras clave:**

- *MIC (complejo mayor de histocompatibilidad clase I)*
- *MICA (complejo mayor de histocompatibilidad clase I A)*
- *MICB (complejo mayor de histocompatibilidad clase I B)*
- *Py (fosfotirosina)*
- *PI3K (fosfatidil inositol 3 cinasa)*
- *GRB2 (growth factor binding protein)*
- *SOS (Son of sevenlees)*
- *MAPK (mitógenos activados por proteínas cinasas)*
- *MHC (complejo mayor de histocompatibilidad)*
- *HLA (antígeno leucocitario humano)*
- *IFN (interferon)*
- *NK (natural killer)*
- *NKG2D (natural killer group 2, member D)*
- *CMV (citomegalovirus humano)*
- *ERK (cinasas reguladas por señales extracelulares)*
- *PLC (fosfolipasa C)*
- *RE (retículo endoplasmico)*
- *RTK's (receptores de tirosina kinasa)*
- *GPCR's (receptores acoplados a proteínas G)*
- *EGF (factor de crecimiento epidérmico)*

1. RESÚMEN

La palabra "cáncer" describe un grupo heterogéneo de estados patológicos en que las células comienzan a multiplicarse sin control e invadir en órganos vecinos. Hay más de un centenar de cánceres, resultado de la expansión incontrolada de alguna de las células que componen nuestro organismo. Pese a tamaña diversidad, todos comparten idéntico mecanismo: la pérdida de control de los genes responsables de que se produzca una ordenada proliferación celular. Relacionados con el control de la división celular se hallan los genes que determinan proteínas encargadas de activar la proliferación celular durante el desarrollo embrionario, la morfogénesis, la regeneración de células muertas, la curación de heridas. La búsqueda de los mecanismos moleculares subyacentes en el cáncer, llevó a la identificación de un grupo de 50 genes que se asocian con el desarrollo de tumores y neoplasias. Estos oncogenes resultaron ser versiones alteradas de genes celulares que, en su condición normal, regulan la proliferación celular. A los genes normales que sirven como precursores de las versiones alteradas se les denominó proto-oncogenes, y a sus versiones alteradas, oncogenes. Las mutaciones de algunos oncogenes producen la sobreexpresión de formas normales o silvestres de proteína, como ocurre con el factor de transcripción c-myc, identificado en leucemias. En otros oncogenes las mutaciones generan proteínas con alteraciones que les confieren una ganancia de función, manteniéndolas activas por periodos prolongados o en forma permanentemente activa, tal es el caso del oncogén ras, presente en más del 50 por ciento de los tumores humanos, o de c-Abl, identificado en leucemias. En la actualidad se ha visto que SOS está implicado en la activación de vías de señalización intracelulares dependientes de la cinasa PI3K, promoviendo la señalización mitogénica mediada por la proteína adaptadora GRB2. Los receptores con función de tirosina cinasa juegan un papel importante en la integración e interpretación de estímulos externos y permiten a la célula interactuar adecuadamente con su ambiente, acoplado las señales externas con vías de señalización internas. Alteraciones en la expresión y activación de receptores tirosina cinasa, así como sus ligandos y moléculas de señalización intracelular juegan un rol fundamental en el desarrollo de cáncer. Resultados generados en nuestro grupo de trabajo nos han permitido demostrar que MICA/MICB son secretadas en forma soluble al medio de cultivo de células derivadas de cáncer de cervix y en líneas de células leucémicas humanas. Más interesante ha sido comprobar que estas proteínas manifiestan un efecto proliferador sobre las células tumorales empleadas en nuestro sistema. Por consiguiente, en este proyecto nuestro interés se centró en conocer si este mecanismo autócrino proliferativo de MICB tiene efecto

sobre los mecanismos de señalización intracelular que se activan en las células leucémicas. Consideramos que estos estudios nos estarán sugiriendo otra función no reportada en la biología de las proteínas MICB así como de las vías de señalización, lo que representaría una contribución muy importante de este proyecto ya que de esta manera los resultados permitirían proponer una estrategia tumoral de escape inmunológico, ya que no únicamente estas proteínas están participando en la inhibición del tumor vía la secreción de las formas solubles de MICA/MICB sino adicionalmente tienen un efecto mitogénico sobre las mismas células tumorales.

1. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades del cáncer

Un rasgo principal de todos los organismos eucariontes superiores a lo largo de su vida útil, es dividir las células somáticas a partir de su forma individual, cuyo crecimiento y división están sumamente regulados, las células cancerígenas proporcionan una excepción notable, que surge como la división mitótica que ha perdido su control de crecimiento habitual^[1].

El cáncer es una enfermedad, resultado de una serie de mutaciones somáticas y en ciertos casos también de una predisposición hereditaria^[2]. Su capacidad de crecer en posiciones inadecuadas o dividirse indefinidamente puede ser mortal para el organismo en el cual ocurre^[1]. Existen varios oncogenes que pueden activarse por mutaciones puntuales que originen la sustitución de aminoácidos en puntos críticos de una proteína que pueden promover neoplasias^[2].

Las funciones celulares son controladas por proteínas codificadas por DNA que esta organizado en genes y en los estudios moleculares han demostrado que el cáncer es un paradigma de una enfermedad genética adquirida^[2].

2.1.2. Las células tumorales

Los tumores surgen con mucha frecuencia, especialmente en animales y humanos de edad avanzada, muchos de ellos plantean poco riesgo al organismo si están localizados, éstos se denominan benignos. Los tumores se convierten en una amenaza para la vida si se diseminan por todo el cuerpo. Estos tumores son los denominados malignos y son la causa del cáncer. Los tumores benignos solamente se convierten en un grave problema médico si interfieren con las funciones normales del organismo o si secretan sustancias biológicamente activas tales como hormonas porque provocan un desequilibrio metabólico^[3].

La característica que más diferencia los tumores malignos de los benignos es la capacidad de invadir y la de diseminarse, esta característica es denominada: metástasis^[4,6]. La metástasis es un proceso que implica la invasión por el tumor local seguido de la diseminación y el restablecimiento en sitios distantes^[5]. La mayoría de los tumores malignos invaden los tejidos circundantes, entran en el sistema circulatorio y establecen áreas de proliferación lejos del lugar en el que se han originado^[5].

En un tejido específico, las células cancerosas normalmente manifiestan las características de las células de crecimiento rápido, es decir: una alta proporción del núcleo respecto al citoplasma, un nucléolo prominente, muchas mitosis y una estructura relativamente “poco especializada”. La presencia de células invasoras en secciones de otros tejidos normales es la indicación mas clara para el diagnóstico de una malignidad^[6].

2.2. Cáncer en México

Panorama mundial y nacional de tasas de incidencia y mortalidad por cáncer en hombres y mujeres durante el 2005:

Pulmón	35.5 / 31.2*
Próstata	25.3 / 8.2
Estómago	22.0 / 16.3
Colon y Recto	20.1 / 10.2
	**
Mama	37.4 / 13.2
Cérvix	16.2 / 9.0
Colon y Recto	14.6 / 7.6
Pulmón	12.1 / 10.3
Hepático	15.8 / 14.9
Estómago	10.3 / 7.9

* Se calcularon unos 5 801 839 de hombres y 5 060 657 de mujeres con cáncer en el mundo para 2005. Tasa por 100 000 hombres; ** Tasa por 100 000 mujeres

Incidencia en México: Tumor/ Defunciones/ Tasa.

Cuello del útero	4,330 /17.3
Mama	3,861 /15.5
Estómago	2,376 /4.6
Bronquios y Pulmón	2,146 /4.2
Hígado y vías biliares	2,369 /4.6
Páncreas	1,557 /3.0
Ovario	1,334 /2.6
Colon	1,108 /2.2
Vesícula biliar	693 /1.4
Leucemia linfoide	669 /1.3

Tasa por 100,000 personas. (Registro histopatológico de neoplasias malignas en México, 2005).

En México las enfermedades oncológicas son la segunda causa de muerte en población general, representando gastos millonarios para los Institutos de salud que las atienden. Las entidades con mayor incidencia de cáncer son; Morelos, Querétaro, Chiapas, Guerrero y Distrito Federal^[7].

De 1950 a 1998 las muertes por enfermedades oncológicas tuvieron un incremento de 68 por ciento; mientras que en los años 50's fallecieron 1, 655 personas por cada 100 mil habitantes, en el 98 la cifra fue de 52 mil 681 defunciones^[7]. A partir de la década de los noventa, los tumores malignos aumentaron considerablemente en mexicanos mayores de 30 años, y según el Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas de 1998, el Cérvico-uterino ocupaba el primer lugar con 22 mil casos por año. A su vez, se detectaron 11 mil 139 casos por Carcinoma de mama; 6 mil 146 de próstata, y 4 mil 594 de ganglios linfáticos en población general^[8].

Del total de los casos de cáncer, 63.5 por ciento correspondieron al sexo femenino y 35.3 al masculino; de las 52 mil 681 defunciones registradas en 1998, 47.8 por ciento correspondieron a hombres y 52.2 por ciento a mujeres^[9].

De acuerdo con la Secretaría de Salud (SS), la enfermedad en todas sus manifestaciones ha llegado a cifras alarmantes, pues en 1999 se reportaron 53.6 decesos por cada 100 mil habitantes^[10].

La causa del cáncer es desconocida, pero se conocen la mayoría de los factores de riesgo que los precipitan. El principal factor de riesgo es la edad o el envejecimiento, ya que dos terceras partes de todos los cánceres ocurren en personas mayores de 65 años. El segundo factor de riesgo es el tabaquismo y le siguen la dieta desbalanceada, el ejercicio físico, la exposición solar, y otros estilos de vida poco saludables. Aunque el mecanismo de producción del cáncer subyace en los genes, sólo un pequeño porcentaje de los cánceres son una enfermedad hereditaria^[10,11].

2.3. Leucemias.

Son enfermedades malignas en las que las células de la sangre adoptan un comportamiento anormal de crecimiento e indiferenciación que llevan a la pérdida de parte de las funciones desempeñadas por la sangre^[12]. Es común que estas enfermedades se presenten con un aumento de tamaño de los ganglios, bazo o hígado y por cuadros de infecciones repetidas o sangrados. Por la propia naturaleza de las células, desde su inicio las repercusiones se manifiestan en varias partes del cuerpo. Los órganos más frecuentemente involucrados en este proceso son: sangre, médula ósea, ganglios linfáticos, bazo e hígado.

2.3.1. Leucemia Mieloide Aguda (LMA).

La leucemia mieloide aguda (LMA), es un tipo de cáncer producido en las células de la línea mieloide de los leucocitos, caracterizado por la rápida proliferación de células anormales que se acumulan en la médula ósea e interfieren en la producción de glóbulos rojos normales.

En la LMA existe una invasión de la médula ósea normal, que va siendo reemplazada poco a poco por células leucémicas, lo que conlleva un descenso de glóbulos rojos, plaquetas y leucocitos normales^[13]. Los principales síntomas incluyen fatiga, dificultad para respirar, aparición de hematomas, dificultades en la coagulación y un aumento del riesgo de infección. Aunque ya se han determinado ciertos factores de riesgo, aún no está clara la causa específica de la LMA, es más común en adultos y su incidencia aumenta con la edad. Se trata de una enfermedad relativamente rara a nivel global, sin embargo es responsable de aproximadamente el 1.2% de las muertes por cáncer^[14]. Este tipo de cáncer progresa rápidamente y puede ser fatal en semanas o meses si no es adecuadamente tratado.

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

2.3.2. Clasificación

La clasificación Franco-Estadounidense-Británica (FAB) divide la LMA en 8 subtipos, desde el M0 al M7, basándose en el tipo de células leucémicas que aparecen y en su grado de madurez. Esto se lleva a cabo mediante un examen de la apariencia de las células leucémicas al microscopio óptico o mediante técnicas citogenéticas, con el fin de caracterizar las posibles anomalías cromosómicas^[15]. Los subtipos de LMA han mostrado diferencias en el pronóstico y en la respuesta a terapia. Aunque la clasificación de la OMS parece ser más útil en muchos aspectos, el sistema FAB sigue siendo ampliamente utilizado.

Los 8 subtipos de LMA según la FAB son:

M0. Leucemia mieloblástica aguda sin diferenciación localizada.

M1. Leucemia mieloblástica aguda sin maduración.

M2. Leucemia mieloblástica aguda con maduración.

M3. Leucemia promielocítica aguda (con translocación t15;17).

M4. Leucemia mielomonocítica aguda (LMMA).

M4eo. Leucemia mielomonocítica aguda con eosinofilia en médula ósea.

M5. Leucemia monocítica aguda (LMoA).

M5a. LMoA sin diferenciación (monoblástica).

M5b. LMoA con diferenciación (monocítica).

M6. Eritroleucemia aguda; son precursoras de globos rojos.

M7. Leucemia megacariocítica aguda.

La clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) intenta ser más útil que la FAB desde el punto de vista clínico. Su objetivo es dar más información significativa relacionada con el pronóstico de la LMA. Cada una de las categorías de la OMS contiene numerosas subcategorías descriptivas de gran interés para el hematopatólogo y para el oncólogo[15]. Sin embargo, la mayor parte de la información clínicamente significativa se encuentra categorizada en uno de los cinco subtipos listados a continuación.

2.3.3. Los 5 subtipos de LMA según la OMS.

LMA con anomalías genéticas características. Incluyen aquellas LMA con translocaciones entre los cromosomas 8 y 21 [t(8;21)], inversiones en el cromosoma 16 [inv(16)] o translocaciones entre los cromosomas 15 y 17 [t(15;17)]. Los pacientes con este tipo de LMA generalmente presentan una elevada tasa de remisión y un mejor pronóstico comparado con otros tipos de LMA.

LMA con displasia multilinaje. Esta categoría incluye a los pacientes que han sufrido previamente un síndrome mielodisplásico (SMD) o mieloproliferativo (SMP) y éste ha derivado en una LMA. Este tipo de LMA tiene una mayor incidencia en pacientes de edad avanzada y suele presentar un peor pronóstico.

LMA y SMD asociados al tratamiento. Esta categoría incluye a los pacientes que han sido sometidos a quimioterapia o radiaciones, y posteriormente desarrollaron LMA o SMD. Estas leucemias pueden ser caracterizadas por anomalías cromosómicas específicas y suelen presentar un mal pronóstico.

LMA no categorizada. Incluye subtipos de LMA que no pueden ser incluidos en ninguna de las categorías anteriores.

Leucemias agudas de linaje ambiguo. En este tipo de leucemia (también conocido como fenotipo mixto o leucemia aguda bifenotípica) las células leucémicas no pueden ser clasificadas como mieloides o linfoides, o bien ambos tipos de células están presentes.

2.3.4. Síntomas

La mayor parte de los síntomas de la LMA son debidos al incremento de leucocitos cancerosos que desplazan a las células normales e interfieren en la producción de glóbulos rojos normales de la médula ósea. La ausencia de producción de leucocitos normales aumenta la susceptibilidad del paciente a sufrir infecciones, ya que las células leucémicas, a pesar de provenir de precursores leucocíticos, no poseen las características inmunológicas que les permitirían enfrentarse a una infección^[16]. El descenso de glóbulos rojos causa anemia y el descenso de plaquetas puede dar lugar a problemas de coagulación.

La LMA puede producir esplenomegalia que suele producirse, aunque de forma suave y asintomática. La hinchazón de los ganglios linfáticos no es común (al contrario de lo que ocurre en la leucemia linfocítica aguda), pero puede tener lugar. La piel puede verse afectada por el denominado cutis leucémico, una infiltración de células leucémicas en la dermis. También, aunque más excepcionalmente, puede presentarse el síndrome de Sweet, una inflamación paraneoplásica de la piel producida por hormonas o citocinas secretadas por las células tumorales o por las células del sistema inmune en respuesta al tumor.^[16]

Algunos pacientes con LMA pueden experimentar una hinchazón de las encías debido a la infiltración de células leucémicas en el tejido blando de la encía. Menos común es que el primer síntoma de la leucemia sea un tumor fuera de la médula ósea, llamado cloroma. También puede darse el caso de que una persona no exteriorice ningún síntoma y la leucemia sea descubierta accidentalmente durante un análisis de sangre rutinario.^[17]

2.3.5. Epidemiología

La incidencia de la LMA aumenta con la edad, estando en 63 años la edad media a la que se diagnostica. El 90% de las leucemias agudas en adultos son del tipo LMA y solo se produce en niños excepcionalmente. La tasa de LMA asociada a un tratamiento previo de quimioterapia está aumentando, siendo actualmente la causante del 10-20% de todos los casos de LMA. La incidencia es ligeramente mayor en hombres que en mujeres (1,3:1)^[12,13].

También existen variaciones en la incidencia de la LMA a nivel geográfico. En la población adulta, las tasas más elevadas de LMA se registran en Norte América, Europa y Oceanía, siendo escasa la incidencia en Asia y Latino América. En la población infantil, la LMA es menos frecuente en Norte América e India, que en ciertas zonas de Asia. Estas diferencias pueden ser debidas a factores genéticos, ambientales o, más probablemente, a una combinación de ambos.

Parece que existe cierto riesgo hereditario para el desarrollo de LMA. Se han descrito numerosos casos de familias cuya incidencia a nivel familiar era más elevada que la media predicha para un individuo. El riesgo de desarrollar LMA se ve multiplicado por tres entre pacientes con parentesco en primer grado.

2.3.6. Etiología

Se han identificado una serie de factores de riesgo para la aparición y desarrollo de la LMA: Ciertos desórdenes relacionados con los precursores de las células sanguíneas, tales como el síndrome mielodisplásico o el síndrome mieloproliferativo, pueden terminar desencadenando una LMA. El mayor o menor riesgo dependerá del tipo de la severidad de la enfermedad^[13].

La exposición frecuente a Podofilotoxina usada en quimioterapia anticancerígena, en particular la exposición a agentes alquilantes, puede aumentar considerablemente el riesgo a sufrir una LMA. El mayor riesgo sobreviene unos 3-5 años después de haber recibido la quimioterapia.

Otros agentes quimioterapéuticos, como la epipodofilotoxina y las antraciclinas, también han sido relacionados con la leucemia asociada al tratamiento quimioterapéutico. Este tipo de leucemias asociadas a un tratamiento suelen cursar con anomalías muy específicas de los cromosomas de las células leucémicas.

Ciertas enfermedades congénitas pueden aumentar el riesgo de desarrollar algún tipo de leucemia. El caso más común es el del síndrome de Down, cuyo riesgo de desarrollar LMA se ve incrementado en unas 10-18 veces respecto de un individuo normal^[13].

2.3.7. Patofisiología

La LMA es causada por la malignización del mieloblasto. En el proceso normal de hematopoyesis, el mieloblasto es un precursor inmaduro de la estirpe mieloide de glóbulos blancos. Un mieloblasto normal madurará gradualmente hasta convertirse en alguno de los tipos de glóbulo blanco maduro. Sin embargo, en la LMA, un mieloblasto acumula una serie de mutaciones en su genoma que le impiden seguir su proceso de diferenciación celular, por lo que queda "congelado" en este estado inmaduro. Esto aún no es suficiente para producir la leucemia. Sin embargo, cuando a la ausencia de diferenciación del mieloblasto se suman otras mutaciones de los genes que controlan la proliferación celular, el resultado es la división incontrolada de clones del mieloblasto, que desemboca en la patología denominada LMA.

La gran diversidad y heterogeneidad de tipos celulares que pueden observarse en la LMA viene dada por el hecho de que la transformación leucémica puede ocurrir en diferentes estadios a lo largo del proceso de diferenciación, lo que condiciona el tipo de células cancerígenas que se podrán encontrar en un determinado paciente.

