



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**LABORATORIO DE ONCOLOGÍA CELULAR
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN
CELULAR Y CÁNCER**

**“ CINÉTICA DE PROLIFERACIÓN DE DOS
LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE CÉRVIX EN
RESPUESTA A DIFERENTES CONCENTRACIONES
DE ANTI-MIC-A Y ANTI-IL-2 ”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

KARLA ISABEL MEDRANO ORTIZ

DIRECTORA DE TESIS:

M. EN C. ROSALVA RANGEL CORONA



México D.F. 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A MI HIA FRIDA:
ERES LO MEJOR QUE ME PUDO HABER REGALADO EL CIELO
GRACIAS POR EXISTIR
TE AMO.....

AGRADECIMIENTOS

- ② Gracias adiós por darme la fuerza necesaria para vivir y llegar hasta el final de esta etapa, dándome la oportunidad de lograr algunas de mis metas y cumplir mi sueño de terminar una carrera.
- ② Gracias a mis padres (Carlos y Josefa) y hermanos por brindarme su apoyo incondicional en los buenos y malos momentos durante esta travesía.
- ② Gracias a mi mamá Chabela, que siempre estuvo al pendiente de mí y que ahora aunque no está conmigo sé que me sigue cuidando desde el cielo.
- ② Gracias a la familia Vega Becerra y Escandón Medrano porque creyeron en mí y me animaron en todo para seguir adelante.
- ② Gracias a la M. en C. Rosalva Rangel por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo.
- ② Gracias a mis amigos de carrera Claudia, Ana, Vero por compartir buenos y malos momentos los cuales nunca olvidare porque nunca me dejaron sola en esta etapa.
- ② Gracias a mis amigos del laboratorio, Itzel, Eve, Andres, Memo, Tania, Leo, Chen, que me ayudaron durante mi estancia.
- ② Gracias al Dr. Arturo Valle por brindarme su amistad y su ayuda incondicional.
- ② Gracias a la Dra. Teresa Corona al Dr. Armando Cervantes y aquellas personas que de una u otra forma tuvieron alguna aportación en este trabajo.
- ② Gracias a Joseluis Barragán por escucharme y estar ahí siempre que lo necesito, gracias por apoyarme y tener siempre una palabra de aliento. Siempre estarás presente en mis sueños y logros eres lo mejor que puede haber encontrado en esta vida. Te amo

ÍNDICE

RESUMEN	1
MARCO TEÓRICO	2
A. CÁNCER	3
B. CÁNCER DE CÉRVIX (CaCu)	4
C. SISTEMA INMUNE	7
C.1 Inmunidad Innata	8
C.2 Inmunidad Adaptativa	8
C.3 Anticuerpos	10
C.4 Distribución natural y producción de los anticuerpos	11
C.5 Características de la estructura molecular de los anticuerpos	13
D. FRACCIÓN CONSTANTE Fc	14
E. USO TERAPEUTICO DE LOS ANTICUERPOS	16
F. COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (CMH)	19
F.1 Moléculas de clase I del CPH	19
F.1.1 Características de las moléculas de clase I	20
F.1.2 Productos de los genes de clase I	22
F.1.3 Familia de genes MIC	22
G. PROTEÍNA MIC-A	23
H. CITOCINAS	24
I. INTERLEUCINA 2	27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
JUSTIFICACIÓN	31
OBJETIVOS	32
HIPÓTESIS	33
MATERIAL Y MÉTODOS	34
RESULTADOS	36
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIÓN	52
PERSPERTIVAS	53
BIBLIOGRAFÍA	54
APÉNDICE	59

RESUMEN

El cáncer causa 7 millones de muertes cada año, es decir el 12.5% de la población mundial muere por esta causa (Esparza M. y Vallejos A. 2006). Siendo una de las enfermedades más importantes como factor de mortalidad a nivel mundial.

El cáncer de cérvix (CaCu) representa un grave problema de salud pública, a nivel nacional, significo el 1.7% de defunciones ocurridas en el 2008. En México, es la segunda causa de muerte en mujeres, cada 2 horas se registra un deceso por causa de este cáncer.

Los principales tratamientos terapéuticos dirigidos hacia el cáncer, utilizados solos o en combinación son la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia y la terapia inmunológica.

La terapia con anticuerpos monoclonales, es considerada una forma de inmunoterapia pasiva, que tiene como objetivo dirigir selectivamente el tratamiento al microambiente tumoral. Dada la baja toxicidad de los anticuerpos, que tienen un limitado impacto en las moléculas de los órganos, cuya diana son las células tumorales. Actualmente, en la terapia de algunos tipos de cáncer se utilizan anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos tumorales específicos dando como resultado una dramática disminución de las masas tumorales.

Por esta razón, este trabajo se enfocó en determinar el efecto de los anticuerpos anti-MIC-A y anti-IL-2, sobre la proliferación de células de CaCu. Para ello, se realizaron ensayos utilizando la técnica de cristal violeta en dos líneas de cáncer de cérvix CALO e INBL, las cuales se cultivaron en presencia de anticuerpos monoclonales anti-MIC-A y anti-IL-2 a diferentes concentraciones y tiempos. Los resultados obtenidos indican que anti-MIC-A inhibe la proliferación celular a las concentraciones de 0.025, 0.25, 25 y 500 ng/ml, mientras que a 2.5 y 1000 ng/ml la proliferación aumenta. Otra contribución importante de este trabajo es que bajas concentraciones de anti-IL-2 inhibe la proliferación de ambas líneas celulares. Lo que nos hace pensar que la proliferación celular de estas líneas de CaCu depende de IL-2.

También, observamos que el anticuerpo anti-MIC-A tiene un efecto diferencial, sobre la proliferación de estas líneas dependiendo de la concentración utilizada. Ya que en algunas concentraciones contribuyen a la proliferación mientras que en otras la inhibe.

Estos datos son muy importantes ya que si se piensa en el uso de anticuerpos como alternativa terapéutica para cáncer de cérvix, se debe considerar que este tumor puede crecer en presencia de algunos anticuerpos. Finalmente, discutimos que existe la posibilidad de que las células de cáncer de cérvix, utilizadas en el presente estudio, pueden expresar el receptor para Fc γ R del tipo II o III, ya que ambas líneas celulares modifican su proliferación en presencia de una anti-IgG, utilizada como control, del mismo isotipo de anti-MIC-A y anti-IL-2. La presencia de este receptor Fc γ R le permitiría a las células de CaCu proliferar en presencia de diferentes anticuerpos o bien montar una respuesta de escape inmunológico.

MARCO TEORICO

A. CÁNCER

El cáncer se puede definir como el crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos. Casi todos los cánceres forman tumores (piel, boca, pulmón, senos, estómago, colon y útero) pero no todos los tumores son malignos; la mayor parte son benignos (no generan metástasis). Los tumores benignos se caracterizan por un crecimiento localizado (no crece en forma desproporcionada ni agresiva) y suelen estar separados de los tejidos vecinos por una cápsula. Los tumores benignos tienen un crecimiento lento y una estructura semejante al tejido del que proceden. El principal atributo de los tumores malignos es una capacidad de diseminación fuera del lugar de origen. La invasión de los tejidos vecinos puede producirse por extensión o infiltración, produciendo crecimientos secundarios conocidos como metástasis. La localización y vía de propagación de las metástasis varía en función de los cánceres primarios (Calvo JC., et al. 2003).

Durante este proceso las células tumorales acumulan mutaciones que pueden llevar a cambios en la expresión de proteínas o bien pueden expresar proteínas virales oncogénicas. Estos cambios pueden ser detectados por el sistema inmune y suelen constituir lo que se conoce como antígenos tumorales. Existen varios cientos de formas distintas de cáncer, siendo tres los principales subtipos: El primer subtipo, son los sarcomas que proceden del tejido conectivo como huesos, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo. El segundo subtipo, son los carcinomas proceden de tejidos epiteliales como la piel, epitelios que tapizan las cavidades y órganos corporales, tejidos glandulares de la mama y próstata. Los carcinomas de estructura similar a la piel se denominan carcinomas de células escamosas. Los que tienen una estructura glandular se denominan adenocarcinomas. En el tercer subtipo se encuentran las leucemias y linfomas que incluyen los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas. Estos últimos producen inflamación de los ganglios linfáticos, invasión del bazo, médula ósea y sobreproducción de células blancas inmaduras (Alonso P., et al. 2000; Calvo JC., et al. 2003).

A nivel mundial, el cáncer es la principal causa de mortalidad, se le atribuyen 7.9 millones de defunciones ocurridas en 2007. La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que alrededor de 84 millones de personas morirán a causa de esta enfermedad entre 2005 y 2015 (INEGI. 2009).

B. CÁNCER DE CÉRVIX (CaCu)

Se reconocen principalmente dos tipos de tumores sólidos de CaCu: 1) El Epidermoide, espinocelular o de células escamosas, y 2) El adenocarcinoma. El primero se origina en el epitelio plano estratificado que recubre el ectocérvix y el segundo en el epitelio cilíndrico que tapiza el canal endocervical (Alonso P., et al. 2000).

El cáncer de cérvix se origina en el epitelio estratificado, normalmente muy cerca de su unión con el epitelio columnar del canal cervical. La causa de su confinamiento a esta región particular del epitelio es algo desconocido todavía pero al menos este hecho hace fácil estudiar los cambios que preceden a la aparición del cáncer (Cairns J., 1981).

Los estudios sobre la epidemiología del CaCu han demostrado que esta entidad se comporta como una enfermedad de transmisión sexual y diversos factores de riesgo parecen estar involucrados en su desarrollo. Los de mayor asociación son inicio temprano de relaciones sexuales, número de parejas sexuales, infecciones virales y bacterianas, hábitos reproductivos, uso de anticonceptivos orales, hábitos dietéticos, tabaquismo, antecedentes de infecciones por el virus papiloma humano (existen aproximadamente 100 tipos de este virus que se encuentran clasificados por números según las lesiones que ocasionan y el sitio de infección) constituyen los más importantes factores de riesgo para esta enfermedad. No se puede dejar de mencionar los antecedentes previos de una lesión intraepitelial, el bajo nivel socioeconómico, entre otros (Brostoff J., et al. 1993; Nazzari O., et al. 2003; Carrillo A., et al. 2004).

También, se ha mostrado una fuerte asociación entre los virus del papiloma humano (VPH) y neoplasias cervicales, los subtipos de alto riesgo del virus papiloma son los responsables de las lesiones precancerosas y del CaCu.

En años recientes se ha notificado la existencia de más de 100 tipos de VPH, siendo las variantes 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 las consideradas como de alto riesgo por encontrarse asociadas al CaCu en más de 95% de los casos. Por

otra parte, se informa que otros tipos de VPH, como el 6, 11, 42, 43 y 44 muestran una débil asociación a éste cáncer, denominándolos de bajo riesgo (Tirado G., 2005).

En México se ha encontrado que alrededor de 99.7% de CaCu puede atribuirse a ciertos tipos de VPH, el 16 presenta la mayor porción (50%), seguido por el VPH 18 (12%), el VPH 45 (8%) y el VPH 31 (5%). Los tipos 16 y 18 son los responsables de la mayoría de los cánceres de cérvix. No obstante, el VPH no constituye una causa suficiente de esta enfermedad; son necesarios ciertos cofactores para que un porcentaje de infecciones persistentes por VPH logre en algún momento progresar y dar lugar al cáncer (Alonso P., et al. 2000., Nazzal N., et al. 2006).

El CaCu es una enfermedad progresiva, por lo cual los investigadores la dividen en estadios del I al V (Cómbita A., et al. 2003)

Estadio 0 o carcinoma in situ. El carcinoma *in situ* es un cáncer muy temprano. Las células anormales se encuentran sólo en la primera capa de células que recubren el cuello uterino, y no invaden los tejidos más profundos del cuello uterino.

Estadio I. El cáncer afecta el cuello uterino, pero no se ha diseminado a los alrededores.

I-a: Una cantidad muy pequeña de cáncer, sólo visible por microscopio, se encuentra ya en el tejido más profundo del cuello uterino.

I-b: Una cantidad mayor de cáncer se encuentra en dicho tejido.

Estadio II. El cáncer se ha diseminado más allá del cuello uterino, pero no hasta la pared pélvica o hasta el tercio inferior de la vagina.

II-a: El cáncer se ha diseminado fuera del cuello uterino a los dos tercios superiores de la vagina.

II-b: El cáncer se ha diseminado al tejido alrededor del cuello uterino.

Estadio III. El cáncer se ha diseminado a toda el área pélvica. Puede haberse diseminado a la parte inferior de la vagina, o infiltrar los uréteres (los tubos que conectan los riñones a la vejiga).

Estadio IV. El cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo.

IV-a: Diseminación a la vejiga o al recto (órganos cerca del cuello uterino)

IV-b: Diseminación a órganos distales como los pulmones.

El CaCu es la segunda neoplasia (alteración de la proliferación y diferenciación celular, que se manifiesta por la formación de una masa o tumor), más común en países en vías de desarrollo, donde se diagnosticaron el 80% de los casos. (Consensos Statement. 1997).

Se cree, que los tumores malignos son capaces de evadir o superar los mecanismos de defensa del huésped. La posibilidad de erradicar los cánceres mediante respuestas inmunitarias específicas ha sido la base que ha inspirado numerosas investigaciones en el campo de la inmunología tumoral. La función fisiológica del sistema inmunológico consiste en reconocer y destruir los clones de células transformadas antes de que se conviertan en tumores y destruir tumores una vez que se han formado (Abbas A., et al. 2002).

La respuesta inmunológica es el resultado de la interacción del antígeno con linfocitos que poseen proteínas receptoras específicas en la superficie de las membranas. El tratamiento ideal de los tumores debería ser capaz de eliminar selectivamente las células cancerosas, algo que desgraciadamente no se logra con la mayoría de los tratamientos convencionales. Por esta razón, se piensa que el sistema inmune puede ser utilizado en terapia tumoral como una herramienta altamente selectiva (Regueiro G., et al. 2003).

El sistema inmune es capaz de reconocer determinados antígenos tumorales y a veces responder frente a ellos. En modelos animales y en algunos casos excepcionales de humanos se ha demostrado que esta respuesta es capaz de eliminar ciertos tumores. Sin embargo, es obvio que en la mayoría de los casos, aunque exista una respuesta inmunológica, esta es incapaz de erradicar el tumor. Las razones de esta ineficiencia se están empezando a desentrañar: muchos tumores desarrollan lo que se conoce como mecanismo de escape, es decir, estrategias que le permiten subvertir la respuesta inmune (Regueiro G., 2003).