Los esquemas modernos de clasificación de la LMA reconocen que las características y el comportamiento de las células leucémicas pueden depender de la etapa en la que la diferenciación haya sido interrumpida.

Muchos pacientes con LMA suelen presentar una serie de anomalías citogenéticas específicas. Los tipos de anomalías cromosómicas encontradas pueden ser suficientes para obtener un pronóstico significativo. Dichas translocaciones cromosómicas pueden generar nuevas proteínas de fusión que, o bien pierden su función original, o bien ejercen la misma función pero de forma incontrolada, escapando a los sistemas de regulación de la expresión génica. Cuando estas proteínas alteradas son ciertos factores de transcripción las consecuencias son la interrupción de la diferenciación y la posterior proliferación incontrolada^[17].

2.3.8. Tratamiento

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

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

La quimioterapia de inducción presenta un esquema de administración denominado "7 + 3", en el que la citorabina es administrada de forma continuada durante los 7 primeros días y la antraciclina durante los 3 siguientes. Alrededor del 70% de los pacientes logran una remisión con este protocolo de administración.

El objetivo de la fase de inducción es alcanzar una remisión completa, ésta se suele conseguir en el 50-75% de los pacientes adultos diagnosticados, pero estos valores pueden verse modificados por algunos factores.

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

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

2.4. *Cultivos celulares*

El cultivo de células tuvo su origen en el siglo XIX. Reclinhausen en 1866, mantuvo vivas células sanguíneas de anfibio, pero fue la utilización de bloques de agar con plasma coagulado (soporte y alimento) el inicio del cultivo de células *in vitro* ^[18,19].

El desarrollo del cultivo de células de vertebrados se inició con las observaciones de Roux (1885) en cultivos de células de embrión de pollo; posteriormente Harrison (1907) cultivó tejido nervioso de rana el cual más adelante fue reemplazada por plasma de pollo; posteriormente, se aplicó esta técnica para el estudio en animales de sangre caliente ^[20].

El empleo de técnicas de fusión celular estableció las bases de la genética de células somáticas para el análisis de especies animales; igualmente la técnica de anticuerpos monoclonales ha permitido estudios en inmunología y su aplicación a nivel terapéutico ^[21].

En la actualidad, pueden cultivarse en el laboratorio células procedentes de una amplia gama de tejidos y organismos diferentes. En un principio, el objetivo principal era el estudio de las propias células, cómo crecen, qué necesitan para su crecimiento, cómo y cuando dejan de crecer. Este tipo de estudios tiene hoy un gran interés científico, por ejemplo, en relación con investigaciones sobre el ciclo celular, el control del crecimiento de células tumorales y la modulación de la expresión genética^[22].

Cuando el cultivo proviene de células que han sido disgregadas de un tejido original tomado de un órgano de un animal recién sacrificado, reciben el nombre de Cultivo Primario.

Cuando éste cultivo primario es sometido a procesos de transformación que le confiere capacidad ilimitada de multiplicación, reciben el nombre de Líneas Celulares.

Cuando de un cultivo primario genera otro tipo de células que se pueden separar recibe el nombre de Cultivos Secundarios.

Cuando en el cultivo coexisten dos tipos de células de linajes diferentes que se pueden separar recibe el nombre de Cocultivo^[23]. La posición en la ramificación de los distintos tipos de cultivos pueden verse en la fig.1.

Fig. 1. Clases de cultivos

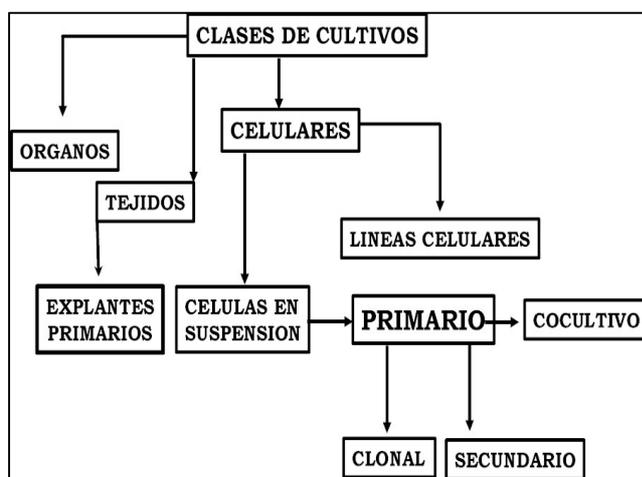


Fig. 1. Se muestran las ramificaciones de los tipos de cultivos y cómo se van derivando unas de otras. (Obtenido del manual de prácticas, "Biología Celular", departamento de Biología, Facultad de ciencias, UNAM).

Cultivos en suspensión: las líneas celulares que provienen de cultivos primarios con requerimiento de anclaje a superficies, tienen la propiedad de crecer de manera estacionaria o en suspensión después de un período de adaptación.

Existe evidencia experimental que los sistemas en suspensión también requieren de matrices que son macromoléculas, que sirven de protectores a la superficie celular; estas macromoléculas se encuentran en el suero, el cual contribuye igualmente con el medio de cultivo, proporcionando un sistema balanceado de nutrientes^[24].

2.4.1. Ventajas e inconvenientes de las técnicas de cultivo celular.

Estas técnicas tienen una serie de ventajas innegables, pero al mismo tiempo tienen unas desventajas que hay que tener en consideración^[24].

VENTAJAS	INCONVENIENTES
Control preciso y fino del medio ambiente	Técnica sensible
Caracterización y homogeneidad de la muestra	Cantidad y coste
Economía	Inestabilidad
Motivaciones éticas	Validez del modelo 'in vitro'

2.5. Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC)

Estudios sobre las funciones de las células T y los rechazos de trasplantes de tejidos, han demostrado que el reconocimiento de las células del propio cuerpo, depende de un grupo de moléculas glucoproteicas situadas en la membrana de las células eucariotas. Los componentes proteicos de estas moléculas están codificados por un grupo de genes denominado complejo mayor de histocompatibilidad o MHC. (histo procede de la palabra griega tejido)^[25].

El MHC consta al menos de 200 genes diferentes (polimorfismo) y en la población humana, cada uno de estos genes tiene hasta 8 o 10 alelos. El número total de combinaciones que resulta es astronómico, por lo tanto, no existen dos personas, excepto los gemelos idénticos, que tengan el mismo complejo mayor de histocompatibilidad^[25,26].

En humanos, el MHC es conocido como antígenos leucocitarios humanos (HLA). Este sistema juega un papel importante en la respuesta inmune de tipo celular contra antígenos virales y tumorales^[27]. Durante el proceso de selección en el timo, las células T en desarrollo se ponen en contacto, con las proteínas del MHC exhibidas por las células del timo, por lo que aquellas células que presentan una alta afinidad son destruidas para evitar la respuesta inmune en contra del propio organismo^[25].

El complejo de genes del HLA está localizado en el brazo corto del cromosoma 6, en la región 6p21.3 y se extiende a lo largo de 4 Mb^[28] y está compuesto por casi 220 loci identificados^[29]. El MCH en el humano se divide en tres regiones de acuerdo a las familias de genes presentes en cada una: La clase I codifica péptidos transmembranales de 44 kDa. asociados en la superficie celular con la β 2-microglobulina. Las moléculas de clase II son heterodímeros transmembranales. Los genes de clase III codifican componentes del complemento relacionados con la formación de C3 convertasa. Las moléculas de clase I se encuentran en células de todo el cuerpo y son necesarias para el reconocimiento por las células T citotóxicas, mientras que las de clase II se encuentran presentes sólo en células del sistema inmunológico y las identifica como tales^[30,31,32].

El MHC se descubrió como una región multi-loci extendida constituida por genes altamente polimórficos, que determinaban el resultado de los trasplantes tisulares entre individuos. En la década de 1940 George Snell y colaboradores estudiaron el rechazo de tumores y otros tejidos transplantados entre cepas de ratones genéticamente idénticas (singénicas) y no genéticamente idénticas (alógenicas)^[33].

Así demostraron que los trasplantes (injertos de piel) entre animales singénicos eran aceptados, mientras que entre animales alógenicos eran rechazados. Por consiguiente, un rasgo hereditario, unos genes eran los responsables de la aceptación o del rechazo de un tejido transplantado y por ello se denominaron genes de histocompatibilidad^[32,33].

Posteriormente el análisis del rechazo de injertos de piel entre cepas de ratones congénitos (ratones con todos los loci idénticos excepto el de estudio) determinó la región cromosómica responsable de la compatibilidad entre injertos y se la denominó locus principal de histocompatibilidad. Luego se demostró que esta región no contenía un locus sino varios estrechamente ligados y por eso se renombró como Complejo Mayor de Histocompatibilidad^[34].

2.5.1. Características generales de los genes del MHC.

Los genes del MHC están en desequilibrio de ligamiento, es decir alelos de diferentes genes se hallan en el mismo cromosoma con una frecuencia superior a la esperada en una combinación al azar^[36]. Son muy polimórficos, existen varios alelos para cada gen con una presencia importante en la población^[36].

Los genes de clase I se expresan en todas las células nucleadas con diferente intensidad, mientras que los de clase II se expresan únicamente en células presentadoras profesionales (APC: células dendríticas, macrófagos, linfocitos B). Su expresión se potencia por estímulos inflamatorios e inmunitarios^[36].

2.5.2. Características bioquímicas y estructurales de las moléculas MHC.

1.- Los genes de clase I y clase II del MHC codifican dos grupos de proteínas estructuralmente diferentes pero homólogas y análogas. Las de moléculas de clase I son dímeros $\alpha\beta$ -microglobulina, las moléculas de clase II son dímeros $\alpha\beta$, y ambas unen de forma no covalente un péptido antigénico (Fig. 2)^[36,37].

2.- Cada molécula del MHC consta de una hendidura o surco extracelular de unión al péptido seguida de un par de dominios de tipo inmunoglobulina, y está anclada a la célula mediante dominios transmembranales y citoplasmáticos^[36,37] (Fig. 2).

3.- Los residuos polimórficos de las moléculas del MHC están localizados en la hendidura de unión al péptido y adyacentes a ella^[36,37].

4.- Los dominios de tipo inmunoglobulina no polimórficos de las moléculas del MHC contienen sitios de unión a las moléculas correceptoras CD4 y CD8 de los linfocitos T^[36,37].

Figura 2. Clase I y II del CMH.

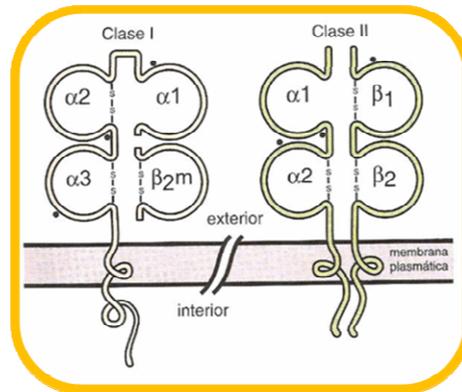


Fig.2 Es posible observar las moléculas de la clase I y II del CMH sus semejanzas y sus diferencias en sus subunidades alfa y beta^[37].

2.5.3. Presentación antigénica.

Las moléculas de clase I presentan péptidos antigénicos -de origen citoplasmático, de 8 a 11 residuos y generados por el proteasoma- a linfocitos T CD8+^[38]. Las moléculas de clase II presentan péptidos antigénicos -de origen extracelular, de 10 a 24 residuos y adquiridos por endocitosis- a linfocitos T CD4+ (Fig. 2).

2.5.4. Inhibición de células NK.

Las moléculas de clase I también actúan como ligandos para receptores inhibidores de la actividad citotóxica de las células NK^[39].

2.5.5. Las Moléculas MHC de clase I

Las primeras moléculas MHC definidas por técnicas serológicas fueron las moléculas MHC de clase I humanas: HLA-A, HLA-B y HLA-C.

Las moléculas MHC de clase I son heterodímeros constituidos por dos cadenas polipeptídicas asociadas sin enlaces covalentes: una cadena α o cadena pesada de 44 a 47 KDa codificada por el MHC y una subunidad de 12 KDa no codificada dentro del MHC denominada $\beta 2$ – microglobulina^[40].

La cadena α es una glicoproteína de tipo I constituida por tres dominios extracelulares (dominios 1α , 2α y 3α), una región transmembranal y otra citoplasmática^[40,41].

Los dominios 1α y 2α forman la región de unión al péptido consistente en una plataforma de ocho láminas β -antiparalelas en la que se apoyan dos α -hélices paralelas. Esta estructura une péptidos de 8 a 11 aminoácidos en una conformación flexible y extendida.

Péptidos de mayor tamaño no pueden alojarse debido a que los extremos de la hendidura se cierran. Estos antígenos proceden de proteínas de origen citoplasmático que han sido degradadas por un complejo proteolítico conocido como proteasoma^[41,42].

2.5.6. Las Moléculas MHC de Clase I no clásicas.

En los 90's se han descubierto genes relacionados con los genes HLA de clase I a los que se ha denominado en conjunto genes HLA de clase I "no clásicos". Hasta el momento se han descrito 9 familias "no clásicas" que contabilizan un total de 18 genes funcionales. En todas las familias, es conocida la función y la estructura tridimensional de al menos un componente de la familia. Aunque existen diferencias en la secuencia aminoacídica, las moléculas HLA de clase I no clásicas presentan una estructura tridimensional similar a las clásicas, en particular en los dominios 1 α y 2 α . Sorprendentemente, estas moléculas tan parecidas en la forma desempeñan diversas funciones, no siempre relacionadas con el sistema inmune^[43,44,45].

2.6. Los genes MIC.

La búsqueda de nuevas secuencias codificadoras en la región cercana al locus HLA-B para dilucidar la asociación entre el HLA-B27 con enfermedades reumatoides e inflamatorias condujo al descubrimiento de una nueva familia, los genes MIC (Major histocompatibility complex class I Chain-related genes, por sus siglas en inglés), que consisten en siete miembros, MICA, MICB, MICC, MICD, MICE, MICEF y MICG^[43,45,46] de los cuales sólo MICA y MICB codifican para transcritos de ARNm, mientras que MICC, MICD, MICE, MICEF y MICG son pseudogenes debido a que presentan varias mutaciones puntuales y deleciones^[43].

Resulta interesante el hecho de que los genes MIC han sido conservados en la mayoría de los mamíferos excepto en los roedores^[47] lo cual sugiere que han seguido una misma línea evolutiva. Algunos estudios han comparado la secuencia de los genes MIC de humanos con primates y se ha encontrado una similitud que va del 86% al 97%^[48].

Los genes MICA y MICB están estrechamente relacionados y codifican para transcritos de 1382 y 2376 pares de bases (pb) respectivamente^[43, 49]. La molécula de MICA es codificada por un gene muy extenso (comparado con los 3.5 kb promedio del HLA) y poco común de 11722 pb que se encuentra localizado 46.5 kilobases (kb) centromérico del locus HLA-B; también MICB es codificado por un gene extenso de 12930 pb que está localizado a 83 kb centromérico de MICA^[50]. MICA y MICB son muy polimórficos, pues se conocen más de 50 alelos diferentes para MICA y al menos 13 para MICB, cifras que tal vez irán en aumento. Otros reportes mencionan que MICB ya cuenta con 16 alelos^[51].

Las proteínas MICA y MICB son similares en estructura en casi 84 %^[51], pero si los comparamos con las moléculas del MHC de clase I sólo comparten una similitud del 19%, 25% y 35% con respecto a los dominios alfa 1 (α 1), alfa 2 (α 2) y alfa 3 (α 3)^[43]. Recientemente se ha publicado la estructura de las proteínas MIC (Fig. 3) y se han comenzado a hacer investigaciones en cuanto a la regulación de su expresión, su distribución en los tejidos y su variabilidad alélica^[42,44,49].

Figura 3. Imagen tridimensional de

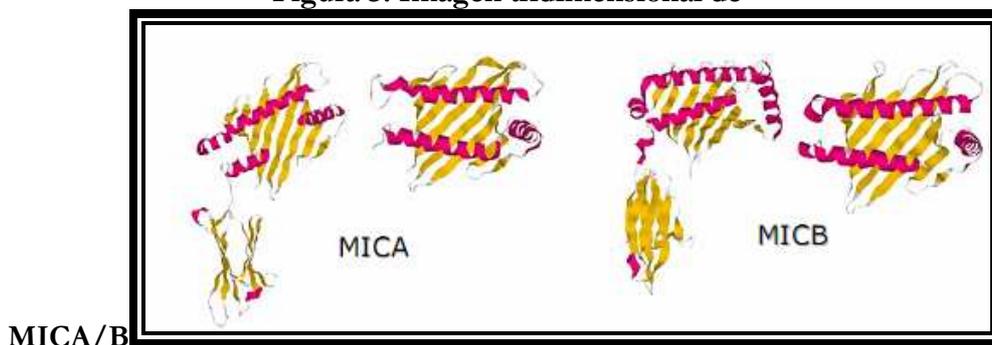


Fig. 3 Muestra la Estructura tridimensional de MICA y MICB y su hendidura de unión al péptido^[52].

2.6.1. Tipos celulares donde se expresan MIC.

Desde el descubrimiento de los genes MIC así como de las proteínas para las que codifican, surgió la inquietud de buscar una similitud con los genes del MHC debido a su cercanía con estos últimos. Se determinó que a pesar de que las proteínas MIC presentan un gran dimorfismo como los genes del MHC existen diferencias sustanciales que los separan. Entre las más importantes tenemos que las proteínas MIC en contraste con las proteínas del MHC no se relacionan con la β -2 microglobulina, no tienen actividad presentadora de antígeno^[52], además de que no son inducidas por IFN γ .

Es de gran importancia mencionar que se ha observado por inmunohistoquímica *in vivo* que la expresión de las proteínas MIC se ve limitada al tejido epitelial^[50], aunque también se ha reportado que se encuentran en bajos niveles en células endoteliales, monocitos y queratinocitos^[55]. Recientemente se ha reportado que MICA/B también se pudiera encontrar de manera normal en timo^[56].

La importancia que han adquirido las proteínas MIC en el campo de la inmunología se debe al hecho de que su expresión se ve desregulada o sobreexpresada sobre la superficie de una gama de células tumorales de origen epitelial: pulmón, mama, riñón, ovario, próstata y colón^[50], también su estudio se ha orientado a determinar de qué manera el sistema inmunológico actúa en contra de las células que expresan las proteínas MIC.

2.6.2. Las proteínas MIC y la respuesta inmune de células NK y linfocitos T

La respuesta de las células T citotóxicas en contra de tumores requieren del reconocimiento por parte de los linfocitos T CD8+ de péptidos específicos derivados de antígenos tumorales que se asocian con las proteínas del MHC clase I. Estos linfocitos presentan los receptores $\alpha\beta$ ($\alpha\beta$ T) y son generalmente encontrados en sangre periférica. Para llevar a cabo la actividad de estas células, se requiere de la cooperación de células presentadoras de antígenos (CPA), las cuales tienen como función principal, cuando se presenta una infección viral o bacteriana, la de fagocitar al agente patógeno y presentarlo posteriormente en su superficie bajo el contexto de proteínas del MHC clase I para que de esta manera sea estimulada la actividad citotóxica de los linfocitos CD 8+^[57].

Se han realizado algunos estudios en los que se ha podido observar que la presencia de ciertas bacterias provoca un aumento en la expresión de las proteínas MIC y de este modo facilitar una efectiva respuesta por parte del sistema inmunológico, más específicamente de las células NK y los linfocitos $\gamma\delta$ T durante las primeras etapas de la infección^[58].