C. SISTEMA INMUNE

La inmunología es el estudio de la inmunidad, así como de los fenómenos celulares y moleculares que tienen lugar después de que un organismo entre en contacto con microbios y otras macromoléculas extrañas. El término inmunidad deriva del latín *immunitas*, que se refiere a la protección frente a los procedimientos judiciales que se ofrecía a los senadores romanos durante el ejercicio de su cargo. Históricamente,

inmunidad significa protección contra la enfermedad. Las células y las moléculas responsables de la inmunidad forman el sistema inmunitario, la respuesta colectiva coordinada frente a sustancias extrañas se denomina respuesta inmunológica. La función fisiológica del sistema inmune es la defensa contra microorganismos infecciosos. Sin embargo, las sustancias extrañas no infecciosas también pueden desencadenar respuestas inmunitarias. (Abbas A. y Lichtman A. 2004).

El sistema inmune surgió durante la evolución para combatir las infecciones causadas por virus, bacterias, protozoos, hongos y helmintos. Estos patógenos pueden ser responsables de infecciones intracelulares o extracelulares para las cuales la respuesta inmunológica debe ser diferente. De hecho el sistema inmune ha desarrollado una variedad de respuestas apropiadas para combatir cada tipo de patógeno, al mismo tiempo que mantiene la tolerancia a los componentes del propio organismo, la principal prueba de la función del sistema inmune es el gran número de infecciones persistentes que sufren los individuos que padecen alguna inmunodeficiencia, ya sea heredadas o adquiridas que afectan algún componente de la respuesta inmunológica. Para eliminar un patógeno que haya establecido una infección (atravesando las barreras epiteliales de los vertebrados) lo primero que debe de hacer el sistema inmune es reconocerlo como tal y a continuación desarrollar una respuesta adecuada para destruirlo. Para ello, ha desarrollado dos tipos de mecanismos; innato y adaptativo, cuya diferencia principal reside en las estructuras de reconocimiento de los patógenos, ya que los mecanismos efectores de destrucción son esencialmente similares. La erradicación de algunos tumores parece ser más bien una función secundaria, derivada del correcto mantenimiento de la tolerancia a lo propio y rechazo a lo extraño. (Regueiro G., et al. 2003).

La defensa frente a los microorganismos está mediada por las reacciones tempranas de la inmunidad innata y las respuestas tardías de la inmunidad adaptativa. La inmunidad innata comprende los mecanismos de defensa bioquímicos y celulares presentes incluso antes de que se produzca la infección y que están preparados para responder con rapidez ante esta. Estos mecanismos reaccionan sólo frente a microorganismos y no frente a sustancias no infecciosas y responden esencialmente de la misma manera ante infecciones repetidas (Abbas A. y Lichtman A. 2004).

C.1 Inmunidad Innata

La inmunidad innata se basa en la activación de una serie de moléculas preformadas (proteínas del complemento) como de fagocitos, monocitos, macrófagos, neutrófilos y mastocitos, que tienen receptores innatos para múltiples patógenos. Algunos mecanismos innatos se inducen en respuesta a la infección, a células citolíticas naturales (linfocitos NK) o moléculas como los interferones (IFN) (especialistas en virus), las citocinas y otros mediadores que producen inflamación. La estrategia de la inmunidad innata consiste en reconocer un grupo de patrones moleculares altamente conservados comunes a un grupo o familia entera de patógenos. La inmunidad innata es, por tanto, capaz de combatir la infección desde el mismo momento de su inicio y durante sus primeras fases (Regueiro G., et al. 2003).

En contraste con la inmunidad innata, existen otras respuestas inmunitarias que son estimuladas por la exposición a agentes infecciosos y que aumentan en magnitud y capacidad de defensa con cada exposición sucesiva a un microorganismo determinado. Esta forma de inmunidad se denomina adaptativa por que se produce como una respuesta a la infección y se adapta a esta. Las características que definen la inmunidad adaptativa son una especificidad precisa por distintas moléculas y una capacidad de recordar y responder con más intensidad a la exposición repetida a un mismo microorganismo (Regueiro G., et al. 2003).

C.2 Inmunidad Adaptativa

La inmunidad adaptativa, específica o adquirida reconoce patógenos con los que nunca ha entrado en contacto. Los responsables principales de la inmunidad adaptativa son los leucocitos denominados linfocitos T y B, que tienen unos receptores de reconocimiento de patógenos extremadamente específicos, denominados TCR (receptor de células T) y BCR (receptor de células B) respectivamente. Los linfocitos son capaces de reconocer a los patógenos tanto fuera (linfocitos B) como dentro de las células (linfocitos T). Para combatir a los patógenos extracelulares o sus productos, los linfocitos B secretan una forma soluble del receptor de membrana por el que reconoció al patógeno, que se denomina anticuerpo. Las estructuras de los patógenos reconocidas por los anticuerpos se denominan antígenos. Los anticuerpos no eliminan directamente al patógeno o al antígeno, si no que facilitan su destrucción por los mecanismos de la inmunidad innata (Regueiro G., et al. 2003).

La inmunidad específica se basa en la generación y mantenimiento del repertorio prácticamente ilimitado de linfocitos capaces de reconocer cualquier antígeno mediante

el TCR o BCR. El antígeno simplemente selecciona entre todos los linfocitos B o T aquellos que son capaces de reconocerlo (Regueiro G., et al. 2003).

Existen dos tipos de repuestas inmunitarias adaptativas, denominadas inmunidad celular e inmunidad humoral, que están mediadas por diferentes componentes del sistema inmunitario y cuya función es eliminar distintos tipo de microorganismos. En la inmunidad por células, participan linfocitos T. Dirigida a microorganismos intracelulares, como virus y algunas bacterias, las cuales sobreviven y proliferan en el interior de los fagocitos y otras células del huésped, donde son inaccesibles a los anticuerpos circulantes (Abbas A. y Lichtman A. 2004).

La defensa frente a dichas infecciones es una función de la inmunidad celular, la cual favorece la destrucción de los microorganismos que residen en los fagocitos o de las células infectadas con el fin de eliminar los reservorios de la infección (Abbas A. y Lichtman A. 2004).

La inmunidad humoral está mediada por moléculas de la sangre y las secreciones mucosas, denominadas anticuerpos, que son producidas por células que reciben el nombre de linfocitos B. Los anticuerpos reconocen los antígenos microbianos, neutralizan la capacidad infecciosa de los microorganismos y los eliminan mediante diversos mecanismos efectores. La inmunidad humoral es el principal mecanismo de defensa contra los microorganismos extracelulares y sus toxinas, ya que los anticuerpos reconocen a los antígenos sintetizados, se unen a los microorganismos y sus toxinas ayudan a eliminarlos. Los propios anticuerpos están especializados, de modo que los distintos tipos pueden activar diferentes mecanismos efectores. Por ejemplo, algunos tipos de anticuerpos estimulan la fagocitosis, mientras que otros activan la liberación de mediadores de la inflamación por parte de leucocitos, como los mastocitos (Abbas A. y Lichtman A. 2004).

C.3 Anticuerpos

Los anticuerpos se unen a los antígenos de forma específica tanto en la base del reconocimiento como en la efectora de la inmunidad humoral. La interacción del antígeno con los anticuerpos de membrana en los linfocitos B vírgenes inicia las respuestas de linfocitos B y, por tanto, constituye la fase de reconocimiento de las respuestas inmunitarias humorales. Los anticuerpos también se producen en una forma secretada por linfocitos B estimulados por el antígeno. La eliminación del antígeno

requiere a menudo la interacción del anticuerpo con componentes del sistema inmune innato, que incluyen moléculas tales como proteínas del complemento y células como fagocitos y eosinófilos. Las funciones efectoras mediadas por los anticuerpos incluyen la neutralización de microbios o de productos microbianos tóxicos, la activación del sistema del complemento, la opsonización de antígenos por una fagocitosis potenciada, la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (CCDA), mediante la cual los anticuerpos se dirigen a los microbios para que se produzca su lisis por células del sistema inmune innato y la hipersensibilidad inmediata, en la que los anticuerpos desencadenan la activación de los mastocitos (Abbas A., et al. 2002).

El reconocimiento del antígeno es la base sobre la que se asienta la respuesta inmune específica, tanto en el caso de las respuestas mediadas por linfocitos B como en el caso de las respuestas mediadas por linfocitos T. Las inmunoglobulinas (Ig) son las moléculas específicas para antígenos producidas por los linfocitos B, y el principal papel de estas células en la respuesta inmune es, por tanto, la síntesis de dichas moléculas (Abbas A. y Lichtman A. 2004).

El nombre de inmunoglobulinas se debe a que son globulinas (proteínas séricas distintas a la albumina) inmunitarias.

Las Ig son un grupo amplio de proteínas presentes en el suero y fluidos tisulares de todos los mamíferos, y pueden encontrarse en forma soluble (anticuerpos) o ancladas a la membrana de los linfocitos B constituyendo el receptor para antígeno (BCR) de estas células (Abbas A., et al. 2002).

C.4 Distribución natural y producción de anticuerpos

Los anticuerpos se distribuyen en los líquidos biológicos por todo el cuerpo y se encuentran en la superficie de un número limitado de tipos celulares. Los linfocitos B son las únicas células que sintetizan anticuerpos. Dentro de los linfocitos B, los anticuerpos se encuentran en compartimientos citoplásmicos rodeados de membrana (retículo endoplásmico y complejo de Golgi) y en la superficie, donde se expresan como proteínas integrales de la membrana. Las formas (isotipos) de anticuerpos que son secretadas se encuentran en el plasma, en las secreciones mucosas y en el líquido intersticial de los tejidos. Los anticuerpos sintetizados y secretados por los linfocitos B con frecuencia se unen a la superficie de otras células efectoras inmunitarias, como los fagocitos mononucleares, los linfocitos NK (natural killer, citolíticos naturales) y los mastocitos, que expresan receptores específicos para unirse a moléculas de anticuerpo (Abbas A. y Lichtman A. 2004).

Un ser humano adulto sano de 70 kg produce aproximadamente 3 g de anticuerpos todos los días. De esta cantidad, casi dos tercios corresponden a un anticuerpo de IgA, que es producido por linfocitos B en las paredes de los aparatos digestivo y respiratorio y se transporta activamente hacia la luz. Los anticuerpos que entran en la circulación tienen una vida media corta, el tipo más frecuente de anticuerpo que se encuentra en el suero se denominado IgG, tiene una vida media de 3 semanas (Tabla 1) (Abbas A. y Lichtman A. 2004).


Nombre	Tipos	Descripción	Complejos de anticuerpos
IgA	2	Se encuentra en las mucosas, como el tubo digestivo, el tracto respiratorio y el tracto urogenital. Impide su colonización por patógenos. También se encuentran en la saliva, las lágrimas y la leche.	 <p>Monómero IgD, IgE, IgG</p> <p>Dímero IgA</p> <p>Pentámero IgM</p>
IgD	1	Su función consiste principalmente en servir de receptor de antígenos en los linfocitos B que no han sido expuestos a los antígenos. Su función está menos definida que en otros isotipos.	
IgE	1	Se une a alérgeno y desencadena la liberación de histamina de las células cebadas y basófilos y está implicada en la alergia. También protegen contra gusanos parásitos.	
IgG	4	Proporcionan, en sus cuatro formas, la mayor parte de la protección inmunitaria basada en anticuerpos contra los patógenos invasores. Es el único anticuerpo capaz de cruzar la placenta para proporcionar al feto inmunidad pasiva.	
IgM	1	Se expresa en la superficie de los linfocitos B y en forma de secreción con gran avidez por su diana. Elimina los patógenos en los estadios tempranos de la respuesta inmune mediada por linfocitos B (humoral) hasta que existen suficientes IgGs	

Tabla 1. Tipo, descripción y estructura de los anticuerpos (Regueiro G., 2003).

C.5 Características de la estructura molecular de los anticuerpos

Los primeros estudios sobre la estructura de los anticuerpos se basaron en anticuerpos purificados procedentes de sangre de sujetos inmunizados con diversos antígenos (Regueiro G., et al. 2003).

Las glucoproteínas del plasma o del suero se clasifican tradicionalmente por sus características de solubilidad en albúminas o globulinas, aunque también se pueden clasificar por su migración en un campo eléctrico, un proceso denominado electroforesis. Un nombre frecuente para los anticuerpos es inmunoglobulinas (Ig), refiriéndose a la porción de la fracción de la gammaglobulina que confiere la inmunidad.

Todas las moléculas de anticuerpo comparten el mismo patrón estructural y poseen características físico-químicas muy similares, pero muestran una variabilidad importante en las regiones que se unen a los antígenos. Cada molécula de anticuerpo está formada por cuatro cadenas polipeptídicas iguales dos a dos y unidas a puentes disulfuro. Las cadenas de uno de los pares tienen pesos moleculares que oscilan entre 55 y 77 kDa (cadenas pesadas) y las del otro par poseen un peso constante de alrededor de 25 kDa (cadenas ligeras) (Regueiro G., et al. 2003).

Tanto las cadenas ligeras como las cadenas pesadas contienen una serie de unidades homólogas que se repiten, cada una de unos 110 residuos de aminoácidos de longitud, y que se repliegan de forma independiente en una estructura globular denominada dominio Ig. Un dominio Ig contiene dos capas de láminas con plegamiento beta, compuesta cada una de ellas por tres a cinco hebras de cadenas polipeptídicas antiparalelas. Las cadenas pesadas y las ligeras constan de regiones variables aminoterminales (V) que participan en el reconocimiento antigénico y regiones constantes carboxiterminales (C); las regiones C de las cadenas pesadas son las que median las funciones efectoras. Las regiones C de las cadenas ligeras no participan en las funciones efectoras y no se fijan a las membranas celulares (Figura 1) (Abbas A. y Lichtman A. 2004).

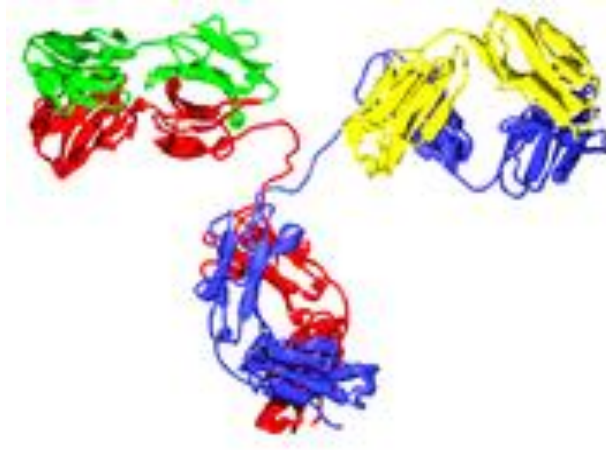


Figura 1. Las inmunoglobulinas constan de distintos dominios, que a su vez se agrupan en las dos cadenas pesadas (rojo y azul) y las dos cadenas ligeras (verde y amarillo) del anticuerpo. Los dominios de la inmunoglobulina están compuestos de entre 7 (en el caso de la IgC) y 9 (IgV) plegamientos β (<http://med.unne.edu.ar>).

D. FRACCIÓN CONSTANTE (Fc)

La fracción Fc es necesaria para interactuar con las células efectoras o activar el sistema del complemento y su estructura define los distintos isotipos de las Ig (Creus N., et al. 2002).

Los receptores de Fc son proteínas transmembranales que ayudan a la eliminación de patógenos extraños mediante su unión a los anticuerpos por su región Fc que se encuentran en la superficie de células inmunes, macrófagos, linfocitos, plaquetas y granulocitos, así como por ciertos epitelios transportadores (placenta, hígado, intestino neonatal, epitelio vaginal cervical), células de langerhans, células dendríticas, células del riñón, células accesorias (se denominan así a aquellas que cooperan con los anticuerpos en sus acciones microbicidas o proinflamatorias), células hematopoyéticas.

Los receptores Fc para IgG fueron identificados hace más de 35 años con la observación de anticuerpos IgG que pueden ser directamente afines para macrófagos, estos juegan un papel importante en la inmunidad de los vertebrados ya que proveen un puente entre las respuestas humorales y celulares del sistema inmune (Figura 2).

Los miembros de las familias de receptores Fc son específicos para las diferentes clases de Ig. En consecuencia, los FcR exhiben una variedad de funciones específicas de tipo celular que incluyen endocitosis, liberación de mediadores citotóxicos e inflamatorios, la regulación de células B y la transitoriedad de inmunoglobulinas a través de las capas epiteliales. (Stuart S., et al. 1989; Leeuwenberg J., et al. 1990; Hussain L. et al. 1992; Ravetch J., et al. 2001; García A. 2009; Xi J., et al. 2010).

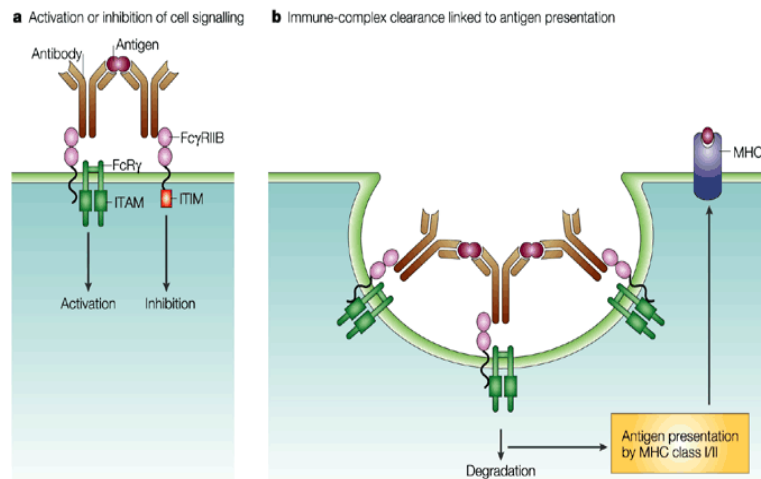


Figura 2. Funciones principales de los receptores. a) Regulación positiva y negativa de la señalización celular. Los Receptores Fc (FcRs) son expresados por diferentes células del sistema inmunológico y tienen un papel central en controlar inmunorrespuestas después de la interacción con los complejos antígeno- anticuerpo. La cascada de activación a través de la cadena- γ común de FcR (VCR) - asociando FcRs da lugar a la activación celular, que lleva a la fagocitosis, citotoxicidad celular con dependencia de los anticuerpos, generación del superóxido y la producción de citocinas y de mediadores pro-inflamatorios. Por el contrario, Fc γ RIIB contiene un inmunoreceptor de tirosina con un motivo inhibitorio (ITIM), y media la inhibición del inmunoreceptor de tirosina del motivo de activación (ITAM) que induce la cascada de activación. b) Separación de complejos inmunes, y de MHC de clase-I y clase-II y la presentación de antígeno. Después de fagocitosis o endocitosis por un proceso mediado por FcR, los complejos inmunes intracelulares ,son analizados eficientemente por la presentación de antígeno de clase-I y una manera restricta clase-II (Takai T., 2002).

En el hombre se han descrito tres clases de Fc γ R basándose en criterios como: tamaño molecular, afinidad y especificidad para los ligandos, distribución del tejido, y reactividad con el anticuerpo específico Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII (Figura 3) (Schroeder H. y Cavacini L. 2010).

Fc γ Receptors: 2010

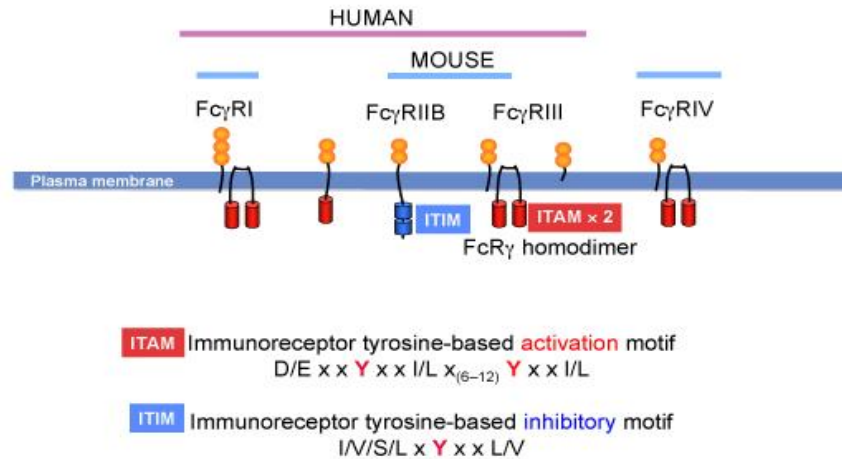


Figura 3. Estructura de FcR (Schroeder H. y Cavacini L. 2010)

Fc γ RI se encuentra expresado en leucocitos, monocitos y macrófagos y es un receptor de alta afinidad. Los neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, expresan Fc γ RII (es esencial para accionar fagocitosis y la generación del superóxido) y Fc γ RIII (se cree que este receptor está involucrado principalmente en la unión de complejos inmunes), además Fc γ RII es también expresado en monocitos, células B y plaquetas. (Leeuwenberg J., et al. 1990; Hussain L., et al. 1992; Parren P., et al. 1992).

E. USO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES COMO TERAPIA

Hace aproximadamente un siglo, Erlich estudió el sistema inmunológico y postuló la potencial actividad de los anticuerpos frente al cáncer, denominándolos “*magic bullets*” (balas mágicas). En 1975, Köhler y Milstein desarrollaron la técnica de los hibridomas, que permitió obtener anticuerpos monoclonales (AcMs) contra un antígeno específico, además de permitir tener grandes cantidades del anticuerpo, por lo cual se les concedió el Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1984 (Creus N. et al. 2002).

Por todas las propiedades que poseen los anticuerpos, han sido empleados en terapia desde que en 1986, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) aprobó el primer anticuerpo monoclonal para el tratamiento del rechazo del trasplante de riñón. Las posibilidades terapéuticas de los anticuerpos monoclonales son enormes y son el tratamiento ideal para suprimir a las células infecciosas involucradas sin causar

daño general al sistema inmune, ofreciendo nuevas oportunidades para el tratamiento de enfermedades de creciente incidencia en la población como son el cáncer, las enfermedades autoinmunes, las inflamatorias, infecciosas y degenerativas. Los anticuerpos realizan una doble función dentro de la respuesta inmune del organismo cuando lo invade un agente externo. Por un lado, se unen específicamente a una amplia variedad de antígenos y, por otro lado, se unen a un número limitado de moléculas y células efectoras del sistema inmune (Creus N., et al. 2002; Machado N., 2006; Almaguer D., 2010).

Con base en estudios en modelos animales, los AcMs pueden ser un vehículo para llevar la terapia inmuno-conjugada a la clínica, mediante la conjugación de anticuerpos monoclonales contra las drogas, toxinas y radioisótopos usando la especificidad de estos para tener una mayor capacidad de matar directamente a las células tumorales.

Existen algunos anticuerpos monoclonales que han sido aprobados para su uso comercial, como es el caso del rituximab, anticuerpo monoclonal (AcM) específico para los receptores de superficie CD20 de los linfocitos B humanos que producen la lisis de células tumorales en presencia del complemento humano. Esta indicado en el tratamiento de no Hodgkin.

Un segundo AcM que ha demostrado ser muy eficaz es trastuzumab, utilizado como monoterapia, indicado en el tratamiento de pacientes con cáncer de seno metastático, en quienes el tumor expresa sobre-expresa la proteína HER2.

Gemtuzumab y Alemtuzumab, son AcMs humanizados que reconoce el antígeno CD52, glicoproteína localizada en la membrana de superficie de los linfocitos B en casi todos los casos de leucemia linfocítica crónica que causan lisis de estos y la detención del crecimiento patológico de estas células.

Cetuximab: Anticuerpo indicado en combinación con irinotecan, para el tratamiento de pacientes con carcinoma colorrectal metastático que expresen EGFR (Ruiz G., et al. 2007; Oldham R., 2008; Almaguer D., 2010) (Tabla 2).

Anticuerpo	Diana	Uso aprobado	Uso experimental
Rituximab	CD20	Linfoma no hodgkiniano B de alto y bajo grado.	Linfoma del manto, leucemia linfática crónica, Waldenström, PTI, mieloma múltiple, etc.
Ibritumomab	CD20	Linfoma no hodgkiniano B de bajo grado refractario.	Linfoma no hodgkiniano de alto grado, linfoma no hodgkiniano de bajo grado en primera línea.
Tositumomab	CD20	Linfoma no hodgkiniano folicular refractario o en recaída línea.	Linfoma no hodgkiniano B de bajo grado en primera.
Cetuximab	EGFR	Cáncer colorrectal	Cáncer de cabeza y cuello, páncreas, pulmón
Bevaxizumab	VEGF	Cáncer colorrectal	Carcinoma renal, cáncer de pulmón, mama
Edrecolomab	GP17-1A		Cáncer colorrectal, mama, pulmón, próstata
Oregovomab	CA125		Cáncer de ovario

Tabla 2. Anticuerpos monoclonales antitumorales. EGFR: receptor de factor de crecimiento epidérmico; VEGF: factor de crecimiento vasculoendotelial.

F. COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC)

El sistema inmune está diseñado para detectar y destruir en forma muy eficiente a diferentes microorganismos. Sin embargo, los microorganismos (y en particular, los patógenos) poseen ciclos de vida a veces complejos y se alojan en compartimientos extracelulares o intracelulares diferentes, según del microorganismo que se trate (Abbas A. y Lichtman A. 2004).

A lo largo de la evolución, el sistema inmune desarrolló mecanismos de detección de fragmentos derivados de los microorganismos. Estos fragmentos son, en su mayoría, péptidos derivados de la degradación de diferentes proteínas, los que son generados en compartimientos intracelulares específicos, capturados por moléculas especializadas y presentados al sistema inmune.

La presentación de péptidos microbianos dispara la activación de la respuesta inmune adaptativa y el desarrollo de funciones efectoras que finalmente permitirán la eliminación de los microorganismos y la generación de la memoria inmunitaria.

En el proceso de presentación de péptidos por moléculas especializadas participan un conjunto importante de proteínas celulares de membrana y citoplasmáticas. Entre las proteínas de membrana se destaca un conjunto de glucoproteínas que está codificado por un grupo de genes denominado complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Abbas A. y Lichtman A. 2004).

Originalmente el MHC se describió por el papel que tienen estas moléculas como blanco del ataque inmunitario durante el rechazo de un trasplante. En estos modelos experimentales se observó que el rechazo se debía al montaje de una fuerte respuesta inmune contra algunos antígenos expresados por el injerto. El siguiente hallazgo importante fue cuando se demostró que este rechazo se debía a diferencias en una región del genoma que recibió en ese entonces el nombre de “complejo mayor de histocompatibilidad”. Pronto se descubrió que esta región contiene en realidad varios genes (por lo que se dice que el MHC es poligénico) que codifican diferentes proteínas caracterizadas por su elevado polimorfismo (es decir, la secuencia de estos genes (y por ende la secuencia de las proteínas codificadas) difiere entre los individuos de una misma especie, por lo tanto el MHC es polimórfico) (Geffner J. y Fainboim L. 2005).

Existen tres clases de genes del MHC: los genes de clase I, los genes de clase II y los genes de clase III. Sin embargo solo los productos de los genes de las clases I y II están involucrados en los eventos del procesamiento y presentación de antígenos, con diferentes conjuntos antigénicos proteicos, antígenos citosólicos (intracelulares) y antígenos extracelulares que han sido endocitados, respectivamente. Las moléculas de clase I presentan péptidos a los linfocitos T citotóxicos CD8+ y las de clase II a los linfocitos T cooperadores CD4+ (Figura 4) (Abbas A. y Lichtman A. 2004; Geffner J. y Fainboim L. 2005).

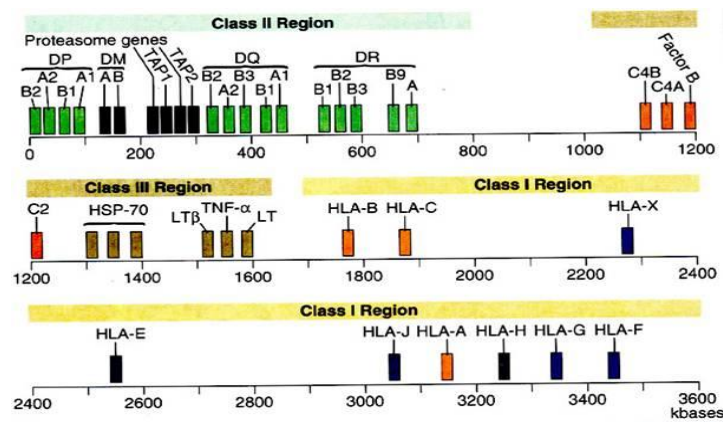


Figura 4. Esquema del MHC (Abbas A., y Lichtman A., 2004).