En condiciones normales, la mayoría de las células expresan una gran cantidad de proteínas del MHC clase I y de esta forma son reconocidas por el sistema inmunológico, la manera en la que las células NK y los linfocitos T CD8+ diferencian células normales de las células tumorales es un proceso que hasta hace poco no se entendía del todo.

El reconocimiento de células deficientes de las proteínas de clase I por parte de las células NK ha sido explicado por el descubrimiento de receptores específicos para dichas proteínas, encontrándose que la unión de estos receptores con sus ligandos de alguna manera inhiben la actividad de las NK. Se han identificado 3 familias de receptores para las proteínas clase I que inhiben la acción de las células NK: Ly49 (sólo se ha encontrado en ratón)^[58] KIR (sólo en humanos)^[59,60,61].

Los primeros estudios que se realizaron demostraron que las proteínas MIC son marcadores de estrés fisiológico y que su expresión se ve aumentada en infecciones virales y bacterianas, además se encontró que la presencia de las proteínas MIC está regulada por la expresión de las proteínas de choque térmico HSP70 ^[53,54].

Sin embargo la estructura de MIC-B cristalizado junto con su receptor NKG2D no adopta esta conformación “extendida”, lo que demuestra la flexibilidad de la región que conecta el dominio 3 α con el superdominio 1 α -2 α (Fig. 4).

Figura 4. Unión MICB y NKG2D



Figura 4. Se muestra el complejo de unión entre la proteína MICB y su receptor NKG2D^[63].

2.7. NKG2D: un receptor para las proteínas MICA y MICB.

Tratando de dilucidar de que manera las proteínas MIC interactúan con el sistema inmunológico, se descubrió que las proteínas MIC funcionan como ligandos para el receptor NKG2D cuya expresión fue inicialmente encontrada en las células NK ^[63].

NKG2D es un miembro de la superfamilia de las lecitinas tipo C ^[50,64], el cual se relaciona muy poco con los receptores de la familia NKG2 ^[65] y que no tiene asociación con CD94, ya que se expresa como un homodímero ^[65], además se asocia con un adaptador transmembranal conocido como DAP 10 ^[64,66]. Este receptor está codificado por un gen que se encuentra dentro de la región denominada NKC (Natural Killer complex), en el cromosoma humano 12 y en el 6 en el caso del ratón ^[67].

NKG2D se encuentra en todas las células NK tanto en humanos como en ratones ^[68]. En ratones NKG2D, se encuentra expresado además de las células NK, en

algunos subtipos de linfocitos $\gamma\delta$ T en el bazo, en todas las células $\gamma\delta$ T epidérmicas, pero no en las células $\gamma\delta$ T provenientes del intestino ^[68,69].

En el caso de los humanos de igual manera que en los roedores, NKG2D no está confinada a las células NK, se ha descubierto que la mayoría de los linfocitos $\gamma\delta$ T así como los $\alpha\beta$ T y los macrófagos presentan en su superficie al receptor NKG2D ^[70].

Se ha observado que la expresión de NKG2D se ve aumentada en células NK por la acción de IFN α , IL-15 e IL-12^[71].

El receptor NKG2D tiene como ligandos varios grupos de proteínas que guardan una semejanza con las proteínas del MHC clase I, las cuales se encuentran presentes en células tumorales, células infectadas por virus y en células bajo condiciones de estrés fisiológico^[68]: RAE-1 y H60 en ratones y MICA, MICB y ULBP en humanos ^[68].

Los primeros ligandos para NKG2D en ser descubiertos en humanos fueron las proteínas relacionadas con las moléculas clase I del MHC: MICA y MICB ^[54] de las cuales se ha mencionado ampliamente.

2.7.1. Otros ligandos descubiertos para el receptor NKG2D

Otros ligandos descubiertos para el receptor NKG2D son las proteínas ULBPs, las cuales son codificadas por aproximadamente 10 genes (seis codifican para proteínas potencialmente funcionales y cuatro pseudogenes), en el cromosoma 6q24.2-q25.3. Poco es lo que se conoce a cerca de las ULBPs, algunos miembros de esta familia se encuentran expresados en diversas células normales y detectadas por RT-PCR, sin embargo también se ha reportado que sufren una sobre expresión en células tumorales ^[64], se ha observado un aumento en tumores de colón y estómago, contrario a lo que sucede en tumores de riñón, en los cuales parece que hay una disminución de la ULBP.

Estructuralmente las ULBPs son homólogos en sus dominios α 1 y α 2 a las proteínas del MHC clase I, pero carecen de un dominio α 3. ULBP1, 2 y 3 son entre 23 y 27 % idénticas a MICA y MICB o a las proteínas del MHC clase I ^[72]. Las proteínas ULBPs fueron identificadas debido a la afinidad que presentan por la proteína del citomegalovirus humano denominada UL16, la cual tiene un papel importante en la evasión del sistema inmune, debido a que se une a las proteínas ULBPs y a las proteínas MIC, evitando así el reconocimiento de estas proteínas por parte del receptor NKG2D presente en diversas células efectoras y la consiguiente lisis de las células infectadas, sugiriendo esto un mecanismo de defensa viral interfiriendo en el reconocimiento de las proteínas de estrés fisiológico por parte del receptor^[72].

Las células NK y los linfocitos $V\delta$ 1T; los cuales son un subtipo de los linfocitos $\gamma\delta$ T, expresan este receptor en su superficie y puede esta unión NKG2D-MIC por si sola

desencadenar una respuesta citotóxica en contra de las células que presentan en su superficie las proteínas MIC^[74] ya sean células tumorales autólogas, o provenientes de diferentes tejidos tumorales ^[73].

Por otro lado, se han reportado evidencias de que la presencia del receptor NKG2D funciona como un co-estimulador en la actividad citotóxica de las células $\alpha\beta$ T, es decir, la unión NKG2D-MIC (Fig. 5), que debiera presentarse en las células $\alpha\beta$ T no desencadena una acción lítica en contra de las células tumorales que expresan la proteína MIC.

Figura 5. Evasión tumoral del sistema inmune.

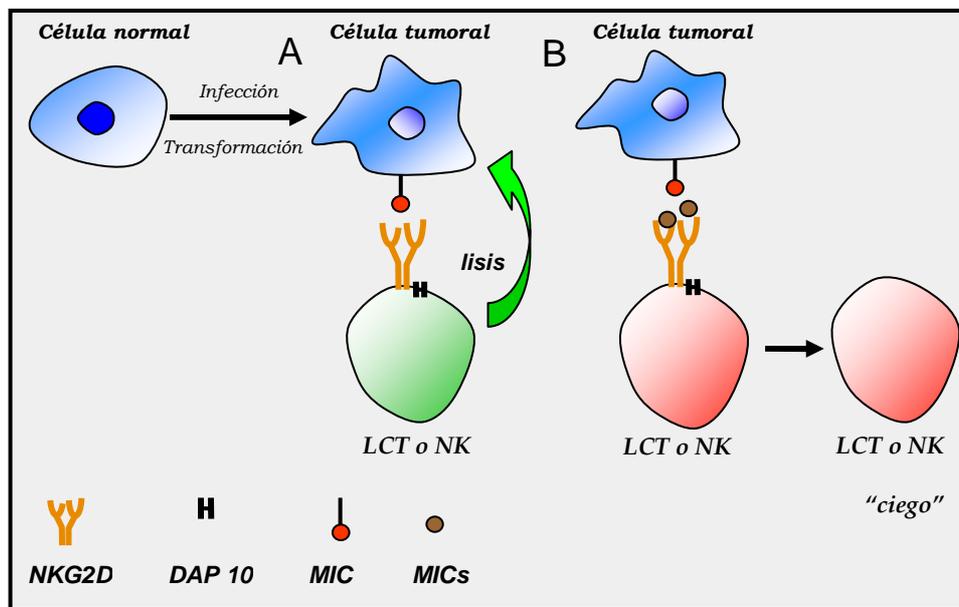


Fig.5. A la unión de las proteínas MIC y el receptor NKG2D presente en las células NK y linfocitos $\alpha\beta$ T y $\gamma\delta$ T promueve la lisis de las células tumorales o transformadas que expresan dichas proteínas. B. La liberación de una forma soluble de las proteínas MIC, promueve la endocitosis del receptor NKG2D, dando como resultado la aparición de células “ciegas”, las cuales son incapaces de reconocer células que expresen las proteínas MIC a nivel membranar.^[74]

La disminución en la expresión de NKG2D provoca la aparición de células NK y linfocitos $\alpha\beta$ T y $\gamma\delta$ T carentes de dicho receptor, estas células “ciegas” por llamarlas de alguna manera, son incapaces de reconocer a las células tumorales o transformadas aún estando presente las proteínas MIC a nivel de membrana y así evadir al sistema inmunológico ^[75] (Fig 5).

Existen reportes en los que se demuestra que ciertas líneas tumorales tienen la capacidad de liberar de manera soluble las proteínas MIC. En estos ensayos se ha encontrado que la liberación de sMIC trae como consecuencia un hecho muy importante que pudiera en determinado momento explicar la razón por la cual se da la progresión del cáncer:

La proteína sMIC se une al receptor NKG2D presente en linfocitos $\alpha\beta$ T y $\gamma\delta$ T así como en células NK, esta unión promueve la endocitosis seguido de reciclamiento o degradación de NKG2D, similar a lo que sucede con diversos receptores al unirse a sus ligandos^[73].

La disminución en la expresión de NKG2D provoca la aparición de células NK y linfocitos $\alpha\beta$ T y $\gamma\delta$ T carentes de dicho receptor. Estas células "ciegas" por llamarlas de alguna manera, son incapaces de reconocer a las células tumorales o transformadas aún estando presente las proteínas MIC a nivel de membrana y así evadir al sistema inmunológico^[31] (Fig. 5).

El hecho de que la forma soluble de las proteínas MIC pudiera contribuir a la progresión del cáncer se apoya en ensayos realizados por el grupo de Groh, en los cuales pacientes positivos sMIC, presentaron una disminución del receptor NKG2D, los cuales después de la utilización de anticuerpos dirigidos contra las proteínas sMIC sus células efectoras presentaron una densidad normal del receptor NKG2D^[73].

El monómero MICA/B interacciona con el homodímero NKG2D de forma análoga a como ocurre en los complejos MHC, donde la transducción de la señal se realiza a través del adaptador DAP10. El receptor NKG2D existe dentro del "complejo de NK" en el cromosoma humano 12, y pertenece a la familia de las lectinas. La unión de MICA/B al receptor NKG2D de los linfocitos T $\delta\gamma$, T $\alpha\beta$ CD8+ y/o NK activa las funciones efectoras de estas células. Por ejemplo, los linfocitos T TcR $\gamma\delta$ + V δ 1 del epitelio intestinal reconocen y lisan de forma específica células con MIC en la superficie. La unión de MICA/B (inducidos por CMV) con el receptor NKG2D de linfocitos T $\alpha\beta$ CD28- CD8+ específicos de CMV genera una señal coestimuladora que aumenta la respuesta citolítica de estas células y la liberación de citoquinas dependientes de TCR^[73].

Evidencias han demostrado, que la activación del inmunoreceptor NKG2D expresadas en células T CD8+ y células NK juegan un rol importante en la inmunosobrevivencia de los tumores. El receptor NKG2D es coestimulado, potencialmente activado y mediado por señales inhibitorias de la molécula MHC Clase I.

Los ligandos NKG2D (NKG2DL), MICA y MICB han sido presentados por inducción de estrés genotóxico el cual está asociado con transformaciones malignas. Las moléculas de MIC son expresadas por epitelios y tumores hematopoyéticos, pero no en tejidos saludables^[73].

Recientemente se ha descrito que ciertos tumores epiteliales producen MICA soluble. Tal que la asociación del MICA soluble con NKG2D conduce a la degradación de este receptor afectando negativamente a la capacidad antitumoral de las células ^[73].

Estudios importantes demostraron que la expresión de los ligandos NKG2D por células tumorales estimulan fuertemente inmunidad antitumoral en ratón y que la expresión de los ligandos de NKG2D son mediados por las células NK y CD8 T in vivo, generando una señal coestimuladora que aumenta la respuesta citolítica de estas células y la liberación de citoquinas^[73].

Existen reportes de que hay un mecanismo de escape de células tumorales mediados por el receptor NKG2D y sus ligandos. Donde se ha demostrado que las células tumorales reducen sus ligandos de NKG2D a nivel superficial y por lo tanto hay una mayor liberación de estos ligandos que se encuentran ahora de forma soluble. Entonces lo que pasa ahora, es que la respuesta inmune que estaba mediada por los receptores NKG2D ahora es críticamente anulada, ya que las células NK y/o CD8 T no pueden cumplir su función efectora o capacidad antitumoral de poder lisis a la célula tumoral o neo trasformada^[76].

2.8. Mecanismos del sistema inmunológico.

Existen dos mecanismos dependientes uno de otro a través de los cuales el Sistema Inmunológico genera una respuesta para defender al organismo: uno es la inmunidad innata y el otro es la inmunidad adaptativa. La finalidad de ambos mecanismos es la eliminación de antígenos, cada uno de estos mecanismos difieren en la manera específica de reconocer antígenos^[77].

La inmunidad innata, se caracteriza por ser la primera línea de defensa del organismo, en ella participan los neutrófilos, macrófilos-monocitos y células NK; el mecanismo que emplean para lograr su función es la inhibición y muerte del antígeno^[77].

En la inmunidad adquirida participan los linfocitos T, B y moléculas de membrana; que promueven la lisis, inhibición y muerte de las células blanco antigénicas^[78]. Este mecanismo específico, se subdivide a su vez en inmunidad adquirida humoral e inmunidad adquirida celular, dependiendo de las células participantes encada uno de estos procesos.

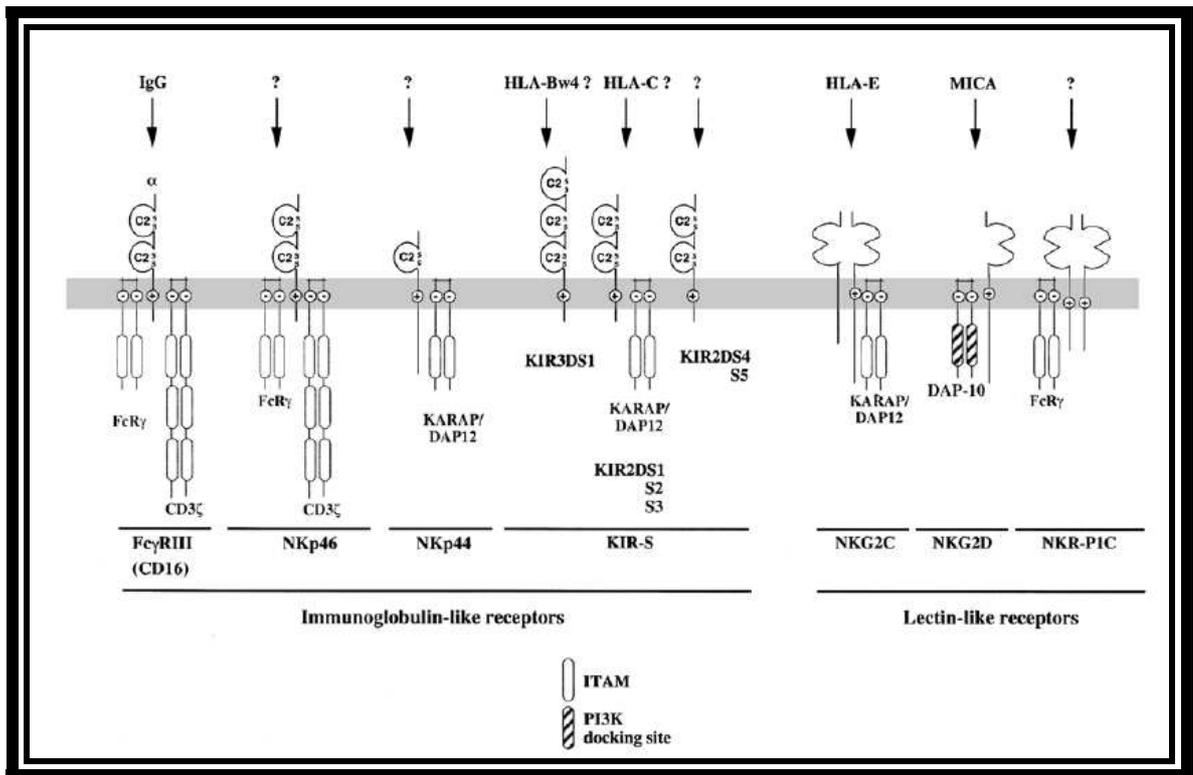
2.9. Importancia fisiológica y farmacológica de la señalización celular

La señalización celular comprende una cascada de procesos químicos conectados entre sí que participan en la comunicación entre todas las células. Procesos importantes que abarcan la comunicación celular son, como en la respuesta inmune, síntesis de proteínas, activación de la glucogenólisis, gluconeogénesis, apoptosis, participan de la formación de tejidos glandulares, epiteliales, hasta uniones celulares^[79].

El estudio de los denominados sistemas de señalización celular ha experimentado un extraordinario desarrollo en los últimos años, y constituye en la actualidad una de las fronteras más apasionantes de la investigación biomédica, tanto en el sector académico como en el de las empresas farmacéuticas. Comprender cómo las células reciben y coordinan señales del entorno y de otras células del mismo organismo es esencial para entender procesos biológicos básicos como la proliferación, diferenciación y muerte celular, la organización en tejidos, el metabolismo, la migración de las células o la propia percepción sensorial [79,80]. A su vez, estos conocimientos están permitiendo avanzar en el diseño de nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas en muy diversas patologías.

Los receptores, que muy frecuentemente son proteínas situadas en la membrana o superficie externa de las células, actúan como detectores y "decodificadores" de la señal que porta el mensajero, transformándola en una señal intracelular, denominada también segundo mensajero. La función de estos receptores fue estudiada en primer lugar en las células natural killer, aunque también controlan la respuesta adaptativa mediada por otros linfocitos y regulan parte del equilibrio entre las señales inhibitoras y activadoras de diferentes tipos celulares tales como macrófagos, monocitos y células dendríticas que también expresan estos receptores (esquema 1).

Esquema 1. Receptores activadores expresados en células NK humanas



Esquema 1. Algunos receptores específicos para moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I. (tomado de Gumà Uriel M. Análisis del repertorio de receptores de células NK en la infección por citomegalovirus humano. Universitat pompeu fabra. Barcelona, Diciembre 2005).

Los segundos mensajeros, ya desde dentro de la célula, modifican la actividad, localización o interacciones entre proteínas celulares y también regulan la expresión génica (es decir, ordenan que se expresen o que se dejen de expresar determinados genes), promoviendo una respuesta celular específica e integrada ^[80,81].

Los sistemas "en cascada" (con etapas secuenciales de detección, transformación, amplificación y diseminación de la señal) son un instrumento para el control de las principales funciones celulares. Es importante recordar también que, para cumplir sus objetivos, la activación de estos sistemas debe ser transitoria, de forma que sólo persista la señal intracelular mientras lo haga el mensajero. Existen múltiples y complejos mecanismos que aseguran la terminación adecuada del proceso de señalización ^[82].

Muchas situaciones patológicas se derivan de un funcionamiento alterado (excesivo o disminuido) de estos sistemas de comunicación celular, y múltiples fármacos actúan modulando las cascadas de señalización a diferentes niveles ^[82]. El cáncer, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares, los procesos neurodegenerativos o inflamatorios cursan con alteraciones en sistemas de señalización celular, ya sea por cambios en los niveles de mensajeros, en el número o la funcionalidad de los receptores o de los distintos componentes de las cascadas de transducción ^[82].