F.1 Moléculas de clase I del MHC

F.1.1 Características de las moléculas de clase I

Las moléculas clásicas de clase I son glucoproteínas de membrana constituidas por dos cadenas polipeptídicas que se asocian en forma no covalente. De estas, la cadena α está codificada dentro del MHC, posee aproximadamente 340 aminoácidos y pesa de 42-44 kDa. Esta cadena α , que se asocia no covalentemente con una cadena no polimórfica de 99 aminoácidos y 12 kDa llamada β 2-microglobulina, está glucosilada y atraviesa la membrana plasmática como una proteína integral de membrana. Está constituida por tres dominios proteicos globulares de 90 aminoácidos cada uno, denominados α 1 (el más externo y contiene el extremo N-terminal), α 2 (que se genera junto con α 1 el sitio de unión de péptido), α 3 (el más cercano a la membrana y que posee los residuos aminoácidos que permiten que las moléculas de clase I sean reconocidas

por el correceptor CD8 linfocitos T citotóxicos). Estos tres dominios están expuestos hacia el exterior de la célula (Abbas A. y Lichtman A. 2004; Geffner J. y Fainboim L. 2005).

La cadena α un segmento rico en aminoácidos hidrófobos que atraviesa la membrana plasmática y que le permite permanecer anclado a ella en su superficie celular. Este segmento se denomina “dominio de transmembrana” o TM y tiene de 38 a 40 aminoácidos de longitud, por último, la cadena α posee un extremo C-terminal en el interior de la célula que consiste en un tramo hidrófilo de 25 a 28 aminoácidos en el citoplasma celular (Abbas A. et al. 2002).

Los dominios $\alpha 2$ y $\alpha 3$ y la $\beta 2$ -microglobulina, pero no así el dominio $\alpha 1$, poseen un puente disulfuro intracatenario cada uno, que se establece entre residuos de cisteínas separadas entre sí por unos 60 aminoácidos. Esta estructura tan particular es crítica para mantener el plegado tridimensional correcto de la cadena α y de la $\beta 2$ -microglobulina. La estructura cristalina de complejos MHC-TCR reveló que el TCR se acomoda en diagonal sobre la molécula de clase I. Lo importante de esta estructura es que se demuestra en forma contundente que el TCR establece íntimo contacto tanto con el péptido como con la molécula de clase I del MHC (Figura 5) (Abbas A., et al. 2002., Geffner J. y Fainboim L. 2005).

La biosíntesis y el ensamblado de las moléculas de clase I del MHC ocurre en el retículo endoplasmático rugoso (RER). El plegamiento correcto de la molécula de clase I no sólo requiere la cadena liviana $\beta 2$ -microglobulina, si no la unión de un péptido en el surco respectivo (Geffner J., Fainboim L. 2005).

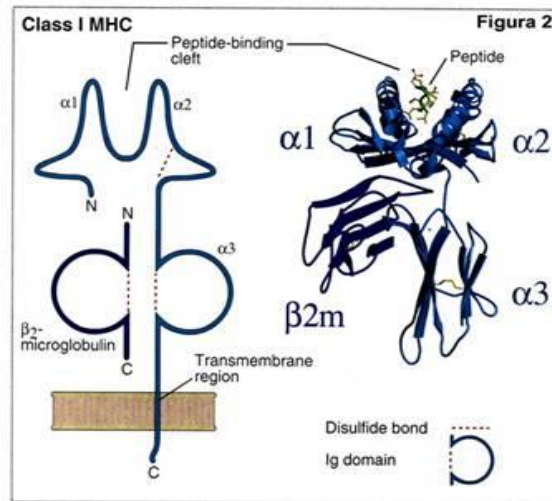


Figura 5. Estructura tridimensional de las moléculas de clase I. En el esquema se muestran diferentes regiones de la molécula del MHC. Las moléculas de clase I están compuestas de una cadena alfa polimorfa unida de forma no covalente a la β_2 -microglobulina no polimorfa (Geffner J. y Fainboim L. 2005).

F.1.2 Productos de los genes de clase I del MHC

En el hombre existen tres genes de clase I que codifican sendas moléculas de clase I clásicas. Estos genes se denominan HLA-A, HLA-B y HLA-C (Human Leucocyte Antigens), las tres moléculas de clase I codificadas cumplen la función de presentación de péptidos a los linfocitos T CD8. Además, las tres se expresan simultáneamente y en forma codominante en la superficie de todas las células nucleadas del organismo, con excepción de los glóbulos rojos, el sincitiotrofoblástico y las neuronas.

Aunque las cadenas α de cada una de estas moléculas es diferente, las tres comparten la misma cadena β_2 -microglobulina (Geffner J. y Fainboim L. 2005).

F.1.3 Familia de Genes MIC

Esta familia se compone de dos genes funcionales (MIC-A y MIC-B) y cuatro pseudogenes (MICC, MICD, MIE, y MICF). Al igual que los de clase I clásicos, MIC-A y MIC-B son polimórficos, están formados por tres dominios extracelulares (α_1 , α_2 y α_3), un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático, pero se diferencian de las moléculas de clase I del MHC en que no se asocian con β_2 -micro-globulina para su expresión fisiológica en la superficie celular (Li P., et al. 1999).

Tampoco funcionan como moléculas presentadoras de péptidos debido a que tienen el surco respectivo muy cerrado como para alojar un ligando de cualquier naturaleza.

G. PROTEÍNA MIC-A

Los genes MIC-A y MIC-B son muy similares en estructura, si los comparamos con las moléculas del MHC de clase I sólo comparten una similitud en dominios alfa 1 ($\alpha 1$), alfa 2 ($\alpha 2$) y alfa 3 ($\alpha 3$). Sus proteínas se pliegan de manera semejante a las moléculas MHC de clase I, tiene un patrón de expresión restringido a células de linaje epitelial, epitelio gastrointestinal, fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales, pero no en células de linaje linfohematopoyético. MIC-A también se expresa en el epitelio de la cortical del timo. Al encontrarse tanto MIC-A y MIC-B en la cortical del timo, es posible que jueguen un papel en la selección del repertorio de células. Sin embargo, su expresión aumenta o se induce por estímulo de estrés, infección con microorganismos intracelulares (virus y bacterias) o por neo-transformación. El estrés oxidativo induce daño celular alterando las proteínas, los lípidos y el DNA e induce apoptosis directamente sobre las células diana. MIC-A y MIC-B son ligandos de un receptor activador de citotoxicidad de células NK denominado NKG2D. Esta molécula se expresa en todas las células NK, en linfocitos T CD8 y en linfocitos T $\gamma\delta$ (Bahram S., et al. 1994. Bahram S. y Spies T. 1996., Martínez C. y Mendoza J.).

El reconocimiento de MIC-A o MIC-B por células que expresan NKG2D inducen la citotoxicidad de las células que expresan MIC y la secreción de INF- γ , por lo tanto, MIC-A y MIC-B actúan como “detectores de estrés” y su expresión aumentada constituye una señal de alarma para el sistema inmune, que pone en marcha mecanismos de destrucción de las células que han sufrido estímulos de estrés (es decir, que han aumentado la expresión de MIC-A y MIC-B en la superficie por parte de células citotóxicas NK o linfocitos T). Por otra parte, se ha demostrado que MIC-A es un blanco de los anticuerpos presentes en los pacientes trasplantados y que sufren un rechazo del injerto. Esto sugiere que como ocurre con las moléculas de clase I clásicas y de clase II del MHC, MIC-A podría ser una molécula diana durante el curso de una reacción de rechazo (Geffner J. y Fainboim L. 2005; Martínez C., Mendoza J).

Los genes de MIC-A son un grupo de genes que han sido descritos recientemente y que se encuentran codificados en el cromosoma 6. MIC-A codifica para una molécula no clásica, la cual, al igual que las moléculas de clase I clásicas, se expresan en la superficie celular. Las moléculas MIC-A y MIC-B son expresadas en la superficie celular mientras MICC, MICD y MICE son pseudogenes (Hudges A., Yeager, M., 1999; Bahram S. 2000).

Esta molécula también puede ser expresada en células TAP negativas, sugiriendo que su expresión es independiente de la unión a péptidos. Presentan además, la pérdida del sitio de unión al receptor CD8 y no tienen función como presentadoras de antígenos (Bahram S. 2000).

Se ha demostrado que tras la incubación de la línea celular de colón CaCo-2 con H₂O₂ durante dos días, la expresión génica de MIC-A y MIC-B se veía incrementada. A diferencia de las moléculas del MHC, MIC-A no es modulada por citocinas como el INF- γ (Yahamoto K, et al. 2001)

MIC-A y MIC-B son expresados también en tumores y en líneas celulares de origen epitelial, como carcinomas de pulmón, mama, riñón, ovario, próstata, y colón, así como en lesiones de melanoma cutáneo, MIC-A es raramente expresada en leucemias de células T, LMA y en líneas de linfoma B. (Seliger B., et al. 2003).

El polimorfismo de MIC-A no parece estar asociado con la neoplasia intraepitelial cervical inducida por el papiloma virus y ni con el cáncer de piel excepto con melanoma. Parece que la frecuencia y el nivel de expresión de MIC no está asociado con el grado de invasión y potenciales metástasis tumorales (Seliger B., et al. 2003).

H. CITOCINAS

Las citocinas son proteínas con peso molecular de 5 hasta 70 000 Da secretadas por células de la inmunidad innata y adaptativa (principalmente las producen los linfocitos T CD4⁺) que actúan como transmisores o mediadores de la comunicación intracelular en múltiples procesos fisiológicos, principalmente los relacionados con el crecimiento y la diferenciación celular, son moléculas moduladoras e inductoras que utilizan las células del sistema inmune para comunicarse entre sí y con las de los otros sistemas. Las citocinas son mensajeros que pueden utilizar las células de los tres sistemas (nervioso, endocrino e inmune) para ayudar a reparar lesiones y conservar la

salud. Las citocinas se sintetizan en respuesta a microorganismos y otros antígenos, de modo que diferentes citocinas estimulan distintas respuestas de células que participan en la inmunidad y la inflamación. En la fase de activación de la respuesta inmunitaria, las citocinas estimulan el crecimiento y la diferenciación de los linfocitos, y en la fase efectora de la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa activan diferentes células efectoras para que eliminen microorganismos y otros antígenos. También estimulan el desarrollo de células hematopoyéticas.

Sin embargo, en otros casos esas mismas moléculas pueden provocar reacciones perjudiciales de hipersensibilidad en los tejidos, en la piel, en el aparato respiratorio y en el sistema nervioso. (Soto I., et al. 1999; Reyes M. y García F. 2005; Abbas A., et al 2002; Abbas A. y Lichtman A. 2004).

Las citocinas no suelen almacenarse en forma de moléculas preformadas y su síntesis se inicia por la transcripción de nuevos genes debida a una activación celular. Esta activación transcripcional es transitoria y el ARN mensajero que codifica la mayoría de las citocinas es inestable, de forma que la síntesis de las citocinas también es transitoria (Abbas A. y Lichtman A. 2004).

Las citocinas actúan de manera autócrina al modular la actividad celular, o de manera parácrina al inducir la producción de otras citocinas mediante otras estirpes celulares. Las citocinas se secretan en respuesta a una amplia variedad de estímulos como: estrés celular, lesiones inducidas por carcinógenos, infecciones o inflamación. En este contexto, las citocinas estimulan la respuesta del huésped al controlar el estrés y la homeostasis celular (Bermúdez V., et al. 2005).

La nomenclatura de las citocinas se basa a menudo en sus orígenes celulares. Las citocinas producidas por los fagocitos mononucleares se denominan monocinas y las sintetizadas por los linfocitos, linfocinas. Debido a que muchas citocinas son sintetizadas por leucocitos (macrófagos o linfocitos T) y actúan sobre otros leucocitos también se denominan interleucinas. Este término es imperfecto porque muchas citocinas que solo sintetizan los leucocitos y que solo actúan sobre los leucocitos no se llaman interleucinas, mientras que muchas otras citocinas denominadas interleucinas se sintetizan o actúan en células diferentes a los leucocitos (tabla 3) (Abbas A. y Lichtman A. 2004).

Citocina	Acción	Lugar de síntesis	Inductor	Acciones más importantes
IL-1	Proinflamatoria	Células mononucleares	Microbiana o activación cascada inflamatoria (CI)	Pirógeno
IL-2	Antiinflamatoria	linfocitos Th colaboradores	Sustancias microbianas o activación de CI	Factores de crecimiento de células T induciendo a la proliferación de todos los tipos de subpoblaciones linfocitarias. Estimula síntesis de interferón liberación de IL-1 TNF- α y beta
IL-3				
IL-4	Antiinflamatorio	Linfocitos Th, mastocitos y basófilos	Desconocido	Bloquea síntesis de citocinas inhibe la síntesis de NO
IL-6	Proinflamatoria- antiinflamatoria	Monocitos, macrófagos, célula endotelial y fibroblastos	IL-1 y endotoxinas	Pirógeno, síntesis de inmunoglobulinas. Activación de la síntesis de de proteínas de fase aguda
IL-8	Proinflamatoria	Monocitos, macrófagos, célula endoteliales y fibroblastos	IL-1, TNF- α y endotoxinas	Factor quimiotáctico y activador de neutrófilos

Tabla 3. Clasificación de citocinas.

I. INTERLEUCINA 2

Las interleucinas son un extenso grupo de citocinas (desde IL-1 a IL-17) que son producidas principalmente por los linfocitos T cooperadores, aunque los monocitos mononucleares y algunas células tisulares también producen algunas de ellas. Posee la

acción de activar a los linfocitos B, macrófagos y células NK. Además ejerce una función sobre los propios linfocitos T, en cuanto a su proliferación, secreción de otras linfocinas, aumento de la expresión de receptores de membrana para otros factores e inducción de la expresión de moléculas de clase II del HLA (Serra- Baldrich E. 1985; Roitt I., et al. 2000).

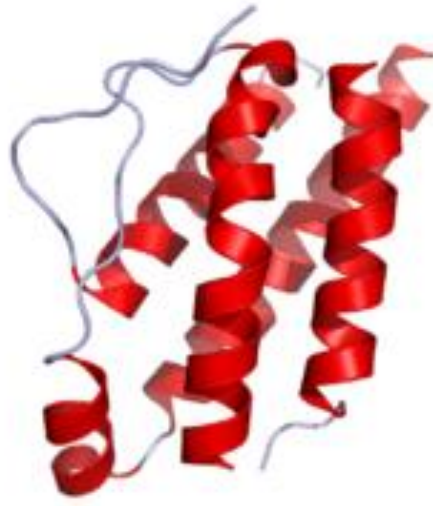


Figura 7. Estructura tridimensional de la citocina IL-2

Su efecto antitumoral es mediado por promover la activación de las células NK, células asesinas activadas por linfocinas (LAK) y otras células citotóxicas, así como la inducción de IFN-g, TNF-a.

IL-2 es un factor de crecimiento para los linfocitos T estimulados por antígenos y es responsable de la expansión clonal de los linfocitos T tras el reconocimiento del antigénico. Por esta razón, a IL-2 se le denominó originalmente factor de crecimiento de los linfocitos T. IL-2 actúa principalmente sobre las células que la sintetizan (es decir, actúa como un factor de crecimiento autócrino) (Roitt I., et al. 2000).

IL-2 se produce en linfocitos CD4⁺ y, en menor grado en los CD8⁺. La activación de los linfocitos T por los antígenos y coestimuladores estimula la transcripción.

Se sabe que las células tumorales no linfoides humanas son capaces de producir citocinas, existe la posibilidad de una estimulación autócrina del crecimiento celular del tumor, lo cual conduce a mantener en el microambiente tumoral las condiciones adecuadas para continuar con esta proliferación. El efecto de IL-2 en células

transformadas o células no linfoides incluye cambios en la sensibilidad de las células tumorales a otras citocinas (Valle A. 2001).

El uso de IL-2 en terapia génica contra cáncer se ha empleado ampliamente en diversos modelos tumorales preclínicos, incluyendo el carcinoma hepatocelular, carcinoma de cabeza y cuello, sarcomas, plasmocitoma, carcinoma de mama, linfomas, y en cáncer cervical. Particularmente, el efecto adyuvante de la IL-2 en cáncer cervical se ha probado en modelos tumorales asociados al VPH. Se ha demostrado que el tratamiento con la proteína recombinante y con el gen de IL-2, administrados por vía intratumoral, reduce significativamente el avance de los tumores asociados al VPH e inhibe la formación de tumores recurrentes después de ser eliminados por cirugía (Bermúdez V. et al. 2005).

También ha sido utilizada independientemente o en combinación en la inmunoterapia adoptiva tanto en animales como en humanos para inducir regresión de tumores en estadios avanzados; mostrando una modesta respuesta antitumoral, no obstante su aplicación vía sistemática altera vías de regulación hematopoyéticas importantes y puede provocar serios efectos secundarios (fiebre, dolor de cabeza, síndrome de goteo capilar) (Ayala A. 2005).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer de cérvix representa un grave problema de salud pública, es una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en México y en Latinoamérica. Uno de los principales factores de riesgo que se le asocian es el virus del papiloma humano (VPH: 16, 18, 31, 33 y 45). Existen algunas instituciones que se dedican a estudiar las causas y factores que causan esta enfermedad, así como las posibles curas que permitan disminuir su frecuencia o eliminarlo (Alonso P., et al. 2000; Tirado G., et al. 2005).

A lo largo de las dos últimas décadas se han administrado tratamientos con diversas proteínas y citocinas que tienen como objetivo aumentar la respuesta inmune de pacientes oncológicos, entre ellas podemos mencionar a los interferones e interleucinas. Un ejemplo de estas últimas es IL-2 que es una citocina que participa en la proliferación y crecimiento autócrino para las células T y NK. Se sabe que IL-2 promueve la progresión de linfocitos T, induce la expresión de su receptor (IL-2R), estimula la actividad citotóxica y producción de algunas citocinas, aumenta la actividad de las células NK e incrementa la producción de monocitos. También, se ha demostrado que el efecto de IL-2 no está limitado a poblaciones de células inmunes, ya que se ha descubierto que media la proliferación y la expresión de Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β) (Ciacci C., et al. 1993; Dignass A. y Podolsky K. 1996; Valle A. 2001; Del Rio I. 2007).

Otras de las proteínas aunque poco estudiadas son las llamadas MIC, estas proteínas se expresan cuando las células han sido transformadas por algún agente infeccioso viral al medio externo y que participan en el desarrollo oncológico, por lo tanto tienen una asociación con ciertas enfermedades como es en el caso del CaCu. Entre las principales células que reconocen a la célula tumoral para eliminarlas, se encuentran las células NK, las cuales reconocen la baja o nula expresión de moléculas MHC I sobre la célula tumoral, así como proteínas relacionadas con estrés, como la expresión de MIC-A y MIC-B, que son ligandos del receptor NKG2D expresado por las células NK (Bermúdez V., et al. 2005).

Esta es una de las causas por la cual en los últimos 20 años sea tenido un gran avance en el conocimiento de los mecanismos moleculares y de la fisiopatología del cáncer, habiéndose descrito múltiples estrategias para el desarrollo de nuevos fármacos

anticancerígenos, con el objetivo de conseguir mayor actividad antitumoral y menor toxicidad que la de los fármacos que se usan actualmente. La incesante identificación de onco-proteínas y de nuevos antígenos asociados a tumores, que permiten distinguir las células normales de las células cancerígenas, proporciona un amplio abanico de moléculas diana ideales para la obtención de nuevos anticuerpos monoclonales (Creus N., et al. 2002).

JUSTIFICACIÓN

Se sabe que algunas proteínas como los anticuerpos pueden regular la proliferación celular. Desde comienzos del siglo pasado, con los trabajos de Emil von Behring, la inmunología ha intentado contribuir a controlar procesos agudos derivados de infecciones bacterianas, como fue el caso de sueros inmunes conteniendo anticuerpos policlonales contra la toxina tetánica y diftérica (Aguillón J., et al. 2003).

El uso de anticuerpos específicos contra antígenos tumorales parece ser una alternativa para eliminar masas tumorales. Tal es el caso del anticuerpo contra HER-2 que elimina eficientemente el cáncer de mama, de pulmón o adenocarcinomas ováricos y gástricos.

El bevacizumab, es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une a la VEGF que se expresa en el endotelio, su presencia se ve incrementada por estímulos como la hipoxia, oncogenes y citocinas. Inhibe el crecimiento de tumores como el cáncer colorrectal, de pulmón y carcinoma renal (Feijóo J., et al. 2004).

Por esta razón, en el presente trabajo se estudió el efecto de diferentes concentraciones de anti-MIC-A y anti-IL-2 sobre la proliferación de líneas celulares de CaCu, CALO e INBL y se determinó si la concentración de anticuerpos modifica la respuesta proliferativa de células tumorales.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la cinética de proliferación de dos líneas celulares de carcinoma de cérvix, CALO e INBL, en presencia de diferentes concentraciones de anti-MIC-A y anti-IL-2.

OBJETIVOS PARTICULARES

Obtener cultivos de las líneas celulares CALO e INBL

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de anticuerpos anti-MIC-A sobre la proliferación a 1, 3 y 5 días de células de las líneas CALO e INBL.

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de anticuerpos anti-IL-2 sobre la proliferación a 1, 3 y 5 días de células de las líneas CALO e INBL

Evaluar la proliferación celular de las líneas CALO e INBL a los días 1, 3 y 5 por la técnica de cristal violeta.

HIPÓTESIS

Se sabe, que las líneas celulares de cáncer de cérvix CALO e INBL secretan pequeñas cantidades de IL-2 y MIC-A. Además se conoce que 10UI/ml de IL-2 producen un aumento en la proliferación de estas líneas celulares, así mismo, se sabe que la adición de anticuerpos, contra esta proteína, inhibe su efecto. Por lo que al usar diferentes concentraciones de anti-MIC-A y anti-IL-2 observaremos cambios en la proliferación de las células de CaCu.

METODOLOGÍA

Material Biológico

Cultivo Celular

Células de carcinoma de cérvix CALO (estadio IIIB) e INBL (estadio IVB), provenientes del banco de criopreservación del Laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer de la FES Zaragoza. Las células CALO e INBL se cultivaron en medio RPMI suplementado con 10% suero fetal bovino previamente desactivado, los cultivos se mantuvieron en la incubadora (Scientific, División of Mallincrodt, Inc. U.S.A.) en un ambiente al 5% de CO₂, 37°C de temperatura y humedad saturada.

Disolución de anticuerpos

Los anticuerpos se prepararon a diferentes concentraciones, para anti-MIC-A 1000, 500, 250, 25, 2.5, 0.25 y 0.025 ng/ml. Para anti-IL-2 a 2.5, 0.25 y 0.025 ng/ml, estas diluciones fueron suplementadas con RPMI al 10% de suero fetal bovino.

Como control negativo se utilizaron células cultivadas en ausencia de anticuerpos y como control de los anticuerpos se utilizó un anti-IgG₁ de ratón a 1000, 500, 250, 25, 2.5, 0.25 y 0.025 ng/ml. Los cultivos se realizaron a diferentes tiempos un día, tres días y cinco días.

Ensayo de proliferación celular

Las dos líneas celulares CALO e INBL que se ocuparon para este trabajo fueron resemebradas utilizando verseno para despegarlas de las botellas de 25 cm³ que las contenían principalmente. Posteriormente se colocaron un aproximado de 1000 células/150 µl de disolución por pozo, estos fueron sembrados por triplicado en cajas de 96 pozos. Cada disolución de los anticuerpos llevo un control negativo, que consistió en células con RPMI al 10% de suero fetal bovino. Los ensayos se realizaron por día (día 1, día 3 y día 5)

Evaluación de la proliferación celular

Después de que las células fueron sembradas en las cajas de 96 pozos, se dejaron dentro de la incubadora por el tiempo establecido, fijando el tratamiento correspondiente con glutaraldehído al 1.1% y dejándolo actuar dentro de la incubadora por 20 min, prosiguiendo con un lavado de PBS para eliminar las células que no se adhirieron en el fondo del pozo y el exceso de glutaraldehído, se dejó secar a temperatura ambiente.

Después se procedió a realizar la tinción de la placa con cristal violeta al 0.1% agitando la placa por 10 minutos para que el cristal violeta se incorporara en las partes ácidas del ADN, la cantidad de colorante absorbido por cada núcleo es proporcional al número celular, posteriormente se lavó el exceso con agua corriente. Finalmente el colorante unido a las células se sacó con ácido acético al 10% agitando la placa durante 20 min para una mejor homogenización para después realizar la lectura a 570 nm de absorbancia en el lector de Elisa (Biotek, Instruments, Inc.USA).

Análisis Estadístico

Para saber si la proliferación celular era estadísticamente significativa se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para comparar el control con cada una de las concentraciones utilizadas en los ensayos.

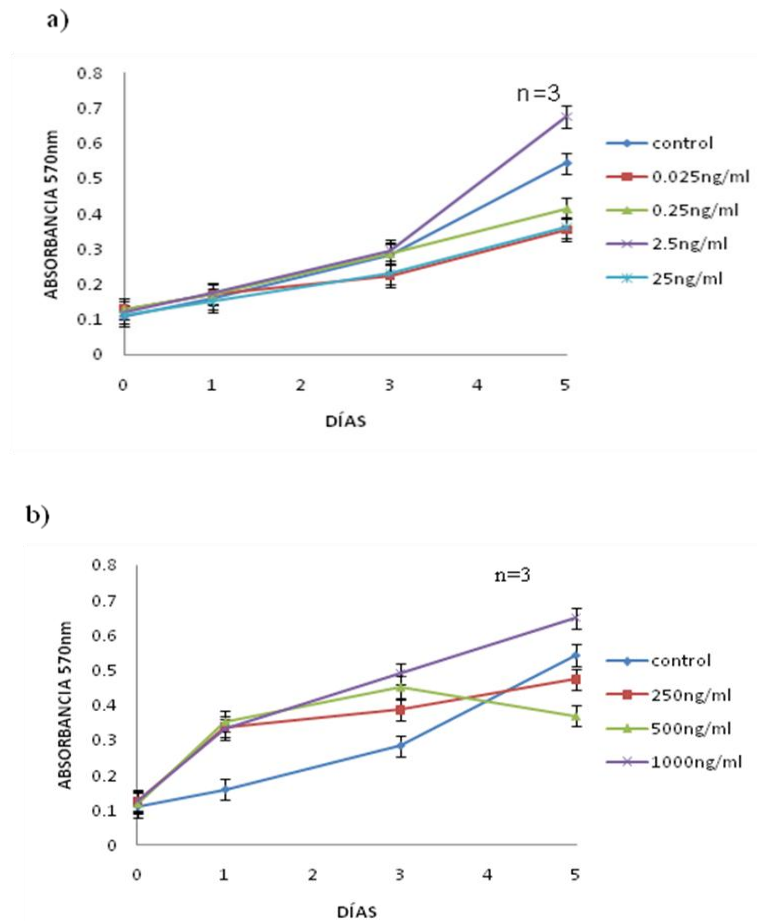
RESULTADOS

Con el fin de conocer el efecto de anticuerpos monoclonales (anti-MIC-A y anti-IL-2) sobre la proliferación celular de células de CaCu, se cultivaron las líneas celulares CALO e INBL para determinar la cinética de proliferación, en presencia de los anticuerpos mencionados. Los cultivos se realizaron a diferentes tiempos, una vez transcurrido ese tiempo las células se fijaron con glutaraldehído al 1.1% y posteriormente se evaluó la proliferación con la técnica de cristal violeta.

Efecto del anticuerpo anti-MIC-A en la proliferación de la línea celular CALO

Para la línea celular CALO cultivada en presencia de anti-MIC-A se observa que la proliferación celular en las concentraciones 0.025, 0.25 y 25 ng/ml se inhibe desde el 3^{er} día de cultivo, teniendo una diferencia significativa con respecto al control. La concentración 2.5 ng/ml es la única que hace que la proliferación aumente pero solo pasa esto hasta el 5^{to} día de cultivo ($p=0.05$) (Gráfica 1a). En las concentraciones 250, 500 y 1000 ng/ml se observa que la proliferación celular aumenta significativamente, pero disminuye en el 5to día en las concentraciones 250 y 500 ng/ml (Gráfica 1b). El análisis estadístico de los datos indica que existe diferencia significativa en la inducción de la proliferación entre las células control y las células cultivadas en presencia del anticuerpo ($p= 0.05$).

CINÉTICA DE PROLIFERACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR CALO EN PRESENCIA DE ANTI-MIC-A



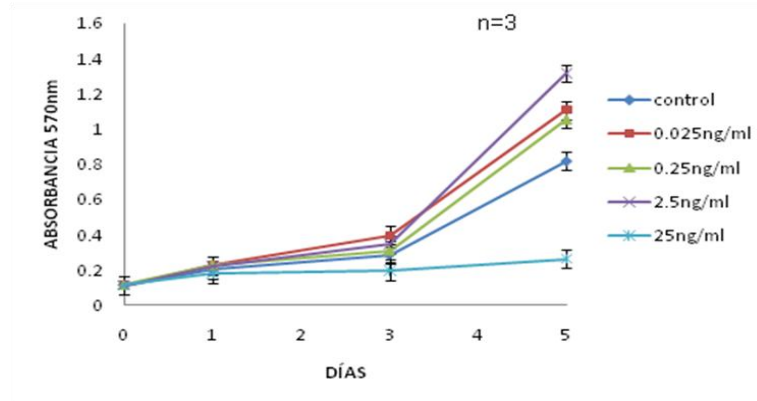
Gráfica 1. **Cinética de proliferación para CALO con anti-MIC-A.** Se colocaron por triplicado 1×10^3 células CALO por pozo, en placas de 96 pozos en presencia del anticuerpo anti-MIC-A, fijado con glutaraldehído y teñido con cristal violeta para evaluar la proliferación celular. 1a) Se observa una mayor inducción a la proliferación al utilizar la concentración 2.5 ng/ml. Diferencia significativa con respecto al control en la concentración 2.5 ng/ml ($p=0.05$). 1b) Se observa que hay un aumento en la proliferación celular la cual se mantiene estable a la concentración 1000 ng/ml ($p=0.05$).