2.10. Señalización en cascada ruta del ligando receptor y proteínas.

Las cinasas de proteínas son una familia grande de proteínas homólogas que comprenden dos subfamilias principales: las cinasas de serina/treonina y las de tirosina. Estas cinasas funcionan como componentes en la transferencia de señales y participan en diversos procesos biológicos, tales como control del crecimiento, metabolismo, diferenciación y apoptosis celulares.

Las cinasas en tirosina son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo fosfato de la adenosina trifosfatada (ATP) a un residuo de tirosina en una proteína de sustrato. Esta transferencia activa a la cinasa y de esta manera se inicia la transferencia de señales intracelulares ^[83].

La activación de los linfocitos T se produce tras el reconocimiento por parte del TCR/CD3 de la molécula HLA y el péptido presentado por la misma junto con otros procesos, como son la activación de ciertas moléculas accesorias presentes en su membrana. Este proceso de activación se hace mas eficiente si los linfocitos reciben el estímulo de ciertas citocinas mediante su unión a los receptores específicos presentes también en la membrana de estos linfocitos ^[83].

Una vez activados los linfocitos T, éstos prioritariamente producirán citocinas o factores citotóxicos, según se trate de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺. De esta manera se desarrollará la respuesta inmune.

Los linfocitos T CD4⁺ colaborarán en la posterior activación de otras células, tales como NK, T CD8⁺, linfocitos B o macrófagos. A su vez los linfocitos T CD8⁺ tras su activación ejercerán su función citotóxica destruyendo células blanco.

Hay proteínas receptoras como las proteínas tirosina quinasa que tienen actividad catalítica, de manera que cuando se une un factor de crecimiento se dimerizan y se autofosforilan, esto crea sitios de unión para proteínas con dominio SH2; la función de los dominios SH2 es interactuar con algunas proteínas que se encuentran fosforiladas en residuos de tirosina, así su función está regulada por procesos de fosforilación-desfosforilación de estos aminoácidos^[84,85,86]. Por este motivo, un dominio SH2 puede interactuar con una fosfotirosina adyacente en la misma o en otra molécula. Cuando es sobre la misma molécula contribuye al control de su propia actividad enzimática. En otras ocasiones, la enzima con el dominio SH2 interactúa a través de dicho motivo con otras proteínas previamente fosforiladas en tirosina por otra cinasa^[86].

Hay enzimas contrarias que quitan grupos fosfato o desfosforilan a las proteínas receptoras con residuos de tirosina, éstas se llaman proteínas tirosina fosfatasas, actividad de las enzimas de quitar grupos fosfato (fig. 6)^[86].

Figura 6. Diagrama genérico de las rutas más significativas dependientes de receptores con actividad quinasa de tirosina.

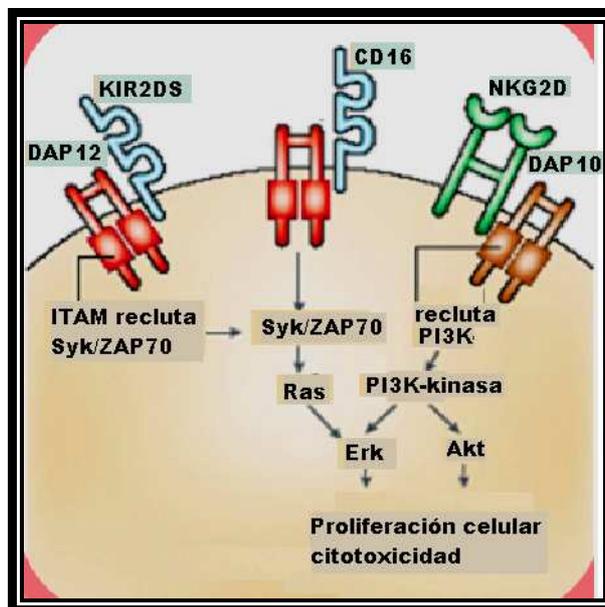
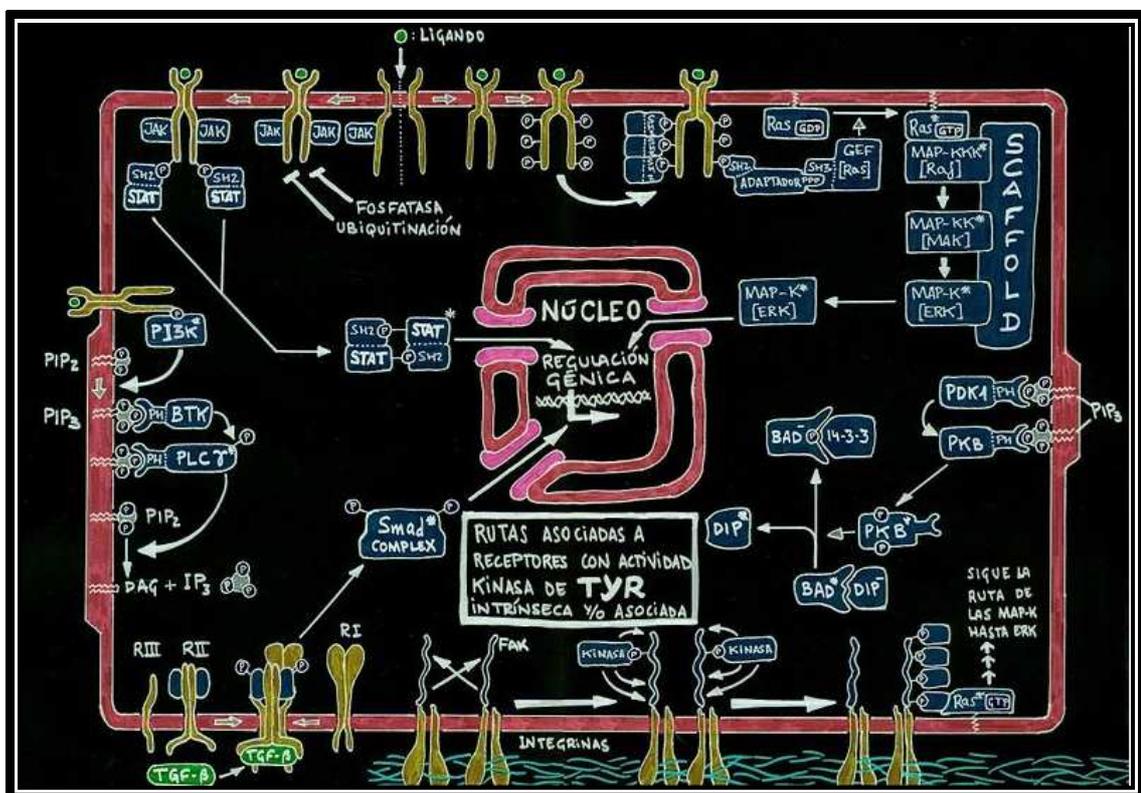


Fig.6. Se muestran las distintas las rutas más significativas dependientes de receptores con actividad quinasa de tirosina, la molécula DAP10 es la presente en humanos y DAP 12 está presente en ratones^[86].

La estimulación de los receptores tirosina quinasa generan auto fosforilación generando así, sitios de unión a proteínas SH2, esta proteína con este dominio SH2 se llama GRb2 que también tiene un factor intercambiador de nucleótidos llamada SOS, así todo el complejo de esta proteína al asociarse al receptor activado por el factor de crecimiento, hace que SOS se asocie a la membrana plasmática e interaccione con Ras (es una proteína con actividad parecida a las proteínas G, su diferencia reside en que ella activa otra vía de señalización y además sus tamaño constituye a la de una subunidad alfa) pequeña proteína de unión de GTP, Ras que interactúa con la proteína serina/treonina quinasa Raf, ésta a su vez fosforila a MEK que tiene a su vez una doble especificidad en treonina y tirosina quinasa y MEK fosforila a ERK (factor de transcripción nuclear) éste se transloca al núcleo y fosforila a Elk-1. Elk-1 es otro factor de transcripción nuclear, en el que desempeña un importante función en la transcripción de genes^[87,88][Fig. 7, A) y B)].

Figura 7. Rutas de señalización en cascada de tirosina



A) , B)(Watson, C.J. *The Jak/Stat pathway* Cell Cycle.2006).

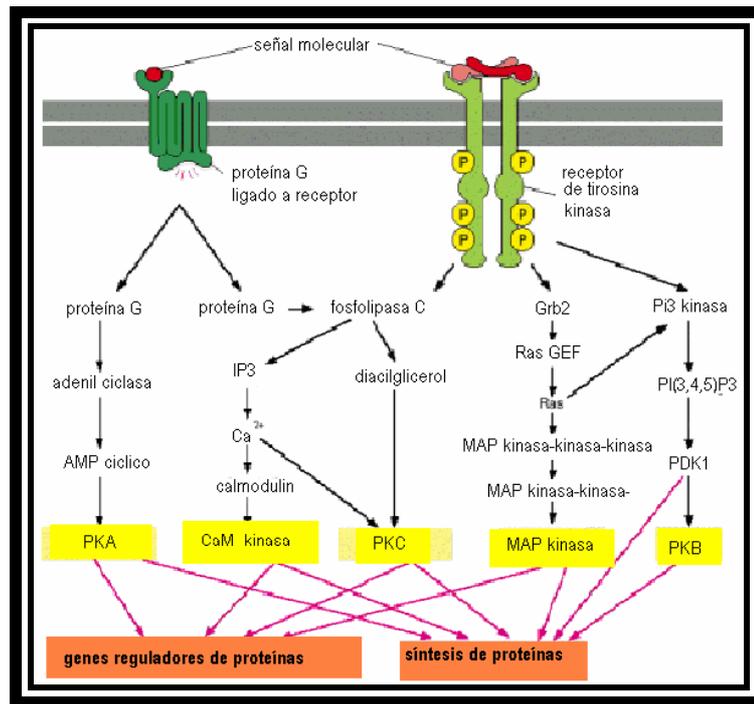


Fig.7 se observa vía de señalización celular es la vía de los segundos mensajeros, como son los derivados de los fosfolípidos de membrana uno de los más conocidos es el PIP2 (fosfatidil inositol 4,5 bifosfato) es un componente de la membrana plasmática y se localiza en la cara interna de ésta.

La vía de señalización intracelular derivada de segundos mensajeros comienza cuando una proteína G activa a la fosfolipasa C (PLC) (activada su isoforma PLC-B por una proteína G y otra PLC-Y tiene dominios SH2 y por lo tanto se asocia a proteínas tirosina quinasa) ésta hidroliza a PIP2 en (DAG) diacilglicerol y en (IP3) inositol-1,4,5-trisfosfato. DAG activa proteínas serina treonina pertenecientes a la familia de las proteínas quinasa C. Mientras que IP3 actúa mediante canales iónicos del reservorio de calcio como es el (RE) retículo endoplasmático lo que libera el Ca²⁺, éste es regulado por la calmodulina, armando un complejo entre los dos. La calmodulina/Ca²⁺ son importantes porque se necesitan para que se activen quinanas CaM. Estas regulan la liberación de neurotransmisores, también fosforila a CREB (factor de transcripción nuclear) ^[89].

Por otro lado, PIP2 puede ser alterado por PI3 quinasa lo que lo convierte en PIP3, éste tienen dianas como proteína serina/treonina quinasa denominada AKT, PIP3 se une a AKT con dominio PH, también a PDKs se une a otro PIP3 entonces PDKs fosforila a AKT.

Esta vía de señalización intracelular de segundos mensajes es muy importante en muchos procesos neurológicos, inmunes y endócrinos ^[89].

2.11. Señalización intracelular por receptores con actividad de Cinasa de Tirosina (RTK'S).

Todas las células eucariotas incluidos los linfocitos T, B y NK poseen mecanismos a través de los cuales los estímulos externos son procesados y enviados al núcleo a través de una serie de cambios bioquímicos que conocemos genéricamente como señales de activación intracelulares o de transducción de señales. Estos mecanismos implican la formación de los denominados segundos mensajeros que son capaces de regular la transcripción específica de un amplio número de genes, los cuales participan en los procesos de crecimiento, división y diferenciación celular^[90].

Estructuralmente los RTK's difieren de manera considerable de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR's). Los RTK's son proteínas de membrana de 600 a 1100 aa, con un solo dominio transmembranal y dominios catalíticos con actividad intrínseca de cinasa de tirosina. Los RTK's son activados predominantemente por factores de crecimiento como el EGF (factor de crecimiento epidérmico), el PDGF (derivado de plaquetas) y el ILGF-1 (factor de crecimiento semejante a insulina tipo 1), aunque algunos receptores a citocinas y hormonas son también RTK's ^[91].

Figura 8. Mecanismo de activación de los receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTK's)

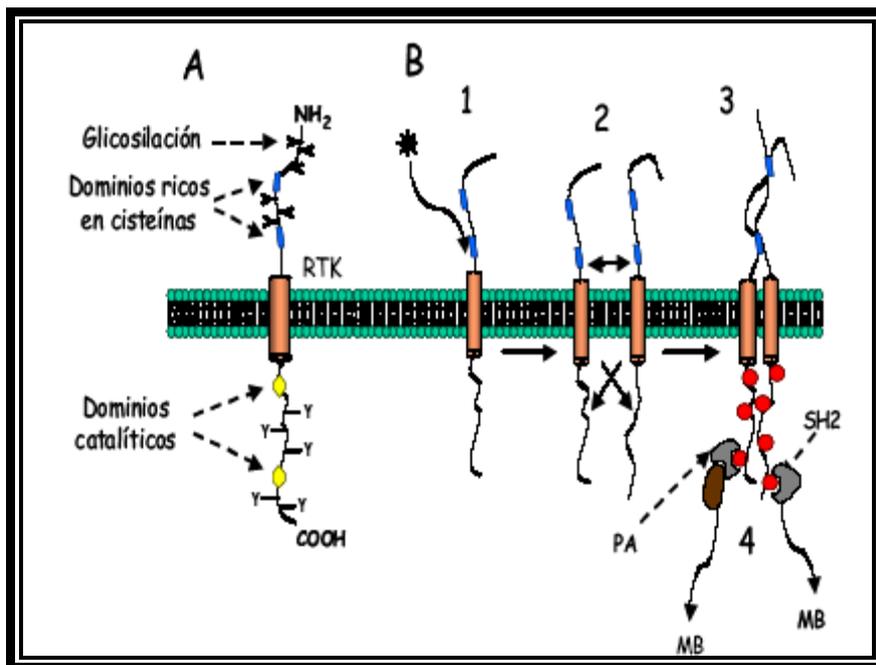


Figura 8. **A)** Representación esquemática de la estructura del receptor para EGF (factor de crecimiento epidérmico), característica de los RTK's del grupo I con un solo dominio transmembranal, el extremo amino terminal orientado al lado extracelular y el carboxilo al intracelular. El extremo amino se encuentra muy glicosilado y expresa dos dominios ricos en cisteínas; en el extremo carboxilo se encuentran residuos de tirosina (Y) y los dos dominios catalíticos con actividad de cinasa de tirosina. **B)** La unión del ligando al receptor (1) induce la dimerización (2) y la autofosforilación en los residuos de tirosina (3).

Los residuos de tirosina fosforilados sirven como centros de activación para proteínas con dominios SH2 (4) o bien como sitios de unión para proteínas adaptadoras (PA), que continúan la señalización hacia las moléculas blanco (MB)^[89].

Los dominios SH2 se unen no sólo a las fosfotirosinas sino también a ciertos aminoácidos adyacentes a las mismas. Esta característica le proporciona especificidad a la activación por fosfotirosinas de las proteínas de señalización, ya que una proteína con dominios SH2 sólo se activará si reconoce a la fosfotirosina con la secuencia correcta de aminoácidos a ambos lados (Fig. 8).

Interesantemente, existe un mecanismo alternativo por el cual pueden activarse proteínas que carecen de dominios SH2. Este proceso requiere de pequeñas proteínas adaptadoras que poseen dominios SH2 así como dominios de unión a otras proteínas de señalización, de manera tal que dichas proteínas adaptadoras se unen a las fosfotirosinas del receptor y posteriormente se acoplan y activan a otras proteínas (fig. 8)^[91].

2.11.1. Ras y cascada de ERK's.

Frecuentemente la activación de RTK's genera señales que inducen proliferación y diferenciación celulares a través de las cinasas de proteína activadas por mitógenos (*mitogenactivated protein kinases*; MAPK's), más recientemente denominadas cinasas reguladas por señales extracelulares (*extracellular signal-regulated kinases*; ERK's). El intermediario que conecta a la cascada de señalización generada por la activación de un RTK con las ERK's es la proteína Ras, que puede unir nucleótidos de guanina y que posee también actividad de GTPasa.

Ras es una GTPasa pequeña (similar a la subunidad de la proteína G, pero con actividad 100 veces menor), que es regulada por proteínas liberadoras de nucleótidos de guanina (GNRP's) y por proteínas estimuladoras de la actividad de GTPasa (GAP's). Las proteínas liberadoras de nucleótidos de guanina activan a Ras al favorecer el intercambio de GDP por GTP, mientras que las proteínas estimuladoras de la actividad de GTPasa finalizan la señalización al aumentar la actividad de GTPasa intrínseca a Ras y que hidroliza el GTP unido a GDP (figura 9)^[92]. Es importante señalar que tanto las proteínas liberadoras de nucleótidos de guanina como las estimuladoras de la actividad de GTPasa son proteínas que se activan por unión a fosfotirosinas presentes en RTK's activados. En el estado activo, Ras activa a la cascada de las ERK's al unirse y activar a Raf, una cinasa de serina/treonina que a su vez fosforila y activa a la cinasa de ERK/MAPK (denominada MEK), enzima que fosforila residuos de serina/treonina y de tirosina.

La activación de ERK's requiere de su fosforilación en un residuo de treonina y en uno de tirosina, separados únicamente por un aminoácido. Esta función sólo puede ser realizada por una enzima altamente especializada, por lo que se considera que MEK es la enzima limitante en la activación de ERK's, haciendo altamente específico este proceso. Finalmente la ERK fosforilada pasa del citoplasma al núcleo y regula por fosforilación a otras cinasas y a proteínas reguladoras de la transcripción (figura 10) ^[93,94]. Dado que MEK es la cinasa de ERK's (o MAPK's), también se le identifica como MAPKK (cinasa de MAPK's). De manera análoga, como Raf es la cinasa de MEK (o MAPKK), también se le denomina MAPKKK (cinasa de la cinasa de MAPK's).

Figura 9. Activación de la proteína Ras.

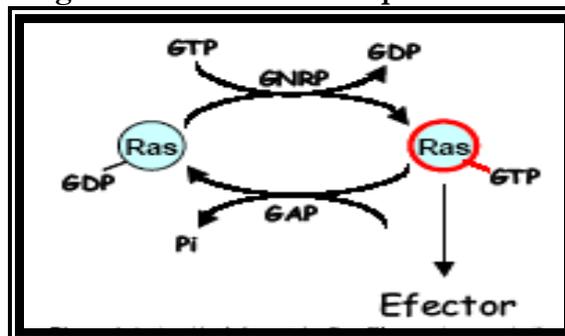


Fig. 9. Muestra el mecanismo es similar a la activación de la unidad α de una proteína G, con intercambio de GDP por GTP, favorecido por proteínas liberadoras de nucleótidos de guanina (GNRP). La inactivación se debe a la hidrólisis del GTP a GDP, debida a la actividad de GTPasa intrínseca a Ras. Este último proceso es acelerado por proteínas estimuladoras de la actividad de GTPasa (GAP).

2.11.2. Transactivación de RTK's ^[89].

En ausencia de ligandos para RTK's, la activación de receptores acoplados a proteínas Gaq (GPCR's-Gaq) induce la fosforilación de la proteína Shc y la formación del complejo Shc-GRB2 ^[95], siendo ambas proteínas adaptadoras involucradas en la activación de la vía Ras-Raf-MEK-ERK a través de su unión a las fosfotirosinas de un RTK activado (fig. 10 y 11), sugiriendo que el RTK había sido activado sin necesidad de interactuar con su ligando.

Figura 10. Activación de las cinasas de proteína activadas (ERK's).

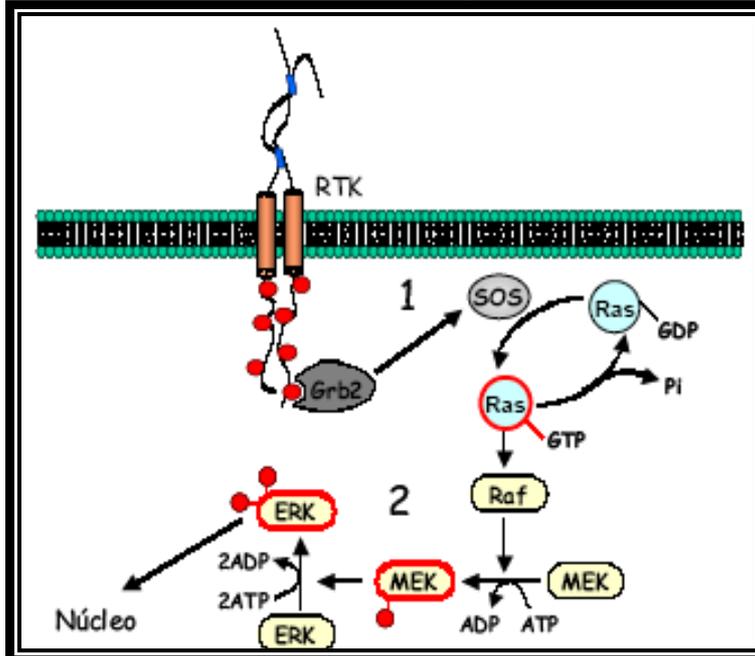


Fig. 10. 1) Una vez que un receptor con actividad de cinasa de tirosina (RTK) se ha dimerizado y autofosforilado, las fosfotirosinas reclutan a GRB2, una proteína acopladora que posee dominios SH2, los cuales sirven de sustrato para la unión de secuencias ricas en prolina presentes en el extremo carboxilo terminal de la proteína SOS, una proteína liberadora de nucleótidos de guanina. La proteína SOS induce la activación de la proteína Ras, al favorecer el cambio al estado activo, unida a GTP. 2) La proteína Ras-GTP se une y activa a la proteína Raf, una cinasa de serina/treonina. A su vez la proteína Raf fosforila y activa a MEK, una cinasa de serina/treonina y tirosina, la cual fosforila y activa a diferentes subtipos de ERK's, que se traslocan al núcleo celular donde fosforilan factores de transcripción que modifican la expresión de genes^[89].

Una vez que el RTK ha sido estimulado por transactivación, la señalización parece ser idéntica a la generada por la unión del ligando correspondiente. El receptor activado une proteínas con dominios SH2 como Shc, GRB2, Gab1 y Src. En particular Shc y GRB2 participan en la activación de la proteína SOS (una GNRP, proteína liberadora de nucleótidos de guanina) que induce la activación de Ras e inicia la cascada Ras, Raf, MEK, ERK^[96] (fig. 10), mientras que Gab1 puede activar la 3-cinasa de fosfatidil-inositol (PI3-K), que a su vez activa a Ras por un mecanismo aún no descrito^[97,98]. Por otra parte, Src es una cinasa de tirosina que se activa al unirse a las fosfotirosinas de RTK's y que induce la transcripción de genes.

Evidencias más recientes muestran que la internalización de los RTK's puede, además de atenuar la señal, desencadenar y modular otras cascadas de señalización^[99,100]. Dado que algunos receptores requieren internalizarse para activar eficazmente a las ERK's, se sugirió que la endocitosis de los receptores acoplados a proteínas G podría ser necesaria para la transactivación de RTK's.

2.12. SOS.

SOS es una proteína transmembrana adaptadora cuya función, una vez fosforilada, es organizar complejos multimoleculares en determinados subdominios lipídicos de la membrana plasmática. Estos complejos contienen proteínas claves en la señalización al interior de la célula como son el GRB2 (growth factor binding protein), SLP-76, la PI3K y Vav-1 ^[101].

2.13. GAP-RAS.

La familia de los proto-oncogenes Ras comprende al menos tres genes que codifican otras tantas proteínas denominadas Ha^v, Ki y N-Ras, que juegan un papel crítico en el control de la proliferación celular ^[102].

Las tirosinas cinasas activadas por la ocupación del TCR no solamente inducen la hidrólisis de fosfolípidos, sino que también activan vías de señalización a través de Ras y mediadas por Lat. Este adaptador fosforilado por ZAP-70 se une a otro adaptador intermediario (Grb-2) que contiene dominios SH2 y SH3^[102]. Este último se une a proteínas específicas fosforiladas en tirosina a través de su dominio SH2 y a una proteína de intercambio de nucleótidos de guanina (Sos) mediante su dominio SH3.

La acción mediada por Ras, hace que Raf se active y actúe como una cinasa de MAPK (MAPKK) que a su vez activa y fosforila una o más MAPKs, incluyendo a ERK-1 y ERK-2, las cuales tras dicha activación migran al núcleo donde regulan por fosforilación a determinados factores de transcripción involucrados en la proliferación y diferenciación celular.

La inactivación de Ras (Ras-GTP) se debe a la acción de la proteína p120^{GAP} o proteína activadora de GTPasa que es la responsable de hidrolizar el GTP unido a Ras y convertirlo en GDP (Ras-GDP) por lo que se la puede considerar como un regulador negativo de Ras.

Esta cascada de señalización termina con la fosforilación de determinados factores de transcripción que participan en la activación y funcionalidad de los linfocitos T ^[103].

2.14. Fosfatidilinositol-3' Cinasa (PI3K).

Además de la PLC γ_1 , otras enzimas presentes en las células T que participa en el metabolismo de fosfolípidos son las denominadas fosfatidilinositol-3' cinasas (PI3Ks), que fosforilan el PIP₂ generando cuatro especies de inosítoles específicos que son; i) el fosfatidilinositol 3-fosfato; ii) el fosfatidilinositol 3,4-bifosfato; iii) el fosfatidilinositol 3,5-bifosfato y iv) el fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato ^[104,105].

PI3K p110 delta tiene una isoforma con una subunidad catalítica delta, es miembro de la familia kinasa de PI3/PI4 conteniendo un dominio B-Zip. Estos 110 kDa

autofosforilan pero no fosforila p85 igual. PI3K p110 delta exhibe un sustrato fosfolipídico específicamente que es requerido por el movimiento direccional de los neutrófilos y es envuelto por el complejo de señalización de receptores de células B y T.

Esta isoforma interactúa con SH2/SH3 y contiene un dominio p85 como adaptador de proteínas y GTP-unido a Ras consiste en las dos subunidades catalítico para p110 y regulatorio para p85 y éstas son activadas por IL-3, IL-4^[105].

2.15. *Proteína activada por las MAP- Cinasas.*

En los últimos años se ha identificado y caracterizado parcialmente un sistema de transmisión de señales crucial no solo para la activación de células T sino también para todas las células eucariotas. Este sistema de traducción de señales está regulado por las MAPKs (mitogen activated protein kinases) que de alguna manera actúan como puente entre tirosinas cinasas próximas a la membrana con otras cinasas que fosforilan en aminoácidos serina/treonina una serie de factores de transcripción regulando así su actividad transactivadora.

Estas MAPKs engloban a una familia de serina/treonina cinasas, que son activadas cuando a su vez se fosforilan en serina/treonina o tirosina. Al menos tres subfamilias de MAPKs han sido bien identificadas, 1) las ERK1 y 2 (Extracellular Regulated Kinases), 2) la subfamilia de c-Jun cinasas, JNK1, JNK2 y JNK3 (también llamadas SAPK), y 3) la subfamilia p38 (p38, p38b, p38g, y p38d)^[106].

Las ERKs activadas migran al núcleo donde regulan la transcripción de c-fos, que forma dímeros con c-jun para formar el complejo AP-1, que es fosforilado por las JNK en la subunidad c-jun, regulando su actividad transcripcional^[106].

Las MAPKs son reguladas a su vez por otras cinasas denominadas MAPKK, y éstas a su vez por otro grupo de cinasas que por inercia han sido llamadas MAPKKK (por ejemplo Raf).

Estas últimas actuarían como integradores de las señales inducidas por la ocupación de receptores de activación (por ejemplo el TCR), fosforilando a las MAPKK, y éstas a su vez fosforilando a las MAPKs en residuos treonina y tirosina^[106].

2.16. *GRB2.*

Growth Factor Binding (GRB2). Es una proteína cuya secuencia de aminoácidos es altamente conservada en la mayoría de las especies, tiene una subunidad SH2 y dos subunidades SH3^[107](Fig. 12).

La estructura genética de GRB2 consiste en cinco exones que van desde 78 a 186 bp y cuatro intrones de aproximadamente 1 a aproximadamente 7kb^[107].

Figura 12. Proteína GRB2

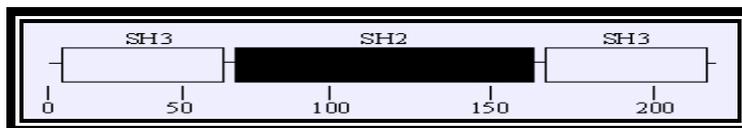


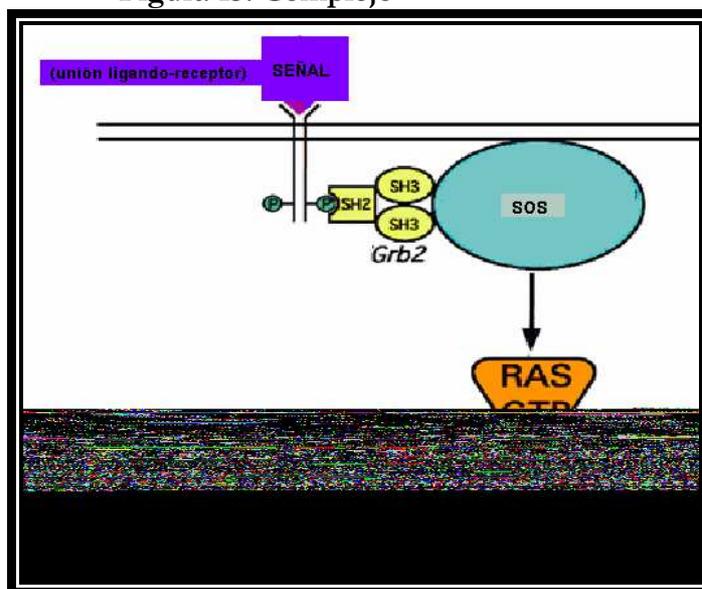
Fig.12 Representación esquemática del dominio estructural de GRB2, que consiste en un simple Src homología 2 (SH2) dominio (residuos 59 - 152) rodeado por dos dominios SH3 (residuos de amino terminal 3 - 54; carboxy-terminal: residuos 160-212)^[107].

GRB2 actúa como un activador o pivote de control en el ciclo celular y motilidad de rutas, es convertido en una señal oncogénica en una diversa variedad de tumores humanos. Por ejemplo, GRB2 directamente interactúa con SOS-1 y la porción de Bcr de la proteína fusionada Bcr-Abl, una oncoproteína tirosina quinasa se sabe que ha sido implicada en la patogénesis del cromosoma Philadelphia que es positivo para leucemias, también interviene en otro tipo de cánceres como son de mama y próstata^[107].

2.17. SOS, Interacción con Ras.

Ras cumple con una función muy parecida a una proteína G, esto es porque se asocia con la membrana celular y contiene un C- terminal, el activador de Ras es una proteína conocida como SOS, se llama así porque su descubrimiento fue durante estudios de señalización en el desarrollo de los componentes del ojo de *Drosophila*^[108]. SOS es citoplasmático, pero es reclutado en la membrana cuando los receptores son activados por la acción de SH2 que contiene la proteína GRB2^[109](Fig. 13).

Figura 13. Complejo



Grb2/Sos/Ras.

Figura 13. Representación esquemática del complejo Grb2/Sos/Ras, se muestran los dominios SH2 y la ruta de activación hacia Ras a partir de la unión del ligando y el receptor, Sos se encuentra en posición transmembranal^[108].

El activador de Ras, llamado Sos tiene dominios estructurales (ver Fig. 14).

Figura 14. Dominios estructurales de Sos.

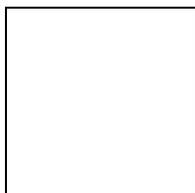


Fig.14. En el esquema se puede observar los puntos de dominio para Grb2 y para Ras^[109].

2.18. VAV.

VAV es un oncogén regulador de la transcripción de células hematopoyéticas e involucrado en el desarrollo de carcinomas humanos.

La clonación y el análisis de la secuencia de aminoácidos del proto-oncogén Vav ha revelado que se trata de una proteína con una estructura modular con muchas

características asociadas a factores de transcripción que contiene al menos nueve dominios proteicos que le permiten formar complejos con otras proteínas^[110].

La proteína Vav participa en la regulación de: liberación de calcio, activación de proteínas G pequeñas de la familia Rho asociadas al movimiento celular, activación de vías de señalización intracelulares dependientes de la cinasa PI3K, señalización mitogénica mediada por la proteína adaptadora Grb2, señalización en células hematopoyéticas mediada por las cinasas ZAP70 y Syk^[110].

Hoy en día se conocen tres genes relacionados: dos proto-oncogenes: Vav1, Vav2 y el oncogén Vav, derivado de Vav1, cuyas mutaciones eliminan los primeros 66 residuos de aminoácidos, perdiéndose así el primer dominio proteico que normalmente modula negativamente al dominio GEF (Guanine Nucleotide Exchange Factor)^[111].

Mientras que Vav se expresa normalmente en linajes hematopoyéticos, su forma oncogénica no se asocia a leucemias pero sí a neuroblastomas y recientemente a cáncer de páncreas^[110-112]. Si bien posee características estructurales semejantes a factores de transcripción, la función mejor comprendida se relaciona al módulo que actúa como factor de intercambio de nucleótidos de guanina de proteínas G de la familia Rho y promueve la expresión de proteínas de matriz ósea como la osteopontina en forma dependiente del factor de transcripción de células T^[111,112].

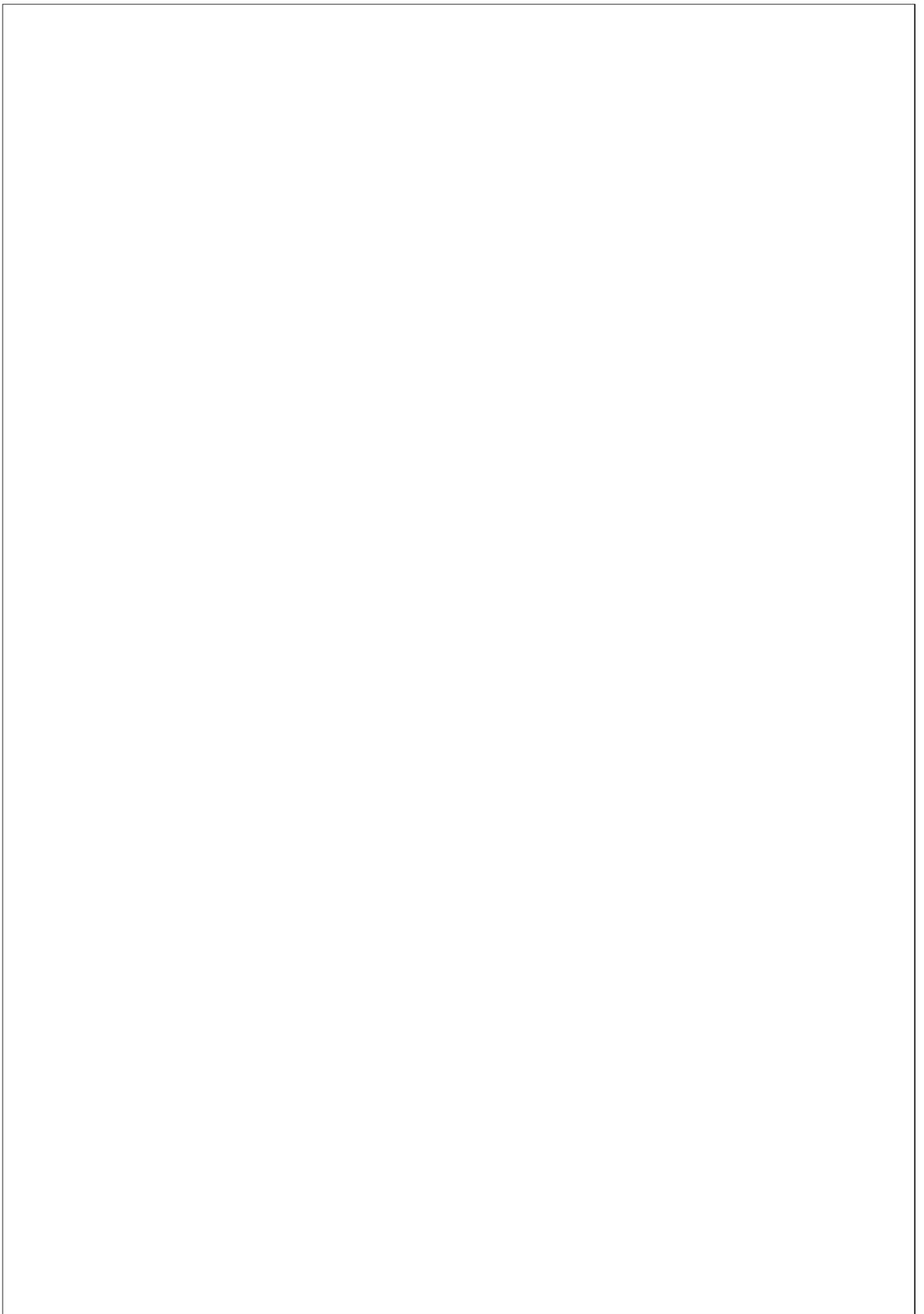
3. JUSTIFICACIÓN

Esencialmente, la expresión de MICB es reconocida en la superficie celular como consecuencia del estrés fisiológico provocado por infección, transformación tumoral, daño a nivel de DNA e inflamación. Adicionalmente, se ha demostrado la participación de estas proteínas en el escape inmunológico tumoral debido a la secreción de formas solubles de MICA/MICB por parte de las células tumorales que se unen a los receptores presentes en células NK y linfocitos T citotóxicos inhibiendo de esta manera su reconocimiento posterior por las células efectoras y, provocando que las células tumorales no sean detectadas y eliminadas.

Resultados generados en nuestro grupo de trabajo nos han permitido demostrar que MICA/MICB son secretadas en forma soluble al medio de cultivo de células derivadas de cáncer de cérvix y en líneas de células leucémicas humanas. Más interesante ha sido comprobar que estas proteínas tienen un efecto proliferador sobre las células tumorales empleadas en nuestro sistema. Por consiguiente, en este proyecto nuestro interés se centra en conocer si este mecanismo autócrino proliferativo de MICB que está mediado por la presencia del receptor NKG2D en las células tumorales leucémicas, tiene efecto sobre los mecanismos de señalización intracelular que se activan en estas células versus lo observado en células NK y T .