Efecto del anticuerpo anti-MIC-A en la proliferación de la línea celular INBL

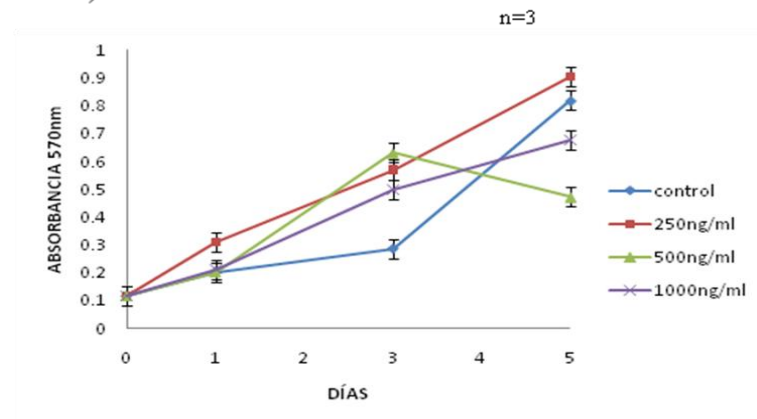
Cuando cultivamos la línea celular INBL en presencia de anti-MIC-A, se observó que la proliferación celular aumentó significativamente hasta el quinto día de cultivo en las concentraciones 0.025, 0.25 y 2.5 ng/ml, mientras que la concentración 25 ng/ml inhibe la proliferación (Gráfica 2a). En la concentración 250 ng/ml la proliferación aumenta de manera exponencial, mientras que en la concentración de 1000 ng/ml la proliferación celular aumenta desde el primer día de cultivo, mientras que a 500 ng/ml disminuye (Gráfica 2b). Se tiene una diferencia significativa ($p=0.05$) con respecto al control en las concentraciones 0.025, 0.25, 2.5, 25 y 250 ng/ml.

CINÉTICA DE PROLIFERACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR INBL EN PRESENCIA DE ANTI-MIC-A

a)



b)

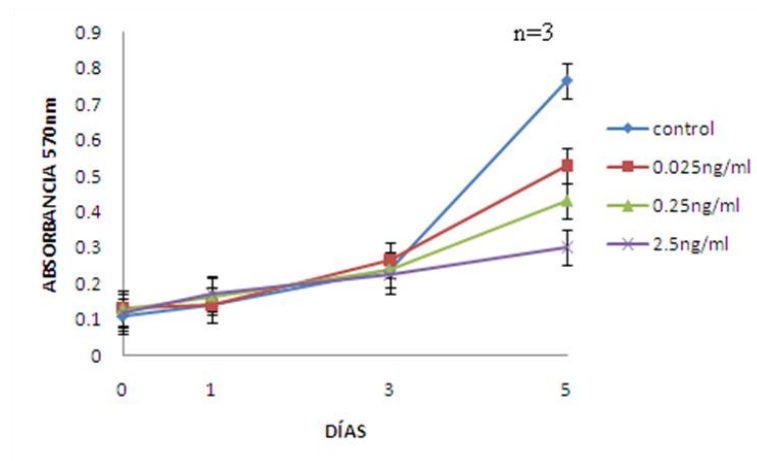


Gráfica 2. **Cinética de proliferación para INBL con anti-MIC-A.** Se colocaron por triplicado 1×10^3 células INBL por pozo, en placas de 96 pozos en presencia de anti-MIC-A, fijadas con glutaraldehído y teñidas con cristal violeta para evaluar la proliferación celular. 2a) Observamos que la presencia de la concentración 25 ng/ml hace que la proliferación celular se inhiba. Nivel de confianza de $p= 0.05$. 2b) La inducción en la proliferación celular es más evidente en el 3er día de cultivo para todas las concentraciones utilizadas ($p= 0.05$)

Efecto del anticuerpo anti-IL-2 en la proliferación de la línea celular CALO

En los ensayos realizados con el anticuerpo anti-IL-2, en la línea celular CALO se observa que no importa la concentración de anti-IL-2 usada al día uno ya que la proliferación celular es semejante al control. Interesantemente, al día cinco se observa una disminución de la proliferación, directamente proporcional a la concentración de anticuerpo usado (Gráfica 3). Obteniendo una diferencia significativa en la proliferación celular ($p= 0.05$) con respecto al control en las concentraciones 0.025, 0.25 y 2.5 ng/ml.

CINÉTICA DE PROLIFERACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR CALO EN PRESENCIA DE ANTI-IL-2

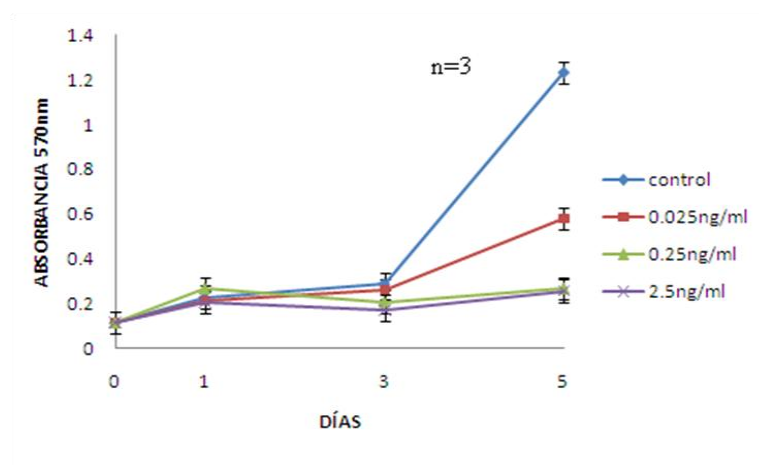


Gráfica 3. **Cinética de proliferación para CALO con anti-IL-2.** Se colocaron por triplicado 1×10^3 células CALO por pozo, en placas de 96 pozos en presencia de anti-IL-2, fijadas con glutaraldehído y teñidas con cristal violeta para evaluar la proliferación celular. En la concentración más alta es donde hay una evidente disminución en la proliferación celular. Diferencia significativa con respecto al control en las tres concentraciones utilizadas $p= 0.05$.

Efecto del anticuerpo anti-IL-2 en la proliferación de la línea celular INBL

Para el caso particular del anticuerpo anti-IL-2 en este trabajo solo usamos concentraciones bajas ya que en trabajos previos se demostró que concentraciones mayores de 30 ng/ml inhiben la proliferación de ambas líneas celulares (Rangel-Corona 2010). En la cinética de proliferación de INBL cultivada en presencia de anti-IL-2 se observa que la presencia del anticuerpo inhibe significativamente la proliferación celular ($p= 0.05$) haciéndose más notable hasta el día cinco (Gráfica 4).

CINÉTICA DE PROLIFERACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR INBL EN PRESENCIA DE ANTI-IL-2



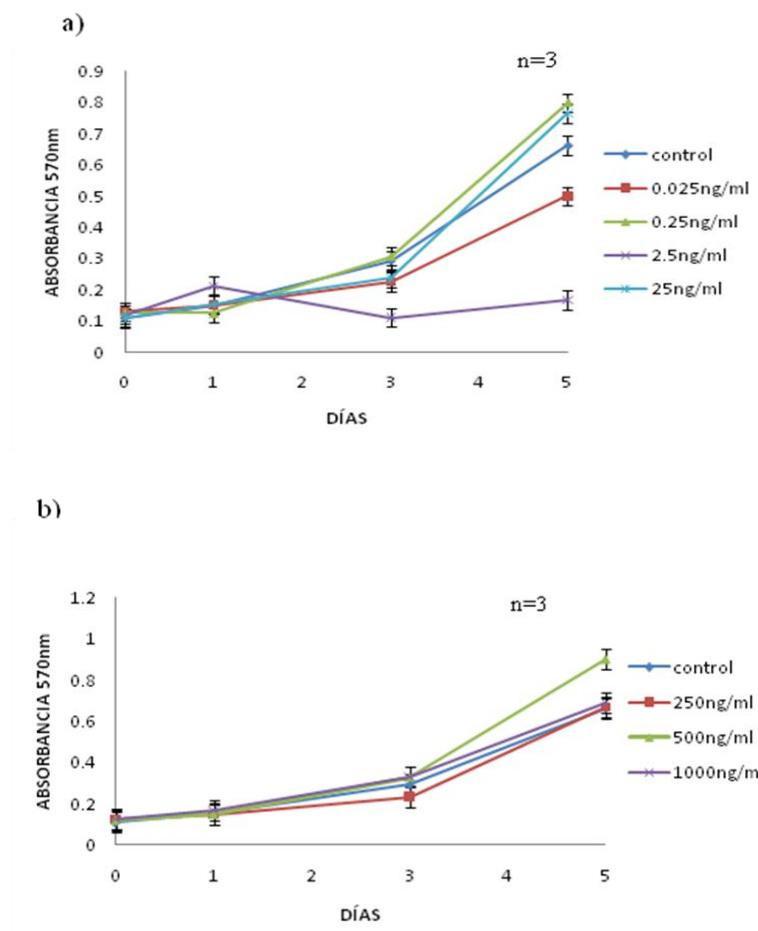
Gráfica 4. **Cinética de proliferación para INBL con anti-IL-2** Se colocaron por triplicado 1×10^3 células INBL por pozo, en placas de 96 pozos en presencia de anti-IL-2, fijadas con glutaraldehído y teñidas con cristal violeta para evaluar la proliferación celular. En la gráfica se observa que anti-IL-2 inhibe la proliferación celular en todas las concentraciones utilizadas. Diferencia significativa en la proliferación celular en las concentraciones 0.025, 0.25 y 2.5 ng/ml con respecto al control $p=0.05$.

Con el propósito de esclarecer si la regulación de la proliferación observada con el uso de los anticuerpos anti-MIC-A y anti-IL-2, se debe al bloqueo específico de MIC-A e IL-2, o es resultado de una activación a través de la unión inespecífica de la fracción Fc de los anticuerpos a otras moléculas expresadas en la membrana de las células de CaCu. Se decidió usar un anticuerpo irrelevante del mismo isótopo que los arriba mencionados para evaluarlo, para ello se cultivaron células de ambas líneas celulares en presencia de un anti-IgG₁ inespecífica de ratón.

Efecto de un anti- IgG₁ de ratón en la proliferación de la línea celular CALO

Interesantemente, observamos que al utilizar la IgG₁ de ratón la proliferación celular aumenta en el 5to día en las concentraciones 0.25 y 25 ng/ml y en las concentraciones 0.025 y 2.5 ng/ml la proliferación celular se inhibe desde el tercer día de cultivo. Estadísticamente solo en la concentración 2.5 ng/ml hay diferencia significativa (Gráfica 5a). Para las concentraciones altas (250, 500, 1000 ng/ml) se observa que solo para la concentración 500 ng/ml en el 5to día de cultivo existe inducción de la proliferación celular que es estadísticamente significativa (Gráfica 5b).

CINÉTICA DE PROLIFERACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR CALO EN PRESENCIA DE UN ANTI- IgG₁ DE RATÓN



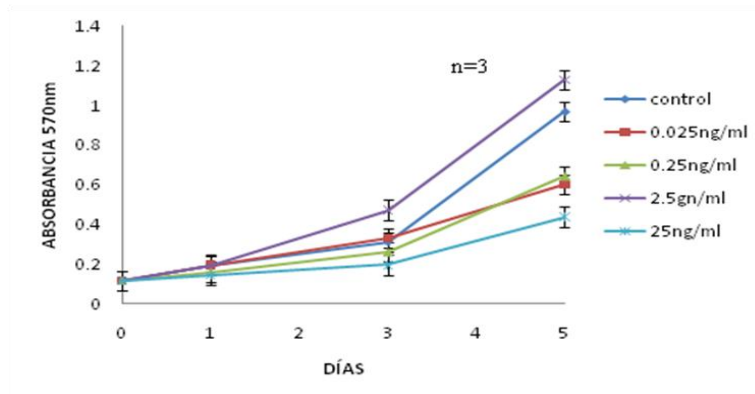
Gráfica 5. **Cinética de proliferación para CALO con anti-IgG1.** Se colocaron por triplicado 1×10^3 células CALO por pozo, en placas de 96 pozos en presencia de un anti-IgG₁ de ratón, fijadas con glutaraldehído y teñidas con cristal violeta para evaluar la proliferación celular. 5a) bajas concentraciones de anticuerpo observando que a la concentración 2.5 ng/ml inhibe la proliferación desde el tercer día de cultivo. 5b) proliferación de las células en presencia de altas concentraciones de anticuerpos en donde a 500 ng/ml se obtiene la mayor proliferación en comparación al control.

Efecto de un anti-IgG₁ de ratón en la proliferación de la línea celular INBL

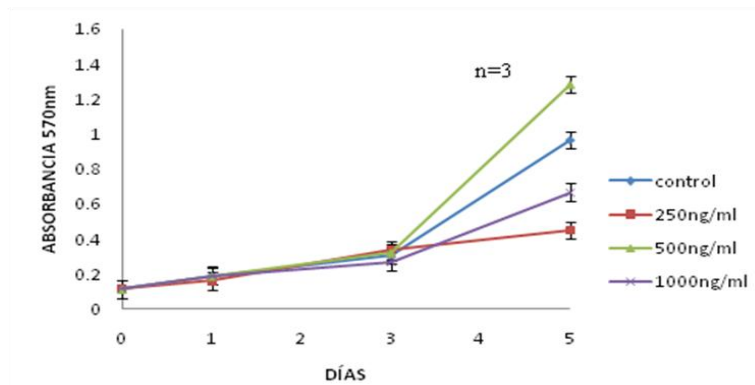
Las células INBL cultivadas en presencia de una IgG₁ de ratón muestran que la presencia del anticuerpo tiene un efecto inhibitorio para las concentraciones 0.025, 0.25 y 25 ng/ml que es muy evidente en el 5to día de cultivo, mientras que la concentración 2.5 ng/ml muestra una ligera inducción no significativa en la proliferación celular desde el tercer día de cultivo (Gráfica 6a). En las concentraciones 250 y 1000 ng/ml se observa una inhibición en la proliferación celular en el 5to día de cultivo, sin embargo, a 500 ng/ml se observa que la proliferación aumenta pero solo hasta el 5to día de cultivo (Gráfica 6b).