Consideramos que al completarse estos estudios nos están sugiriendo otra función no reportada en la biología de las proteínas MICB así como de su receptor, que en la actualidad es reconocido exclusivo de células del sistema inmune NK y linfocitos T, lo que representa una contribución muy importante de este proyecto que tiene la finalidad de investigar de manera particular a los receptores con función de tirosina cinasa que juegan un papel importante en la integración e interpretación de estímulo de la unión NKG2DR y MICB, en las líneas celulares de LMA lo que permite a las células acoplar las señales externas con vías de señalización internas en las que se supone intervienen proteínas tales como PI3K, GRB2 y SOS.

Alteraciones en la expresión y activación de receptores tirosina cinasa, así como sus ligandos y moléculas de señalización intracelular juegan un rol fundamental en el desarrollo de cáncer.



4. HIPÓTESIS

- ❖ Si el mecanismo autócrino proliferativo en MICB está mediado por la presencia del receptor NKG2D en las células tumorales THP-1 y U937 entonces debe haber un efecto intracelular mediante receptores de tirosina en las que se supone intervienen proteínas tales como PI3k, Vav, GRB2 y SOS.

5. OBJETIVOS

5.1. *Objetivo general.*

- Conocer si el mecanismo autócrino proliferativo de MICB tiene efecto sobre los mecanismos de señalización intracelular que se activan en células leucémicas.

5.2. *Objetivos particulares.*

- Analizar el patrón de fosforilación en tirosina en las líneas leucémicas humanas U-937 y THP-1 durante la proliferación inducida por la proteína MICB a diferentes tiempos de estímulo.
- Analizar la participación de las proteínas adaptadoras SOS, GRB2 y de la cinasa PIK3 durante la proliferación inducida por la proteína MICB a diferentes tiempos de estímulo en las líneas leucémicas humanas U-937 y THP-1.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Tipo de estudio: Experimental.

Población objetivo: células tumorales leucémicas THP-1 y U937.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Método completo.

Líneas celulares

El material biológico consiste en líneas celulares de LMA como son THP-1 Y U937 establecidas en el Laboratorio de Oncología L9 de UMIEZ planta baja de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Cultivo celular

Las líneas celulares leucémicas THP-1 y U937, se cultivaron en un medio líquido RPMI 1640 (Microlab, México), con rojo fenol adicionado con un antibiótico (Penicilina-estreptomicina-anfotericina B de 5×10^6 unidades), complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco BRL, USA) v/v inactivo. La botella de SFB congelada, se colocó en un baño a temperatura ambiente para que sea descongelado, posteriormente se pasa a un baño de agua a 56°C durante 30min., con el propósito de eliminar algunas proteínas de bajo peso molecular, como proteínas del complemento, así como inactivar otras para mayor eficiencia en la nutrición celular.

Posteriormente se separó en alícuotas de 50ml para mejor manipulación, conservándose, se en refrigeración a 4°C . Las células se mantuvieron en incubadora (Sanyo, USA) a una atmósfera de 5% CO_2 , una temperatura de 37°C y un ambiente saturado de humedad, posteriormente se centrifugaron las células a 1,500g por 5min. Se retiró el sobrenadante y se agregó un volumen de 2000 μL de RPMI y se contaron con una cámara de Neubauer (American Optical, USA) con la ayuda de un microscopio.

Lisado de células y obtención protéica

Después de haber sido estimuladas con la proteína MICB, las células se lisaron en 1ml de buffer de lisis, se colocó la solución en tubos Eppendorf y se incubaron por 15 min en hielo. Una vez pasado este tiempo las células se centrifugaron por 15 min a 4°C . El sobrenadante resultante fue el lisado celular.

Se agregaron en la proporción 2:1 volúmenes de acetona, para precipitar y lavar la pastilla que contenía el precipitado proteico, dejándose reposar previamente durante toda la noche a -20°C. Se agregaron 20 microlitros de buffer de Laemmli (1x), además de 2.5 microlitros de DTT (Sigma) a cada tubo, se hirvieron por 5 min y se guardaron a -20°C.

Electrophoresis (SDS-Page) y Western-Blot

La electroforesis SDS-PAGE se realizaron de acuerdo al método de Laemmli, utilizando geles de poliacrilamida al 10% para la separación de proteínas. La electroforesis se realizó con un voltaje constante de 85V para el gel concentrador y 120V para el gel separador por 2 horas en una cámara vertical (ATTO).

Las proteínas separadas mediante electroforesis SDS-PAGE se transfirieron a membrana de nitrocelulosa en una cámara de transferencia semiseca. La membrana de nitrocelulosa con las proteínas inmovilizadas se bloquearon con albúmina bovina al 3% (p/v) en buffer TBS durante toda la noche a 4°C.

Todas las membranas fueron incubadas con el anticuerpo anti-fosfotirosina conjugado con peroxidasa durante 1.5 horas. Una vez transcurrido el tiempo de la incubación las membranas se lavaron 5 veces con TBS-Tween por 5 min. c/u y se revelaron utilizando quimioluminiscencia (Pierce, USA).

Elución de anticuerpos

Esta técnica se utilizó para probar anticuerpos diferentes sobre una misma membrana, en este caso se utilizaron para determinar la identidad de las proteínas fosforiladas en tirosina.

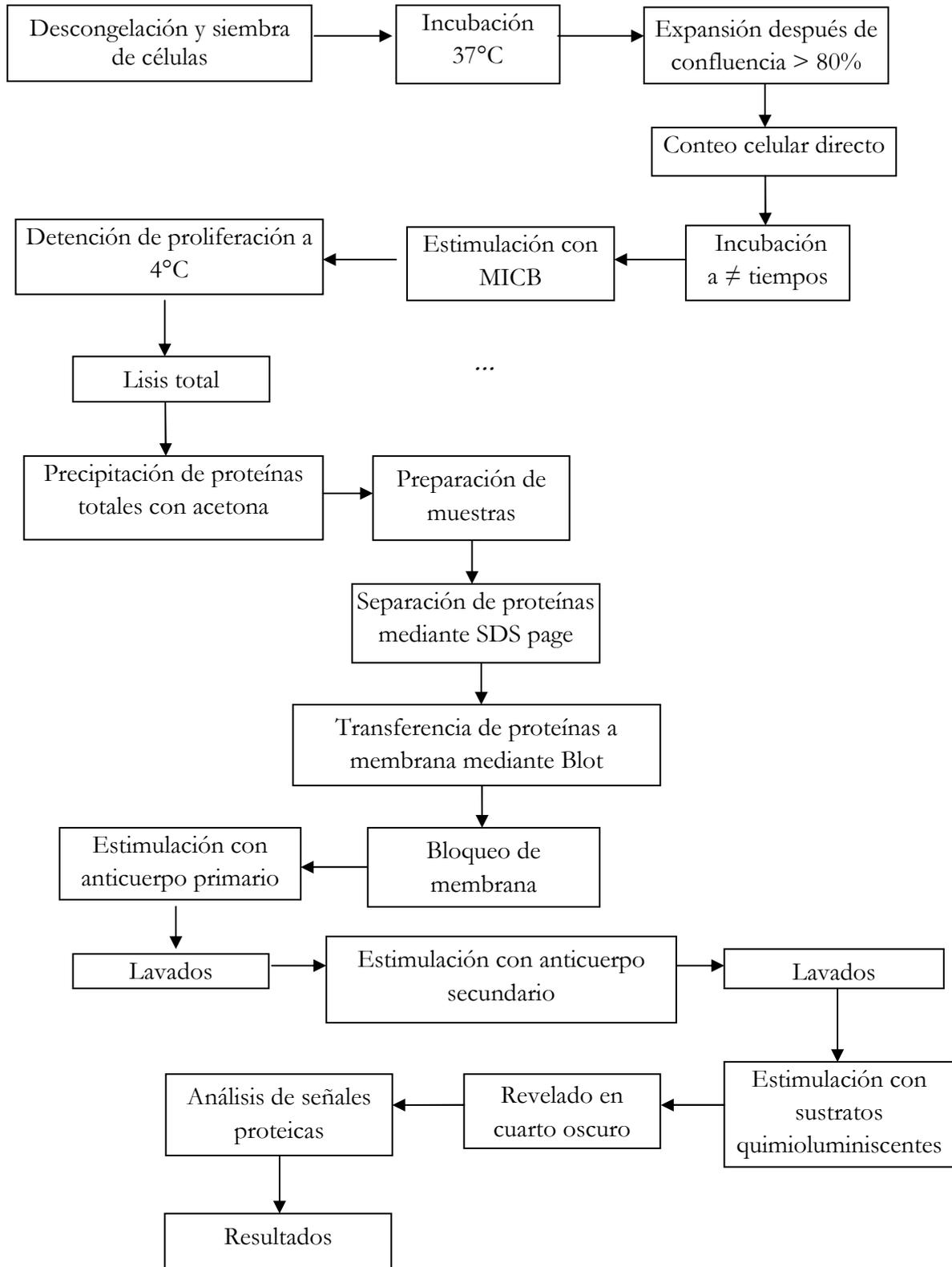
Se incubaron las membranas con la solución de elución (0.5M glicina, 2% SDS, pH 2.5) durante 1 hora a 70-80°C. Se lavó y se bloqueó toda la noche con BSA 3% en TBS.

Posteriormente, fue posible probar por separado otros anticuerpos sobre la misma membrana. Los anticuerpos probados fueron, anti-PI3K, anti-Vav y GRB2, se incubaron por 2 horas, después se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa por 1 hora. El revelado se realizó por quimioluminiscencia.

7.2. Diagrama de flujo

Inmодetección proteica.

En el siguiente diagrama de flujo se integra de manera general el procedimiento realizado para las señales de proteínas, de manera detallada se ha explicado en el apartado anterior, para los reactivos y preparaciones de soluciones ver al final de este trabajo.

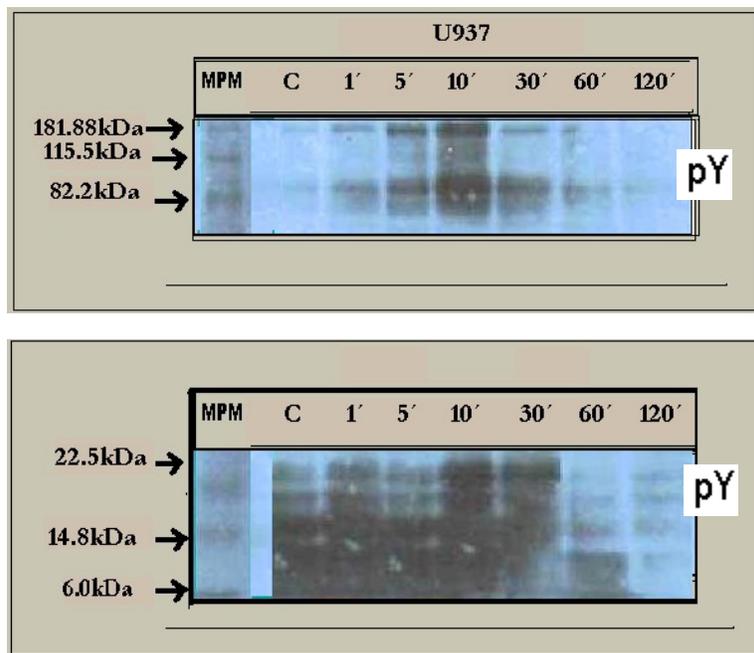


8. RESULTADOS

Patrón de fosforilación en U-937 y THP1 al estimular con MICB

Para determinar los eventos bioquímicos que se disparan al estimular las líneas leucémicas U937 y THP-1 en presencia de MICB se estimularon previamente los cultivos celulares a diferentes intervalos de tiempo. En las imágenes 1 y 2 se muestran los resultados obtenidos y se observa que hay un patrón de fosforilación de proteínas de diferente peso molecular.

Imagen 1. Fosforilación en Tirosina pY en U937.



En la imagen 1, se muestra un gel de poliacrilamida SDS, con fosforilación en tirosina (Py20 conjugado) en lisado total de la línea celular U937 a diferentes tiempos de estimulación con MICB, obsérvese mayor fosforilación en proteínas de bajo peso molecular y una mayor fosforilación en el minuto cinco y diez en proteínas de 64 a 181.88 kDa. Se utilizaron 5×10^6 células /lisado.

Imagen 2. Fosforilación en Tirosina pY en THP-1

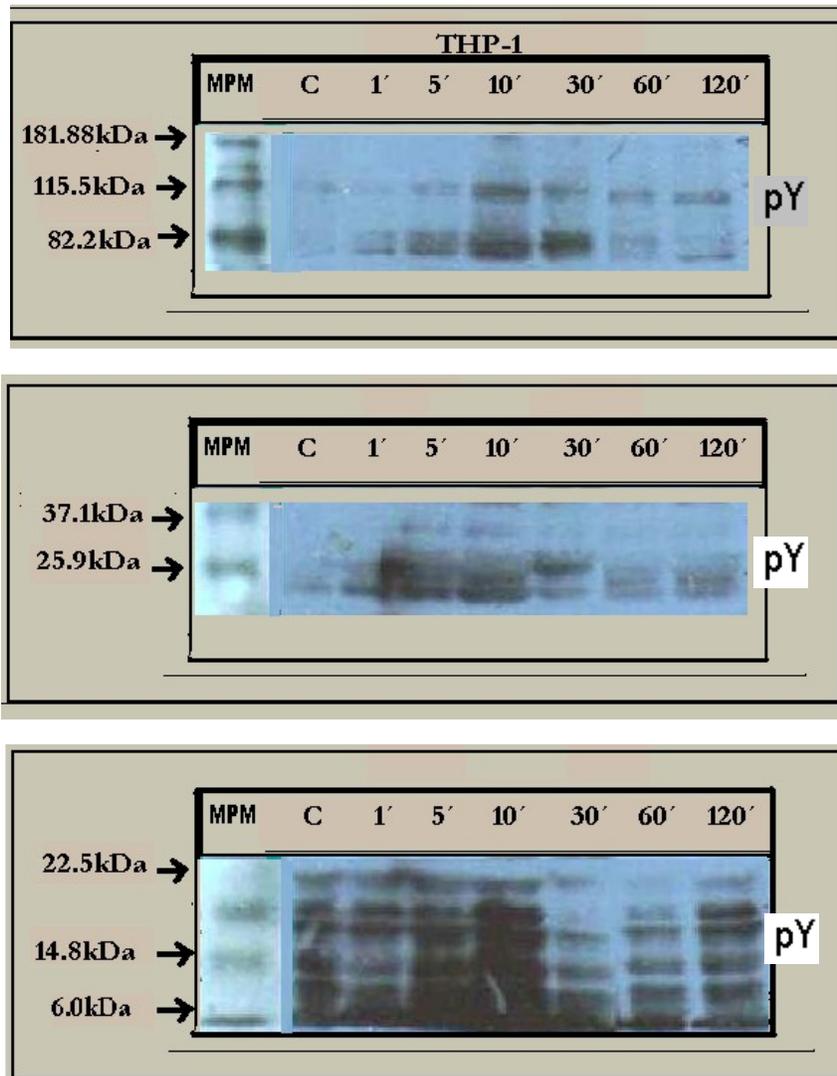


Imagen 2. Se muestra un gel de poliacrilamida SDS page, con fosforilación en tirosina (Py20 conjugado) en lisado total de la línea celular THP-1 a diferentes tiempos de estimulación con MICB, obsérvese mayor fosforilación en proteínas de bajo peso molecular, también hay una mayor fosforilación en el minuto diez de proteínas de 48 a 90kD aprox. Se utilizaron 5×10^6 células /lisado.

Detección de la proteína PI3K en U937 y THP-1

Se ha encontrado que en células NK al reconocer MICB a través del receptor NKG2D una de las proteínas de señalización que se detecta es PI3K. Con la finalidad de conocer si esta proteína está presente en la líneas leucémicas U937 y THP-1, se realizó su detección. Se encontró la señal de la subunidad de 85 kDa. Imagen 3 y 4.

Imagen 3. U937.

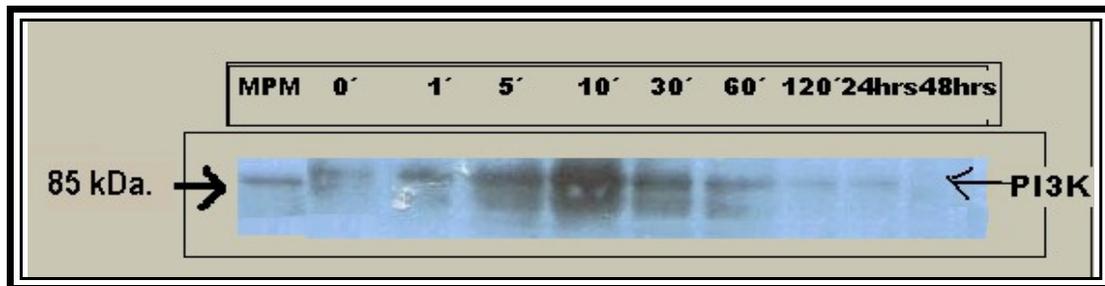


Imagen 3. Se muestra un gel de poliacrilamida SDS page, lisado total de la línea celular U937 a diferentes tiempos de estimulación con MICB, obsérvese mayor señal de PI3K en tiempo 10'. Los anticuerpos utilizados con una dilución para el anticuerpo primario de 1:1000 y 1:6000 para el anticuerpo secundario. Se utilizaron 5×10^6 células /lisado.

Imagen4. THP-1

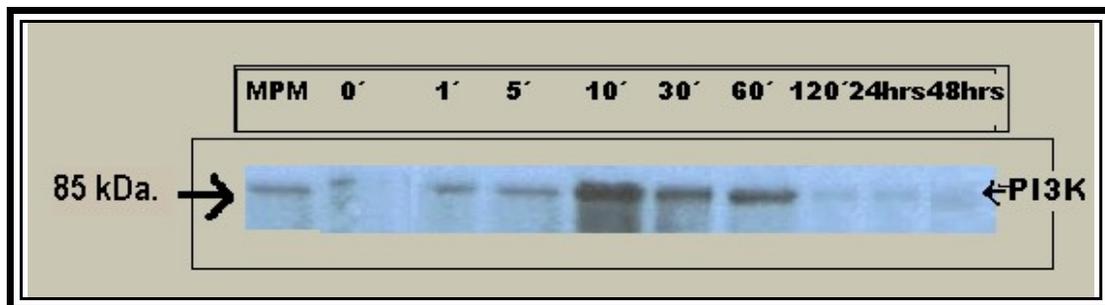


Imagen 4. Se muestra un gel de poliacrilamida SDS page, lisado total de la línea celular THP-1 a diferentes tiempos de estimulación con MICB, obsérvese mayor señal de PI3K en tiempo 10'. Los anticuerpos utilizados con una dilución para el anticuerpo primario de 1:1000 y 1:6000 para el anticuerpo secundario. Se utilizaron 5×10^6 células /lisado.

Detección de GRB2 en U937 y THP-1.

La proteína Grb2 presenta tres subunidades dependientes de prolina, éstas son: 2 de SH3 y 1 de SH2, que como se ha encontrado se unen a la proteína SOS y la proteína adaptadora DAP10, por ello se realizó la detección de señal de esta proteína en estas líneas leucémicas. Encontrándose los siguientes resultados (imagen 5 y 6).