CINÉTICA DE PROLIFERACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR INBL EN PRESENCIA DE UN ANTI-IgG₁ DE RATÓN

a)



b)



Gráfica 6. **Cinética de proliferación para INBL con anti-IgG1.** Se colocaron por triplicado 1×10^3 células INBL por pozo, en placas de 96 pozos en presencia de un anti-IgG de ratón del mismo isotipo que anti-MIC-A y anti-IL-2. Concluido el tiempo de cultivo, las células fueron fijadas con glutaraldehído y teñidas con cristal violeta para evaluar proliferación celular. a) Se observa que en presencia de la IgG de ratón a una concentración 2.5 ng/ml la proliferación celular a 5 días aumenta, sin ser estadísticamente significativa. b) Se observa que la proliferación a 5 días disminuye en las concentraciones 250 y 1000 ng/ml, mientras que en la concentración 500 ng/ml la proliferación aumenta significativamente ($p=0.05$).

DISCUSIÓN

Actualmente, en la terapia contra algunos tipos de cáncer se utilizan anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos tumorales específicos dando como resultado una dramática disminución de las masas tumorales; por ejemplo, en pacientes con melanoma los anticuerpos antigangliósidos pueden inducir a la muerte celular, inhibir el crecimiento de éstas, así como la formación de metástasis (Cajaraville G., et al. 2008).

Sabemos que las células neoplásicas provenientes de diversos tumores, actúan como antígenos los cuales pueden ser reconocidos por el sistema inmunológico y por lo tanto, podrían ser tratados con anticuerpos específicos. La terapia con anticuerpos monoclonales es considerada como una forma de inmunoterapia pasiva que tiene como objetivo dirigir selectivamente el tratamiento antitumoral hacia antígenos específicos presentes en las células tumorales y pueden utilizarse de forma única o en combinación con otros agentes terapéuticos para aumentar su eficiencia, evitando así, tanto la exposición de las células normales al agente citotóxico, como los efectos secundarios que producen la mayoría de los fármacos quimioterapéuticos convencionales (Cajaraville G., et al. 2008).

Existen actualmente dos anticuerpos monoclonales aprobados por la FDA para el tratamiento del cáncer: rituximab y trastuzumab que se utilizan para cáncer linfático y de mama respectivamente. Otros se encuentran en fase de investigación clínica como cetuximab, que se emplea en cáncer de cabeza y cuello; el ABX-EGF (anti-EGFR) para carcinoma renal, cáncer colorrectal y cáncer de mama; mientras que bevacizumab (anti-factor de crecimiento de endotelio vascular) se usa en el tratamiento de cáncer rectal y colon metastásico (Cajaraville G., et al. 2008; Mora N. y Rosales C., 2009).

Los anticuerpos pueden utilizarse con tres finalidades terapéuticas: 1) Estimulación de la respuesta inmune del huésped frente a las células tumorales, 2) Interferencia del crecimiento y diferenciación de las células tumorales mediante bloqueo de factores de crecimiento y sus receptores, 3) Formación de inmunoconjugados con mayor actividad antitumoral mediante la unión a agentes citotóxicos, radioisótopos o toxinas (Cajaraville G., et al. 2008).

Por lo antes mencionado, se considera que el uso de anticuerpos monoclonales como tratamiento del cáncer puede ser una buena alternativa para una gran variedad de

tumores. Sin embargo, no se cuenta con información que indique el efecto de anticuerpos monoclonales sobre la proliferación de células de cáncer de cérvix. Por lo antes mencionado el presente estudio, realizado en el Laboratorio de Oncología Celular de la UIDCC, evaluó la proliferación de células de las líneas de cáncer de cérvix (CaCu) CALO e INBL cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de anticuerpos monoclonales anti-MIC-A, anti-IL-2 y anti-IgG₁ de ratón.

Tomando en cuenta que Martínez C., reporta la presencia de MIC-A tanto en células leucémicas, como en las líneas de CaCu CALO, INBL y SIHA, resulta importante esclarecer que papel juega MIC-A en la proliferación de las células de cáncer de cérvix. Ya que hasta ahora se había reportado la expresión de esta molécula, en células endoteliales, fibroblastos, queratinocitos, monocitos y epitelio gastrointestinal. Sin embargo, el ARNm tanto de MIC-A como MIC-B se puede detectar en una amplia variedad de tejidos (con excepción de las células del sistema nervioso central). También se ha reportado que MIC-A se expresa en células sometidas a estrés como es el caso de las células tumorales. Y esta señal podría inducir mecanismos inmunológicos para su destrucción. Por otra parte, se ha demostrado que MIC-A es un blanco de los anticuerpos presentes en los pacientes trasplantados y que sufren un rechazo del injerto. Esto sugiere que como ocurre con las moléculas de clase I clásicas y de clase II del MHC, MIC-A podría ser una molécula diana durante el curso de una reacción de rechazo (Geffner J. y Fainboim L. 2005; Martínez C., Mendoza J).

Por lo cual los datos presentados en este trabajo, que demuestran que anticuerpos monoclonales anti-MIC-A, anti-IL-2 y anti-IgG₁ de ratón tiene efecto diferencial sobre la proliferación de las células de CaCu, dependiendo de la concentración, el tiempo de cultivo y de la línea celular en que se prueben, son muy importantes para esclarecer el papel de MIC-A en la progresión de cáncer de cérvix.

Nuestros resultados con la línea celular CALO indican que anti-MIC-A tiene un efecto inhibitor en 5 de las 7 concentraciones utilizadas mientras que en dos concentraciones observamos un aumento de la proliferación celular. Por lo que MIC-A puede tener un efecto autócrino en las células de cáncer de cérvix, tal como se ha reportado para células leucémicas que expresan MIC-A (Schrambach S., et al., 2007).

Por otro lado, el hecho de que en la línea celular INBL hayamos encontrado que el anticuerpo anti-MIC-A tiene un efecto proliferador en bajas concentraciones, mientras que en altas concentraciones inhibe su proliferación indica que esta línea celular puede

ser dependiente de MIC-A para sustentar su proliferación tal como sucede con otros tumores.

Para los datos obtenidos al utilizar anti-IL-2 observamos que en bajas concentraciones anti-IL-2 inhibe la proliferación de las líneas de CaCu CALO e INBL. Fenómeno parecido al reportado por Rangel-Corona 2010, quien plantea que las células de las líneas de CaCu CALO e INBL tienen un proceso de proliferación dependiente de IL-2 y que altas concentraciones de anticuerpo anti-IL-2 inhibe su proliferación. Sin embargo, no se tenía información del efecto de bajas concentraciones de este anticuerpo, por lo cual resulta interesante el haber observado un efecto de inhibición de la proliferación en ambas líneas celulares. Demostrando que existe una dependencia de estas células tumorales por IL-2 ya que hasta la concentración más baja de anticuerpo inhibió su proliferación. La dependencia por IL-2 de las células de las líneas CALO e INBL se apoya en los reportes que indican que estas dos líneas de CaCu sintetizan IL-2 para inducir su proliferación. Es evidente que con el anticuerpo anti-IL-2, estamos bloqueando la IL-2 impidiendo que la citocina se una a su receptor y que pueda inducir la proliferación de las células tumorales (Rangel C., et al. 2010).

Cuando usamos el anti-IgG no relacionado, los resultados obtenidos al cultivar ambas líneas celulares en presencia de este anticuerpo, indicaron que las células presentan sensibilidad en la proliferación celular. Al exponer a la línea celular CALO a la IgG de ratón se observa que las células son sensibles en dos de las concentraciones bajas al notar que la proliferación celular se inhibe, y se mantiene estable con respecto al control en dos concentraciones altas. Para la línea celular INBL expuesta a IgG de ratón la proliferación celular se inhibe en la mayoría de las concentraciones, solo se tiene que en una concentración baja y a una concentración alta la proliferación aumenta. Esto nos hace suponer que las células de carcinoma de cérvix pueden estar expresando receptores para inmunoglobulinas como el Fc γ RIII, cuya expresión ha sido reportada en células epiteliales de vagina cervical de fetos. Por lo tanto, el proceso de transformación neoplásica puede estar regulando la expresión de novo de este tipo de receptor. Esta hipótesis se basa en el hecho de que las células de carcinoma de cérvix regulan su proliferación al cultivarlas con anticuerpos monoclonales (anti-MIC-A e anti-IL-2). La expresión de estos receptores Fc en las células de CaCu puede servirles como mecanismo de escape inmunológico antitumoral, Ravetch J. y Bolland S. (2001) mencionan que los Fc son expresados por casi todas las células del sistema inmune, macrófagos, linfocitos,

plaquetas, granulocitos, así como por ciertos epitelios transportadores (placenta, hígado, intestino neonatal) y que a través de este receptor las células inmunológicas despiertan la respuesta contra diferentes antígenos. Las células mononucleares, neutrófilos, las células NK, los eosinófilos y los mastocitos que expresan moléculas receptoras de inmunoglobulinas, estas moléculas interactúan con las regiones Fc de diferentes clases de IgGs y promueven actividades como la fagocitosis, la destrucción de células tumorales o la desgranulación de los mastocitos a través de receptores para Fc (FcR) (Roitt I., et al. 2000).

Se sabe que existen tres tipos de FcRs. La mayoría de los receptores para Fc γ poseen dos o tres dominios extracelulares para el reconocimiento de inmunoglobulinas G. Se conocen tres grupos de receptores de IgG humana en la superficie celular: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD16). El receptor Fc γ RI es expresado por macrófagos, monocitos y neutrófilos. El receptor Fc γ RII está ampliamente distribuido entre los distintos tipos de células, se halla en neutrófilos, fagocitos, linfocitos B y algunos linfocitos T y participa en la respuesta T proliferativa, siendo además una diana para las células asesinas naturales o células NK. Existen varias isoformas del Fc γ RII derivadas de tres genes distintos y de procesamiento alternativo del RNA mensajero. Las isoformas del Fc γ RII se distribuyen en forma diferente en varios leucocitos. El Fc γ RIIA se encuentra principalmente en células fagocíticas (neutrófilos, monocitos y macrófagos), La expresión del Fc γ RIIB es inducible en leucocitos fagocíticos por interleucina. El receptor Fc γ RIIIA es expresado por macrófagos, monocitos activados, células NK, células pre-B y células T. Y el receptor Fc γ RIIIB es expresado solamente por granulocitos. (Mora N. y Rosales C. 2009; Roitt I., et al. 2000).

Los receptores para la porción Fc de la inmunoglobulina G (Fc γ R), inmunoglobulina E (Fc ϵ R) y los receptores de membrana involucrados en el reconocimiento del antígeno que incluyen a los receptores de antígeno de las células B (BCR) y los receptores de antígeno de las células T (TCR), se agrupan debido a que las características estructurales y mecanismos bioquímicos de activación celular son similares para todas estas moléculas (Santoyo RG. 2004).

La presencia de estos receptores permite la fijación del complemento o la unión a determinadas células. Los receptores para las moléculas de inmunoglobulinas juegan un papel importante en el sistema inmune, pues sirven como puente de enlace entre el

reconocimiento del antígeno por parte de los anticuerpos específicos, y la activación de células que llevan a cabo una amplia gama de funciones efectoras (Roitt I., et al. 2000., García A., 2008).

Por tanto, el hecho de haber observado, en lo general, una disminución en la proliferación de ambas líneas celulares en presencia de anti-IgG₁, nos hace pensar que estas células expresan receptores para la fracción Fc a través del cual se puede estar inhibiendo la proliferación de las células de cáncer de cérvix, contrario a lo reportado para FcγRI, FcγRIIA y FcγRIII que son receptores que inducen proliferación en macrófagos, ya que contiene una secuencia ITAM (motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina) en su porción citoplásmica, la activación entre el FcγR e IgG dispara una rápida fosforilación de residuos de tirosina específicos en el receptor dentro de los motivos ITAMs que al fosforilarse inducen la proliferación de linfocitos B y T, tal como podría suceder en los 5 casos en que anti-IgG induce la proliferación de las células de CaCu. Pensamos que la inhibición celular observada podría deberse a la presencia de FcγRIIB, receptor inhibitorio que contiene una secuencia ITIM (motivo inhibitorio correspondiente) en su porción citoplasmática y estos actúan como reguladores negativos de la señalización iniciada por receptores que contienen ITAM (Takai T. 2002; García A. 2008).

Por otro lado, algunos datos recientes (comunicación personal Valle A.) indican que las células de CaCu expresan Syk, una proteína expresada en células T, incluyendo poblaciones de timocitos y linfocitos intraepiteliales, en células B y células cebadas. Cuando los ITAMs o ITIMs son fosforilados se induce la activación de Syk que puede interactuar con los receptores FcγRI y FcγRIII e inducir la proliferación o si interactúa con receptores FcγRII puede inhibir la proliferación.

Dado que en nuestros resultados observamos que los anticuerpos anti-MIC-A y anti-IgG₁ de ratón utilizados en este trabajo, tiene un efecto diferencial sobre la proliferación de las células de carcinoma de cérvix, suponemos que los receptores FcγRII y FcγRIII podrían estar presentes en células de este tipo de tumor, por lo que el uso de algunos anticuerpos monoclonales como terapia contra el CaCu debería ser estudiada más a fondo, ya que en el caso de anti-IL-2 sin importar la concentración de anticuerpo utilizado se produce una inhibición de la proliferación de las células de CaCu, mientras que para anti-MICA y anti-IgG₁ dependiendo de la concentración usada se

puede tener una inducción a la proliferación que resultaría en un perjuicio para las pacientes de cáncer de cérvix.

Estos datos son muy importantes ya que en la actualidad se piensa que el uso de anticuerpos monoclonales puede ser la mejor alternativa terapéutica para los pacientes de cáncer. Sin embargo, hay que ser muy cuidadoso ya que el cáncer de cérvix, no responde de la misma forma a diferentes anticuerpos. Por tanto, para una terapia con anticuerpos se debe considerar el tipo de tumor en el que se empleará y hacer pruebas *in vitro* para determinar la respuesta del tumor al anticuerpo que se pretende utilizar como terapia. Otra de las aportaciones de este trabajo es que las células de carcinoma de cérvix, pueden expresar receptores para Fc γ R de tipo II o III, que le permitiría montar una respuesta de escape inmunológico favoreciendo su progresión.

Los resultados de esta investigación, son relevantes ya que dan información sobre la importancia de establecer la susceptibilidad de cada tipo de cáncer al tratamiento con anticuerpos. Ya que en vez de favorecer su regresión se podría estimular el crecimiento de la masa tumoral, agravando el estado de salud de los pacientes en los que se considere utilizar anticuerpos como tratamiento.

CONCLUSIÓN

Anti-MIC-A, anti-IL-2 y anti-IgG₁ de ratón tiene efecto diferencial sobre la proliferación de las células de CaCu dependiendo de la concentración, el tiempo de cultivo y la línea celular en que se prueben.

Anti-MIC-A muestra un efecto diferencial en la regulación de la proliferación de células de cáncer de cérvix dependiente de la concentración.

Anti-IL-2 inhibe la proliferación de ambas líneas celulares de CaCu, independientemente de la concentración.

















PERSPECTIVAS

Ya que en este trabajo observamos que el uso de los anticuerpos monoclonales anti-MIC-A y anti-IgG₁ de ratón inducen la proliferación de células de cáncer de cérvix, sería interesante estudiar:













- 1.- Determinar la expresión de Fc γ RIII en células de cáncer de cérvix.
- 2.- Si está presente el Fc γ RIII, cuantificarlo.
- 3.- Evaluar la proliferación de las líneas celulares CALO e INBL en presencia de anti-FcR.

BIBLIOGRAFÍA

- 📖 Abbas A. y Lichtman A. 2004. *Inmunología Celular y Molecular*. 5° edición, McGraw-Hill. España. Pág. 3-7, 43-63.
- 📖 Abbas A., Andrew H., Lichtman A., Jordan S. Pober. 2002. *Inmunología Celular y Molecular*. 4° edición, McGraw- Hill. España. Pág. 82-90, 398-401.
- 📖 Aguillón J.C., Contreras J., Dotte A., Cruzat A., Catalán D., Salazar L., Molina M.C., Guerrero J., López M., Soto L., Salazar F., Cuchacovich M. 2003. Nuevas armas inmunológicas para la medicina del siglo XXI: Terapia biológica basada en el uso de anticuerpos monoclonales de última generación. *Revista Médica de Chile*. 131(12):1-2
- 📖 Alonso P. Lazcano E., Hernández M. 2000. *Cáncer Cérvico-uterino Diagnóstico, Prevención y Control*. Editorial Médica Panamericana. México. Pág. 121.
- 📖 Almaguer D., 2010. Anticuerpos monoclonales en el tratamiento de enfermedades autoinmunes. *Revista de Hematología*. 11(1): 60-62
- 📖 Ayala A. 2005. Efecto de la IL-2 Encapsulada en liposomas neutros y aniónicos sobre la proliferación de las líneas celulares de CaCU, CALO e INBL. Tesis de Licenciatura. Fez Zaragoza UNAM. Méx. D.F.
- 📖 Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE and Spies T. 1994. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91:6259-63
- 📖 Bahram S and Spies T. 1996. Nucleotide sequence of a human MHC class I MICB cDNA. *Inmunogenetics*. 43:230-33.
- 📖 Bahram, S.2000. MIC genes: from genetics to biology. *Adv. Immunol*. 76: 1-60.
- 📖 Bermúdez V., Peralta O., Madrid V. 2005. Terapia génica con citocinas contra cáncer cervicouterino. *Salud Publica Méx*.47(6)
- 📖 Brostoff J, Scadding GK, Male DK, Roitt IM. 1993. *Cáncer*. En: *Immunologie Clinique*. France: De Boeck Université Bruxelles. 281-91.
- 📖 Cairns J.1981. *Cáncer: Ciencia y Sociedad*. Ed. Reverté, S.A. España. Pág.150.
- 📖 Cajaraville G., Carreras M. J., Massó J. Tamés M. J., 2008. *Oncología*. Pág. 1183-1185.
- 📖 Calvo JC., Choconta K., Díaz D., Orozco O., Bravo M., Espejo F., Salazar L., Guzmán F., Patarroyo M. 2003. An alpha helix conformationally restricted peptide is recognized by cervical carcinoma patient´s sera. *J Med. Chem*. 46(25): 5389-5394.

-  Carrillo A, Mohar A, Meneses A, MC, Frías M, Solorza G y Lizano M. 2004. Utilidad en la combinación de oligonucleótidos universales para la detección del virus del papiloma humano en cáncer cervicouterino y lesiones premalignas. *Salud pública de México*, 46(1):7-15
-  Ciacci C; Dignass A; Koizumi M; Podolsky K. 199. Functional interleukin 2 receptors on intestinal epithelial cells. *J. clin. Invest.* 92: 527
-  Cómbita A, Touzé A, Coursaget P, Bravo M. 2003. Respuesta serológica hacia las cápsidas de los papilomavirus oncogénicos tipos 16, 18, 31, 33, 39, 58 y 59 en mujeres colombianas con cáncer de cérvix invasivo. *Rev Col Cancerología.*; 7:26-34.
-  Consensos Statement.1997. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement on Cervical cancer *Gyn Onco*;66:351-361
-  Creus N., Massó J., Codina C., ribas J., 2002. Anticuerpos monoclonales en Oncología. *Farmacia Hospitalaria.* 26(1): 28-43
-  Del Rio I. 2007. Determinación de las citocinas IL-4, IL-10, INF γ y TNF α , en células de baso de ratón tratadas con IL-2 encapsulada. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza. México. D.F.
-  Dignass A; Podolsky K. 1996 Interleukin modulates intestinal epithelial cell function in vitro. *Exp. Cell Res.* 225: 422
-  Esparza M; Vallejos A. 2006. Panorama del Cáncer Cérvicouterino en México. 23(16): 1-3
-  Feijóo J., Sundlov A., Barón M., 2004. Anticuerpos contra el Cáncer. 204(12): 649-654
-  García A., 2008. Análisis de proteínas que se unen al ITAM de receptores FC γ RI o FC γ RII en células THP-1 inducidas a la diferenciación con vitamina D3. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza. México. D.F.
-  Geffner J. y Fainboim L. 2005. Introducción a la Inmunología Humana. 5^o edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Pág. 93-103.
-  Groh V., Wu J., Yee C., Spies T., 2002. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of the NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419: 734-738.
-  [http://es.wikipedia.org/wiki/Anticuerpo\(tabla\)](http://es.wikipedia.org/wiki/Anticuerpo(tabla))
-  [http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/hla.htm\(imagenes\)](http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/hla.htm(imagenes))
-  Huges, A; Yeager, M; Ten Elsohof, A; Chorney, M. 1999. A new taxonomy of mammalian MHC class I molecules. *Immunology Today*, 20: 22-6
-  Hussain L.A., Kelly C. G., Fellowes R., Hecht E. M., Wilson J., Chapman M., Lehner T. 1992. Expression and gene transcript of Fc receptors for IgG, HLA class II antigens and

Langerhans cells in human cervico-vaginal epithelium. Departments of Immunology and Obstetrics & Gynaecology, United Medical and Dental Schools of Guy's and St. Thomas's Hospitals, London, UK. 90: 530-538.

-  (INEGI) Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. 2009. Secretaria de Salud/Dirección General de Informática en Salud. Base de datos de defunciones 1979-2008. México.
-  Leeuwenberg J., Van de Winkel J., Jeunhomme T., Buurman W., 1990. Functional polymorphism of IgG FcRII (CD32) on human neutrophils. *Immunology*. 71: 301-304.
-  Li P, Willie ST, Bauer S, Morris DL, Spies T and Strong RK. 1999. Crystal structure of the MHC class I homolog MICA, a gd T cell ligand. *Immunity*. 10:577-84.
-  Machado N., Téllez G., Castaño J. 2006. Anticuerpos Monoclonales: Desarrollo Físico y Perspectivas Terapéuticas. *Asociación colombiana de infectología*. 10(3): 186-197
-  Martínez Campos C. A. y Mendoza Rincón J. F. Detección de las formas solubles de MICA y MICB en sobrenadantes de líneas celulares de carcinoma de cérvix y positivas para HPV 16 y HPV18. www.smb.org.mx/XXVICONGRESO/text/Resumen_Orales/
-  Mora N., Rosales C. 2009. Funciones de receptores Fc en mecanismos de defensa y regulación inmunológica. *Revista de investigación clínica*. (61) 4: 313-326.
-  Nazzal O; Reiner M; Abarzúa A; Liendo R; Palma C. 2003. Patología Preinvasora del Cérvix. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*. 68(3): 189-196
-  Nazzal N, Suárez P, Larraguibel P, Rojas F y Bronda M. 2006. Lesiones preinvasoras de cuello uterino: Una visión actual. *Chil Obstet Ginecol*, 71(5):341-348.
-  Oldham RK; Dillman RO., 2008. Monoclonal antibodies in cancer therapy: 25 years of progress. *J. Clin Oncol*. 26(11): 1774-7
-  Parren PW, Warmerdam PA, Boeijs LC, Arts J, Westerdal NA, Vlug A, Capel PJ, Aarden LA, van de Winkel JG. 1992. On the interaction of IgG subclasses with the low affinity Fc gamma RIIa (CD32) on human monocytes, neutrophils, and platelets. Analysis of a functional polymorphism to human IgG2. *Central Laboratory of the Netherlands Red Cross Blood Transfusion Service*.90(4):1537-46.
-  Rangel C., Corona O., Soto C., López L., Pablo A., Torres G., Weiss S. 2010. Evidence that cervical cancer cells secrete IL-2, which becomes an autocrine growth factor. *Elsevier*. (50) 3: 273-277.
-  Ravetch J., Bolland S., 2001. IgG Fc receptors. *Annu. Immunol*. 19:275-290.

- Regueiro G., López L., Gonzáles R., Martínez N. 2003. Inmunología, Biología y Patología del sistema inmune. Editorial Médica Panamericana S.A. Madrid, España. Pág. 1-5, 29-35, 167-169, 180, 181.
- Reyes M., García F., 2005. Citocinas, Inflamación y Conducta. Vertientes. Revista Especializada en Ciencias de la Salud. 8(1-2); 4-13.
- Roitt I., Brostoff J., Male D., 2000. Inmunología. 5ª edición. Editorial Harcourt. Madrid, España. Pág. 19-20, 78-79.
- Ruiz G., Moreno N., López M., Vega M. 2007. Anticuerpos monoclonales terapéuticos. Genoma. España. Pág. 11-21
- Santoyo RG. 2004. Estudio de las vías bioquímicas involucradas en la señalización mediada por los FcγR. Tesis Maestría. Facultad de Química. México.
- Schrambach S., Ardizzone M., Leymarie V., Sibilía J., BahramS. 2007 In vivo expression pattern of MICA and MICB and its relevance to auto-immunity and cancer. PLoS One, 2: 518
- Schroeder HW Jr, Cavacini L. 2010. Structure and function of immunoglobulins. Division of Clinical Immunology and Rheumatology, Department of Medicine, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, USA. 125 (2 Suppl 2):41-52
- Seliger, B; Abken, H; Ferrones, S. 2003. HLA-G and MIC expression in tumors and their role in anti-tumor immunity. Trends in immunology. 24: 82-87
- Serra- Baldrich F. 1985. La piel como órgano inmunológico.
- Soto I., Cáceres J., Mendoza J., Weiss B., 1999. Las citocinas en la hematopoyesis y el sistema inmunológico: mecanismos celulares y moleculares. Plaza y Valdés editores. México. Pág. 128, 145.
- Stuart S., Simister N., Clarkson S., Kacinski B., Shapiro M., Mellman. 1989. Human IgG Fc receptor (hFcRII: CD32) exists as multiple isoforms in macrophages, lymphocytes and IgG-transporting placental epithelium. Department of Molecular and Cell Biology, Triton Biosciences, Inc, Alameda, CA 94501. EMBO J. (8)12: 3657-3666.
- Takai T. Roles of Fc Receptors in Autoimmunity. 2002. Immunol. 2:580-590
- Tirado G, Mohar B, López C, García C, Franco M y Borges P. 2005. Factores de riesgo de cáncer cervicouterino invasor en mujeres mexicanas. Salud pública de México, 47(5):342-350.
- Valle A. 2001. Estudio de las proteínas activadas por la unión de IL-2 a su receptor en las líneas de Carcinoma de Cérnix CALO e INBL en comparación con linfocitos normales. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza. México. D.F.

- ❏ Xi J, Zhang LN, Hu GP, Wang L, Qiao SL, Guo JQ, Lu QY, Zhang GP, Yang YY. Identification of a linear epitope for Fc-binding in the mouse FcγRIII . School of Food Science and Technology.China.
- ❏ Yahamoto, K; Fujiyama, Y; Andoh, A; Bamba, T; Okabe, H. 2001. Oxidative stress increases MICA and MICB gene expression in the human colon carcinoma cell line (CaCo-2). *Biochimica et Biophysica Acta*. 15:26; 10-12.

Apéndice

DESACTIVACIÓN DE SUERO FETAL BOVINO

La botella de suero fetal bovino se deja descongelar a temperatura ambiente, posteriormente se pasa a un baño de agua de 57°C durante 30 min. Esto se hace para inactivar proteínas de bajo peso molecular que pueden interferir con el crecimiento celular.

Una vez inactivado se trasvasa en alícuotas de 50 ml para su mejor manejo.

GLUTARALDEHÍDO AL 1.1%

Esta solución se ocupó en las placas de los ensayos in vitro, para fijar las células. Para preparar 100 ml de glutaraldehído al 1.1%, se tomaron 1.57 ml de glutaraldehído (70% v/v Sigma, USA) y se le adicionaron 98.43 ml de PBS. Una vez preparado se guardo a 4°C hasta su utilización.

PBS

8g de NaCl, 2.16g de Na₂HPO₄, 0.2g de KH₂PO₄ y 0.2 de KCl, se disuelve en 1Lt de agua bidestilada y se ajusta a un pH de 7.2 con HCl a 1N y se esteriliza.

SOLUCIÓN DE CRISTAL VIOLETA AL 0.1%

Para preparar 500 ml de cristal violeta en una concentración de 0.1%; se requiere previamente preparar una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM con un pH 6. Posteriormente se adiciona el cristal violeta, se diluye muy bien y por último se filtra utilizando papel Whatman núm. 2. Este reactivo se guarda a temperatura ambiente.

Hidróxido de sodio (Sigma, Chem. USA)	3.96 g
Ácido fórmico (Sigma, Chem, USA)	4.28 ml
Cristal violeta (Sigma, Chem, USA)	1.00 g

ÁCIDO ACÉTICO 10%

A 10 ml de ácido acético glacial se le agregan 90 ml de agua bidestilada.