Imagen 5. U937

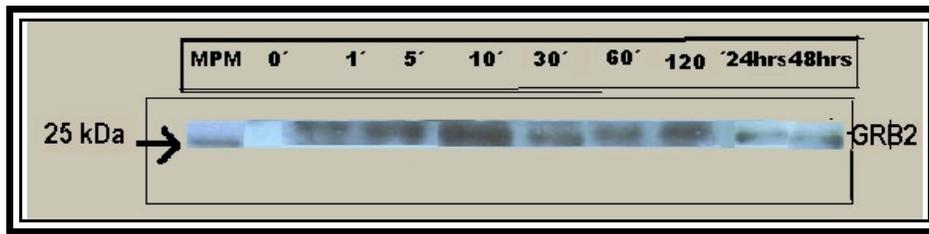


Imagen 5. Se muestra un gel de poliacrilamida SDS page, lisado total de la línea celular U937 a diferentes tiempos de estimulación con MICB, obsérvese mayor señal de GRB2 en tiempo 10'. Los anticuerpos utilizados con una dilución para el anticuerpo primario de 1:1000 y 1:6000 para el anticuerpo secundario. Se utilizaron 5×10^6 células /lisado.

Imagen 6. THP1

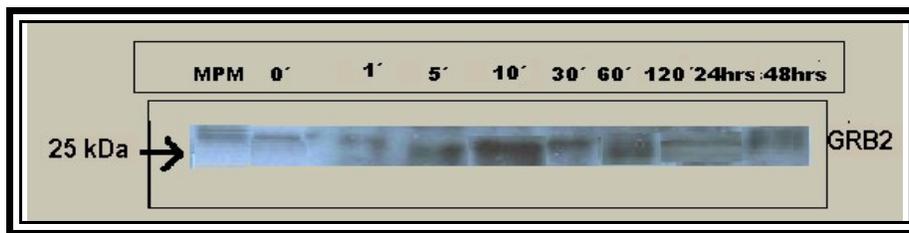


Imagen 6 Se muestra un gel de poliacrilamida SDS page, lisado total de la línea celular THP-1 a diferentes tiempos de estimulación con MICB, obsérvese mayor señal de GRB2 en tiempo 10', sin embargo la señal prevalece dando una señal relativamente fuerte hasta las 24 hrs. Los anticuerpos utilizados con una dilución para el anticuerpo primario de 1:1000 y 1:6000 para el anticuerpo secundario. Se utilizaron 5×10^6 células /lisado.

Detección de SOS en U937 y THP-1.

La proteína SOS presenta la unidades de intercambio con Ras, se ha encontrado que esta molécula adaptadora también presenta una estructura dependiente de prolina PxxP para la subunidad de unión con GRB2, es por ello que se realizó la detección de señal de esta molécula adaptadora en estas líneas leucémicas. Encontrándose los siguientes resultados (imagen 7 y 8).

Imagen 7. U937.



Imagen 7. Se muestra un gel de poliacrilamida SDS page, lisado total de la línea celular U937 a diferentes tiempos de estimulación con MICB, obsérvese mayor señal de SOS en tiempos 5',10' y 30'. Los anticuerpos utilizados con una dilución para el anticuerpo primario de 1:1000 y 1:6000 para el anticuerpo secundario. Se utilizaron 5×10^6 células /lisado.

Imagen 8. THP-1

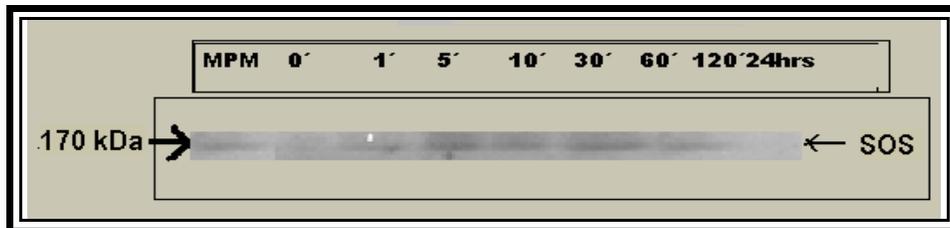


Imagen 8. Se muestra un gel de poliacrilamida SDS page, lisado total de la línea celular THP-1 a diferentes tiempos de estimulación con MICB, obsérvese mayor señal de SOS en tiempos 5',10' y 30'. Los anticuerpos utilizados con una dilución para el anticuerpo primario de 1:1000 y 1:6000 para el anticuerpo secundario. Se utilizaron 5×10^6 células/lisado.

Departament de Ciències, Anàlisi del Repertori de Receptores de Cèl·lules NK en la Infecció per Citomegalovirus Humano, Tesis Doctoral, Gumà U.M., Barcelona, Diciembre 2005 ISBN: 978-84-690-3515-3).

Los efectos de esta interacción están claramente estudiados en las células efectoras que portan el receptor activador NKG2D principalmente los linfocitos T citotóxicos y células NK. Sin embargo, la interacción de los ligandos MICA/MICB y NKG2D en células tumorales aún no ha sido investigada.

La interacción entre los ligandos MICA/MICB y el receptor NKG2D provoca que se estimule la lisis celular en estado de estrés celular a consecuencia de infecciones o desarrollo tumoral.

Resultados de nuestro grupo de investigación han demostrado que células de cáncer de cérvix y de LMA presentan el receptor NKG2D en su superficie. Este dato es completamente nuevo y evidencia un mecanismo que utilizan las células tumorales para evadir la vigilancia inmunológica y consecuentemente su eliminación posterior. En este trabajo nosotros reportamos algunos eventos bioquímicos que se suceden al interior de las células leucémicas al tener interacción el ligando MICA/B con el receptor NKG2D (Mapa B).

En las imágenes 1 y 2 se llevó a cabo la estimulación de células leucémicas U937 y THP-1 con MICB a diferentes tiempos, los resultados nos muestra un patrón de fosforilación interesante. Se observa una señal más evidente al minuto 10 de estímulo y se puede decir que las proteínas que se fosforilan son de bajo peso molecular preferentemente que van de los 6 a los 30 kDa y a su vez también se observan proteínas fosforiladas que van desde los 60 hasta los 100 kDa para ambas líneas leucémicas, como puede observarse en las imágenes 1 y 2 respectivamente.

Estos resultados nos permiten analizar las proteínas que podrían estar participando en el efecto proliferador inducido por las proteínas de estrés celular MICB, como puede verse en las imágenes 1 y 2 de resultados, se fosforilan muchas proteínas que a su vez participan en algunas vías de señalización dependientes de tirosina (como puede verse en la Figura 7) , cuando se une el ligando-receptor induce el cambio conformacional de la proteína receptora (Fig. 9 y 10), permitiendo formar un complejo con proteínas quinasas no receptoras, éstas se asocian y hacen que se dimericen y permite la auto fosforilación (que actúa en los residuos de aminoácidos de tirosina), con la posterior creación de sitios de unión a proteínas con dominio SH2. Este tipo de receptores son importantes en la respuesta inmunológica.

En las imágenes 3 y 4 es posible observar mayor señal de PI3K en tiempo 10' del lisado total de las líneas celulares U937 y THP-1 a diferentes tiempos de estimulación con MICB. PI3K p110 delta tiene una isoforma con una subunidad catalítica delta, es miembro de la familia quinasa de PI3/PI4, su isoforma interactúa con SH2/SH3 y contiene un dominio p85 como adaptador de proteínas y GTP-unido a Ras consiste en las dos subunidades catalítico para p110 y regulatorio para p85 (fig.6 y 7). En las imágenes 5 y 6 se muestra la señal de GRB2 en todos los tiempos de las líneas celulares U937 y THP-1 con un incremento ascendente en el orden de 1', 5', 10', con una disminución a 30', 60', con un ascenso en 120', y disminución a las 24 y 48 horas de estimulación con MICB.

GRB2 que tiene dos dominios SH3 y una SH2 actúa como un activador o pivote de control en el ciclo celular y motilidad de rutas, es convertido en una señal oncogénica en una diversa variedad de tumores humanos. GRB2 directamente interactúa con SOS (Ver Fig. 10,13 y Mapas A, B).

En la imagen 7 y 8 se muestra la señal de SOS en las líneas celulares THP-1 y U937, donde se observa un incremento en los tiempos 5', 10', y 30' de estimulación con MICB, desapareciendo en el minuto 120. Los dominios de unión de SOS son Grb2 y Ras, con el primero se une a su dominio SH2.

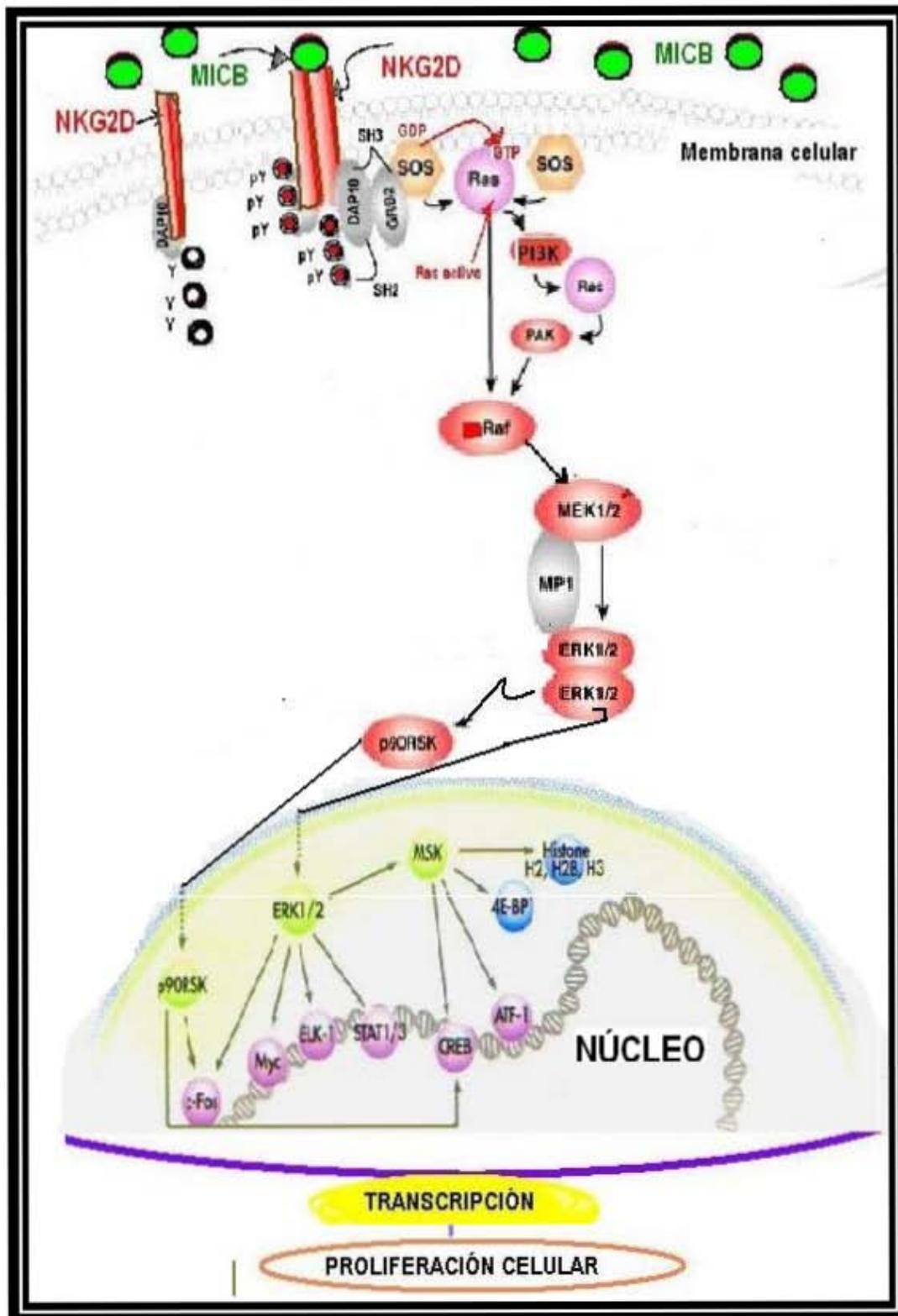
Se ha identificado y caracterizado parcialmente un sistema de transmisión de señales crucial para la activación de células de las líneas celulares THP-1 y U937 al existir la unión del receptor NKG2D con MICB. Este sistema de traducción de señales está regulado por las MAPKs que de alguna manera actúan como puente entre tirosinas cinasas próximas a la membrana con otras cinasas que fosforilan en aminoácidos serina/treonina una serie de factores de transcripción regulando así su actividad transcripcional.

Estas MAPKs son activadas cuando a su vez se fosforilan en tirosina. Las ERKs activadas migran al núcleo donde regulan la actividad transcripcional.

Mediante los resultados obtenidos es posible realizar una comparación con las vías de señalización encontradas previamente en la literatura. (Ver los mapas: vía de señalización conocida mapa A y vía de señalización propuesta para este trabajo mapa B). Considerando los resultados arrojados y en base a la literatura citada, presentamos el siguiente mapa de señalización, que muestra las interacciones intracelulares que se pueden estar llevando a cabo de manera intracelular en las líneas celulares leucémicas con las que se trabajó en

esta investigación, cuando se estimuló la proliferación de MICB a diferentes tiempos.

Mapa B. Señalización en las células tumorales.



Mapa B. Representación esquemática de las principales vías de transducción de señales tras la estimulación de los receptores activadores NKG2D con MICB. [Obsérvese la semejanza existente (Mapa

B) con las vías de señalización conocidas en la interacción MICB/NKG2D en células normales NK(Mapa A)].

Se ha sugerido que la proteína MICB es un biomarcador que indica la patogénesis del cáncer , Si hablamos particularmente, en las Leucemias Humanas podemos decir que trabajos de nuestro grupo de investigación han arrojado que se presenta una expresión aumentada tanto de los receptores NKG2D como de los ligandos MICB correspondientes en las líneas celulares THP-1 y U937, lo que daría lugar a una fuerte estimulación autócrina, para corroborar lo anterior fue necesario conocer el patrón de fosforilación total intracelular dependiente de tirosina y algunas proteínas adaptadoras como GRB2 y SOS, así como de la cinasa PI3K, lo cual resulta de gran importancia puesto que esta vía de señalización no había sido estudiada anteriormente, por lo que resulta una muy importante contribución para el conocimiento de las interacciones entre NKG2D/MICB. Eventos producidos después de la intervención de SOS no son parte de nuestros objetivos para este trabajo, por lo que resulta únicamente su mención en los mapas presentados para tener una mejor explicación.

Los mecanismos por los que MICB induce la proliferación celular, suponemos que incluyen: evasión de linfocito T y células NK, estimulación de la motilidad, adhesión celulares y proliferación, puesto que la vía de señalización propuesta además de estudios precedentes sugieren una cascada de señalización similar a la de las Map kinasas teniendo una transactivación de RTK's, promoviendo así un efecto en la traducción de señales mencionadas.

Es importante señalar que la fosforilación en tirosina mostró la participación de muchas proteínas intracelulares dependientes de residuos de tirosina, los que nos indica que existen otras vías de señalización no descubiertas cuando se lleva a cabo la interacción de MICB/NKG2D, al encontrar la existencia de proteínas como PI3K, GRB2 y SOS mediante sus señales fue posible inducir una vía muy parecida a la existente normalmente para las células NK , pero no encontrada anteriormente en células tumorales, he ahí la relevancia de este trabajo. La investigación de dichos mecanismos tienen aún un amplio campo de desarrollo, por lo que se espera que en tiempo próximo sea posible conocer la participación de mas proteínas intracelulares, conocer sus vías de señalización y así poder buscar alternativas de inhibición para impedir la proliferación celular tumoral, esto podría representar un gran avance en el estudio de los mecanismos de proliferación del cáncer.

10. CONCLUSIONES

- **El estímulo de MICB en las líneas U937 y THP-1 desencadena múltiples señales de fosforilación en tirosina de proteínas con bajo y alto peso molecular preferentemente.**
- **En los eventos intracelulares se detectó la presencia de PI3K, GRB2 y SOS, mediante sus respectivos anticuerpos-antiproteína.**
- **Las señales proteicas obtenidas ocurrieron en tiempos muy cortos de estimulación.**
- **Se presenta la primera evidencia en líneas celulares leucémicas de la presencia de las proteínas PI3K, GRB2 y SOS, por lo que trabajos posteriores podrían completar el estudio de señalización para encontrar mejores biomarcadores y dianas específicas para un mejor diagnóstico y tratamiento del cáncer.**

11. PERSPECTIVAS.

El avance en la terapéutica del cáncer actual es infinitamente superior al de hace sólo unas pocas décadas, pero aún es preciso la realización de múltiples ensayos clínicos y la búsqueda de nuevas dianas cada vez más específicas de la célula tumoral para conseguir incrementar el beneficio del paciente oncológico tanto en supervivencia como en calidad de vida.

Se ha avanzado mucho en el tratamiento y diagnóstico de la LMA, sin embargo la investigación de las proteínas MIC han mostrado una gran relevancia en la participación de los mecanismos de evasión de muerte celular y proliferación de estas células tumorales. Consideramos que estos estudios nos están sugiriendo otra función no reportada en la biología de las proteínas MICB así como de las vías de señalización, lo que representa una contribución muy importante en este proyecto. El presente trabajo permitirá proponer otra estrategia tumoral de escape inmunológico ya que no únicamente estas proteínas estarían participando en la inhibición del tumor vía la secreción de las formas solubles de MICB sino adicionalmente tendrían un efecto mitogénico sobre las mismas células tumorales.

Estudios posteriores relacionados con MICA/B podrían representar una alternativa para el tratamiento de algunos tipos de cáncer.

12. APÉNDICE

12.1. Preparación de soluciones

Gel Separador

Acrilamida 10%3.33 ml

Tris pH 8.81.25 ml

SDS 10%0.1 ml

Persulfato de amonio 1.5% 0.5 ml

Agua destilada4.8 ml

TEMED 0.015 ml

Mezclar los ingredientes en el orden anterior a excepción del TEMED, que se deberá colocar antes de que se vacíe en las placas y dejar que polimerice.

Gel concentrador

Acrilamida1.25 ml

Tris pH 6.82.5 ml

SDS0.1 ml

Persulfato de amonio 0.5 ml

Agua destilada5.6 ml

TEMED0.015 ml

Mezclar los ingredientes en el orden anterior a excepción del TEMED, que se deberá colocar hasta que se vacíe en las placas y dejar que polimerice.

Tris pH 8.8

Disolver 36.3 g de tris en 50 ml de agua destilada, ajustar el pH con HCl concentrado y aforar a 100 ml.

Tris pH 6.8

Disolver 0.05 g de tris en 50 ml de agua destilada , ajustar el pH con HCl concentrado y aforar a 100 ml

Buffer de transferencia (II)

Tris9.1 g

Glicina42.2 g

SDS1.5 g

Mezclar en 2400 ml de agua destilada y ajustar el pH (8.3) con HCl, completar a 2600 ml y agregar 400 ml de metanol.

Buffer (I) 5X

Glicina72 g

Tris15 g

SDS5 g

Disolver el SDS en 100 ml de agua destilada, mezclar los demás ingredientes y aforar a 1000 ml.

Buffer de Elución

Glicina3.75 g

SDS2.5 g

Disolver en agua destilada y ajustar el pH a 2.5 con HCl concentrado y aforar a 500 ml con agua.

Buffer de Muestra (Laemmli)

Azul de bromocresol..... 5 mg

SDS..... 1 g

Glicerol..... 5 ml

Tris pH 6.8.....

TBS

Cloruro de sodio 5 M..... 30 ml

Tris 1 M20 ml

Mezclar los ingredientes y aforar a 1000 ml con agua destilada.

TBS Tween A 500 ml de la solución anterior agregar 500µl de tween 20.

Buffer de lisis.

Para 50 ml.

500 µl de tritón

50 µl de orto vanadato 0.1M

100 ml de EDTA 0.5 M

500 µl Tris 1 M

3 ml fluoruro de sodio 0.5 M

1 ml pirofosfato de sodio 0.1 M

1.5 ml de NaCl 5 M

500 ml de PMSF 0.1 M *

500 µl leupetina 100 µg/ml*

500 µl aprotinina 1800 µg/ml*

500 µl pepstanina 100 µg/ml *

* se agrega al buffer el día que se va a utilizar

PBS 1x.

Cloruro de potasio0.2 g

fosfato de potasio monobásico0.2 g

Cloruro de sodio8.0 g

Fosfato de sodio monobásico2.16 g

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

Nota: Preparar una solución 20X de la solución anterior.



13. BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Junco M., Montaña A., Aguayo A. Bases moleculares del Cáncer *revista de investigación clínica*, 2006. **58**, 56-70.
2. DeVita V., Hellman S., Rosenberg S. *Cancer, principles & practice of oncology*, 2005. **45**, 65.
3. Balmain A. Cancer as a complex genetic trait: tumor susceptibility in humans and mouse models. *Cell*, 2002. **108**, 145-152.
4. Oft M., Akhurst R., Balmain A. Metastasis is driven by sequential elevation of H-ras and Smad2 levels. *Nat. Cell Biol.*, 2002. **70**, 85-93.
5. Bosch F., Manos M., Muñoz N., Sherman M., Jansen A., Peto J., Schiffman M., Moreno V., Kurman R., Shah K., Group IS. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective, *J Natl. Cancer Inst.*, 1995. **87**, 796-802.
6. Bosch F., Comino R., Galera H., Guerra A., Hernández F., Nogueira J., Rodríguez M., Diagnostico de la infección genital por el Virus del Papiloma Humano (VPH), *JJ*, 2002. **7**, 287-294.
7. Registro histopatológico de neoplasias malignas en México, 2005./Globocan 2005. <http://www-depdb.iarc.fr/globocan/GLOBOframe.html>
8. Lazcano P. Cervical cancer screening in developing countries : why is it in effective? The case of Mexico, *Arch Medicine Reserch*, 1999. **30**, 240-250.
9. Bosh F. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer, *Journal Nat. Cancer Institute*, 2002. **87**, 796-802.
10. Douglas M. Probabilidad y Estadística, *Ed. Mac Graw Hill*, 1995. **5**, 89-94.

11. Salmerón J., Franco F., Salazar E., Lazcano E. Panorama epidemiológico de la mortalidad por cáncer en el IMSS, *Salud Pública* 1997. **39**, 266-273.
12. Estadísticas de mortalidad relacionada con la salud reproductiva. *Salud pública*, Mex 1999. **41**, 138-146.
13. Schatz D., Malissen B. Lymphocyte development, *Curr. Opin. Immunol.*, 2002. **14**, 183-185.
14. Deininger M., Goldman J., Melo J. The molecular biology of chronic myeloid leukemia, *Blood* 2000. **96**, 3343-3356.
15. Dirección general de epidemiología. Histopathological Registry of malignant Neoplasma, SSA, 1996.
16. Bromberg J. Cancer, *International journal of cancer*, 2000. **88 (3)**, 363-368.
17. Dahlke M., Larsen S., Rasko J., Schlitt H. The biology of CD45 and its use as a therapeutic target. *Leuk Lymphoma*, 2004. **7**, 27-29.
18. Eisinger M., Lee J., Hefton J., Darzykiewicz A., Chiao J., Deharven E. Human epidermal cell cultures - growth and differentiation in the absence of dermal components or medium supplements, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1979. **76**, 5340.
19. Freshney. Culture of animal cells. A manual of basic technique. *Cience edit*, 1987. **18**, 29-40.
20. Barnes D., Sato G. Methods for growth of cultured cells in serum free-medium, *Anal. Biochem.*, 1980. **102**, 255-270.
21. Pelman D. Use of antibiotics in cell culture media, *Meth. Enzymol.*, 1979. **58**, 110-116.
22. Adams R. Cell culture for biochemists, Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, *gen. edit.* 1990. **6**, 30-46.
23. Conn P. Cell culture. Methods in Neuroscience, *Academic Press*, 1990. **5**, 29-36.

24. Biología celular, *Manual de prácticas*, 1986. **1**, 8-15.
25. Curtis H., Bernes N. Invitación a la biología, *Editorial Médica panamericana*, 1996. **3**, 583-602.
26. Abbas A., Lichtman A., Pober J. Inmunología celular y molecular, *Ed. McGraw-Hill. Madrid España*, 1999. **4**, 63-67, 218- 220.
27. Kennedy C., Naipalan A., Gruis A. , Strujik L., Ter S., Willemze R., Frans H., Bouwes N., Doxiadis I. MICA gene polymorphism is not associated with an increased risk for skin cancer, *The journal of investivative dermatology*, 2002. **4**, 686-691.
28. Mizuki N., Ota M., Kimura M. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: A strong association of the six GCT repetitions with behcet disease, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1997. **94**, 1298-1303.
29. Trowslade J. Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes, *Immunity*, 2001. **15**, 363-374.
30. Groh V., Bahram S., Bauer S., Herman A., Beauchamp M. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1996. **93**, 45-50.
31. Mendoza J., Partida O., Soto I., Corona M., Rangel R., García A., Weiss B. Los genes MIC (MHC class I chains related genes): su importancia en la respuesta inmune no específica y en condiciones patológicas, *Vertientes* 2001. **4**, 11-18.
32. Zwirner N., Marcos C., Mirbaha F., Zou Y. Identification of MICA as a new polymorphic alloantigen recognized by antibodies in sera of organ transplant recipients, *Human Immunology*, 2000. **61**, 917-924.
33. Kersemaekers A. Oncogene alterations in carcinomas of uterine: Overexpression of the epidermal growth factor receptor is association with poor Prognosis, *Clinic Reserch*, 1999. **5**, 577-586.

34. Radosavljevic M., Cuillerier B., Wilson M., Clement O., Wicker S. A cluster of ten novel MHC class I related genes on human chromosome 6q24.2-q25.3., *Genomics* 2002, **79**, 114-123.
35. Yokoyama W., Plougastel B. Immune functions encoded by the natural killer gene complex, *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**, 304-316.
36. Regueiro J., López L. Biología y Patología del Sistema Inmune, *Inmunología*, 1996. **15**, 22-66.
37. Paulsson K. Evolutionary and functional perspectives of the major histocompatibility complex class I antigen-processing machinery, *Cell Mol Life Sci.* 2004. **61**, 46-60.
38. Villadangos J. Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them, *Mol. Immunol.*, 2001. **38**, 329-346.
39. Murata S. Mechanisms of antigen processing, *Nippon Rinsho*, 2005. **63**, 287-92.
40. Bahram S. MIC genes: from genetics to biology, *Adv Immunol.*, 2000. **76**, 1-60.
41. Ando H., Mizuki N., Ota M., Yamazaki M., Ohno S., Goto K. Allelic variants of the human MHC class I chain-related B gene (MICB), *Immunogenetics*, 1997. **46**, 499-508.
42. Mendoza J., Arguello J., Perez M., McWhinnie A., Marsh S., Fischer G., Characterization of the MICA polymorphism by sequence-specific oligonucleotide probing, *Immunogenetics*, 1999. **49**, 471-478.
43. Bahram S., Bresnahan M., Geraghty D. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994. **91**, 59-63.
44. Bahram S., Spies T. The MIC gene family, *Rev. Immunol.*, 1996. **147**, 328-33.
45. Bahram S., Spies T. Nucleotide sequence of a human MHC class I MICB cDNA, *Immunogenetics*, 1996. **11**, 43:230.

46. Gaudieri S., Leelayuwat C., Townend D., Mullberg J., Cosman D. Allelic and interlocus comparison of the PERB11 multigene family in the MHC, *Immunogenetics*, 1997. **45**, 09-16.
47. Das H., Groh V., Kujil C., Sugita M., Morita C., Spies T. MICA Engagement by human Vg2Vd2 T cells enhances their antigen-dependent effector function, *Immunity*, 2001. **15**, 83-93.
48. Pellet P., Vaneensberghe C., Debré P., Sumyuen M. MIC genes in non-human primates, *Journal of immunogenetics*, 1999. **26**, 239-241.
49. Fodil N., Laloux L., Wanner V., Pellet P., Hauptmann G., Mizuki N., Inoko H., Spies T., Theodorou I. Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene, *Inmunogenetics*, 1996. **44**, 35.
50. Groh V., Steinle A., Bauer S. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial g dT cells, *Science*, 1998. **27**, 37-40.
51. Bahram S. MIC genes: from genetics to biology, *Advances in Immunology*, 2001. **76**, 1-60.
52. Li P., Willie ST., Bauer S., Morris DL., Spies T., Strong RK., Crystal structure of the MHC class I homolog MIC-A a $\gamma\delta$ T cell ligand, *Immunity*, 1999. **10**, 1-20.
53. Groh V., Wu J., Yee C. & Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T- cell activation, *Nature*, 2002. **419**, 734-738.
54. Hankey K., Drachenberg C., Papidimitriou J., Klassen D., Philosophe B., Bartlett S., Groh V., Spies T. MIC expression in renal and pancreatic allografts, *Transplantation*, 2002. **73**:2:304-306.
55. Zwirner N., Fernández M. MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells and monocytes, *Inmunogenetics*, 2002. **47**, 39-48.

56. Jinushi M., Takehara T., Tatsumi T., Kanto T., Groh V., Spies T., Kimura R., Miyagi T., Mochizuki K., Sasaki Y. Expression and role of MICA and MICB in human hepatocellular carcinomas and their regulation by retinoic acid, *Int. J. Cancer*, 2003. **104**, 354-361.
57. Regueiro G., López L., González R., Martínez N. Biología y Patología del sistema inmune, *Inmunología*, 2002. **65**, 29-36.
58. Tieng V., Bouguéneq C., Du L., Bertheau P., Desreumaux P., Janin A., Charron D. Binding of Escherichia coli adhering AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA, *Immunology*, 2002. **99**:5:2977-2982.
59. Karlhofer F., Ribaldo R., Yokoyama W. MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ of IL-2 activated natural killer cells, *Nature*, 2002. **358**, 66-70.
60. Wagtmann N., Rajagopalan S., Winter C., Peruzzi M., Long E.O. Killer cell inhibitory receptors specific for HLA-A and HLA-B identified by direct binding and by functional transfer, *Immunity*, 1995. **3**, 801-809.
61. Colonna M., Samaridis J. Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells, *Science*, 1995. **268**, 405-408.
62. Carretero M. The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural Killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules, *J Immunol.*, 1999. **27**, 563-567.
63. Holmes M., Li P., Petersdorf E., Strong R. Structural of allelic diversity of the MHC class I homolog MIC-B, a stress-inducible ligand for the activating immunoreceptor NKG2D, *Journal of immunology*, 2008. **93**, 1395-1400.

64. Wu J., Song Y., Bakker A., Bauer S., Spies T., Lanier L., Phillips J. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10, *Science*, 1999. **285**, 730-732.
65. Houchins J., Yabe T., McSherry C., Bach F., DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells, *J. Exp. Med.*, 1997. **173**, 1017-1020.
66. Leiner L. Natural killer cell receptor signaling, *Current opinion immunology*, 2003. **15**, 1-7
67. Fan Q., Long, E., Crystal structure of the human natural killer cell inhibitory receptor KIR2DL1-HLA-Cw4 complex, *Nat. Immunol.*, 2001. **2**, 452-460.
68. Diefenbach A., Jamieson A., Liu S., Shastri N., Raulet D. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and macrophages, *Nat. Immunol.*, 2009. **1**, 119-126.
69. Jamieson A., Diefenbach A., McMahon C., Xiong N., Carlyle J., Raulet D. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing, *Immunity*, 2002. **17**, 19-29.
70. Vetter C., Groh V., Straten P., Spies T., Brocker E., Becker J. Expression of stress-induced MHC class I related chain molecules on human melanoma, *J. of investigative dermatology*, 2002. **118**:4:600-605.
71. Sutherland C., Chalupny N., Schooley K., VandenBos T., Kubin M., Cosman D. UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells, *J Immunol.*, 2007. **168**, 671-679.
72. Cosman D., Mullberg J., Sutherland C., Chin W., Armitage R., Fanslow W., Kubin M., Chalupny N. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor, *Immunity*, 2001. **14**, 123-133.

73. Groh V., Rhinehart R., Scecrist H., Vauer S., Grabstein K., and Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gd Tcells of MICA and MICB, *Proc. Natl. Acad.Sci.*, 1999. **96**, 6879-6884.
74. Yokoyama W. Immunology: catch us if you can, *Nature*, 2002. **419**, 679-680.
75. Lainer L. NK cell recognition, *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**, 225-274.
76. Raffaghello L. Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastomas, *Neoplasia*, 2004. **6**, 558-568.
77. Gilfillan S., Ho E., Cella M., Yokoyama W., Colonna M. NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation, *Nat Immunol.*, 2002. **3**, 1150-1155.
78. Hynes N. Tyrosine kinase signalling in breast cancer, *Breast Cancer Res*, 2000. **2**, 154-157.
79. Zhang W., Samelson L. The role of membrane-associated adaptors in T cell receptor signaling, *Seminars in immunology*, 2000. **12**, 35-41.
80. Janeway C., Medzhitov R. Innate immune recognition, *Annu Rev Immunol.*, 2002. **20**, 197-216.
81. Girardi M., Oppenheim D., Steele C., Lewis J., Glusac E., Filler R. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells,. *Science*, 2001. **294**, 605-609.
82. Dickson C., Spencer B., Dillon C., Tyrosine kinase signalling in breast cancer. Fibroblast growth factors and their receptors, *Breast Cancer Res.*, 2000. **2**, 191-196.
83. López X. Leucemia mieloide crónica, modelo para los inhibidores de cinasas de tirosina, *Rev. Invest. Clin.*, 2003. **2**, 192.

84. Brachmann S. Role of phosphoinositide 3-kinase regulatory isoforms in development and actin rearrangement, *Mol. Cell Biol.*, 2005. **25**, 2593-2606.
85. Katso R. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2001. **17**, 615-675.
86. Vanhaesebroeck B. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases, *Exp. Cell Res.*, 1999. **253**, 239-254.
87. Ouaked F., Rozhon W., Lecourieux D., Hirt H., A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants, *The EMBO Journal*, 2007. **22**, 1282-1288.
88. Hirt H. Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction, *Science*, 2002. **1**, 11-15.
89. Abell K., Watson C. The Jak/Stat pathway: a novel way to regulate PI3K activity, *Cell Cycle*, 2006. **4**, 897-900.
90. Trombetta E., Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo, *Annu Rev Immunol.*, 2005. **23**, 975-102.
91. Robinson M., Cobb M. Mitogen-activated protein kinase pathways, *Current Opinion in Cell Biology*, 2007. **2**, 180-186.
92. Pazin M., Williams L. Triggering signaling cascades by receptor tyrosine kinases, *Trends Biochem Sci*, 1992. **17**, 374-8.
93. Pelech S., Sanghera J. Mitogen-activated protein kinases: versatile transducers for cell signaling, *Trends Biochem Sci*, 1992. **17**, 233-8.
94. Treisman R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades, *Curr Opin Cell Biol.*, 1996. **8**, 205-15.
95. Rosen L., Greenberg M. Stimulation of growth factor receptor signal transduction by activation of voltage

- sensitive calcium channels, *Proc Natl Acad Sci.*, 1996. **93**, 1113-8.
96. Downward J. The GRB2/sem-5 adaptor protein, *FEBS Lett.*, 1994. **338**, 113-7.
97. Ptasznik A., Trayno A., Bokoch G. G protein-coupled chemoattractant receptors regulate Lyn tyrosine kinase-Shc adapter protein signaling complexes, *J Biol Chem.*, 1995. **270**, 69-73.
98. Holgado M., Emler D., Moscatello D., Godwin A., Wong A. A Grb2-associated docking protein in EGF and insulin-receptor signaling, *Nature*, 1999. **379**, 560-4.
99. Vieira A., Lamaze C., Schmid S. Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis, *Science* 1996. **274**, 2086-9.
100. Chow J., Condorelli G., Smith R. Insulin-like growth factor-1 receptor internalization regulates signaling via the Shc/mitogen-activated protein kinase pathway, but not the insulin receptor substrate-1 pathway, *J Biol Chem.*, 1998. **273**, 4672-80.
101. Myung P., Boerthel N. Adapter proteins in lymphocyte antigen-receptor signaling, *Curr. Opin. Immunol.*, 2000. **12**, 256-266.
102. Audero E., Giordano S., A *Drosophila* SH2-SH3 adaptor protein implicated in coupling the sevenless tyrosine kinase to an activator of Ras guanine nucleotide exchange SOS., *The Journal of biological chemistry*, 2005. **19**, 216-252.
103. Clark S., Stern M., Horvitz H. *Elegans* cell-signalling gene sem-5 encodes a protein with SH2 and SH3 domains, *Nature*, 1992. **356**, 340-344.
104. Hynes N. Tyrosine kinase signalling in breast cancer, *Breast Cancer Res.*, 2000. **2**, 154-157.

105. Bardelli A., Basile M., Comoglio P. Concomitant activation of pathways downstream of Grb2 and PI 3-kinase is required for MET-mediated metastasis, *Oncogene*, 1999. **5**, 1139-1146.
106. Yamauchi T., Ueki K., Tobe K., Tamemoto H., Sekine N., Wada M., Honjo M., Takahashi M., Takahashi T., Hirai H., Tsushima T., Akanuma Y., Fujita T., Komuro I., Yazaki Y., Kadowaki T. Growth hormone-induced tyrosine phosphorylation of EGF receptor as an essential element leading to MAP kinase activation and gene expression, *Endocrine journal*, 1998. **45**, 27-31.
107. Saucier C., Papavasiliou V., Palazzo A., Naujokas M., Kremer R., Park M. Use of signal specific receptor tyrosine kinase oncoproteins reveals that pathways downstream from Grb2 or Shc are sufficient for cell transformation and metastasis, *Oncogene*, 2002. **12**, 1800-1811.
108. Sean E., Giddings W., Brooks W., Buday L., Sizeland M., Weinberg R. Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation, *Nature*, 1993. **363**, 45-51.
109. Simon M., Dodson G., Rubin G. An SH3-SH2-SH3 protein is required for p21Ras1 activation and binds to sevenless and Sos proteins in vitro, *Cell*, 1993. **1**, 169-177.
110. Vav, un oncogén regulador de la transcripción de células hematopoyéticas e involucrado en el desarrollo de carcinomas humanos, *Gaceta Biomédicas*, Mayo de 2007.
111. Raberger J., Boucheron N., Sakaguchi S., Penninger J.M. Impaired T-cell development in the absence of Vav1 and Itk, *Eur. J. Immunol.*, 2008. **38**, 3530-3542.
112. Fujikawa K., Miletic A., Alt F., Faccio R., Brown T., Hoog J., Fredericks J., Nishi, S. Vav1/2/3-null mice define an essential role for Vav family proteins in lymphocyte development and activation but a differential requirement in MAPK signaling in T and B cells, *J. Exp. Med.*, 2003. **198**, 1595-1608.

