



“UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO”

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

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

UMIE-Z L-4 P.B.

TESIS DE LICENCIATURA

**EXPRESIÓN DE FcRn EN LAS LÍNEAS CELULARES DE
CARCINOMA DE CÉRVIX CALO E INBL**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO

Presenta: Tapia Orozco Luis Omar

Director de Tesis

M. en C. Rosalva Rangel Corona

México D.F. 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Oncología Celular de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer L-4 P.B. de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental UMIEZ, en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. Bajo la dirección de la C. a Dra. Rosalva Rangel Corona.

Durante el desarrollo de este trabajo conté con beca para realizar tesis del programa PAPIME de la DGAPA, UNAM PE-213312 y el soporte económico del mismo programa.

“Sorprendernos por algo es el primer paso de la mente hacia el descubrimiento.”

Louis Pasteur

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis Rosalva Rangel Corona y a la Dra. Teresa Corona por la confianza y permitirme adentrarme al mundo de la investigación y sus métodos, por sus consejos y paciencia.

A mis padres por aceptar mis decisiones más allá de los prejuicios, por ser parte y soporte a cada paso que doy, porque gracias a su esfuerzo he tenido las oportunidades suficientes para dirigir mi vida.

A mi hermano Alberto por tantas anécdotas, por estar siempre al pendiente y por sustentar las clamatadas en los momentos clave.

A mi hermano Horacio y su “zurda privilegiada” por esos momentos graciosos y todas las situaciones que parecen irrelevantes en el día a día pero que al final resultan muy importantes.

A Bani por el cariño, por ser sin pretender, por confrontar siempre las ideas más cerradas en mi cabeza, por ayudarme a ver todo desde otra perspectiva.

A la familia y todos los amigos que he encontrado a lo largo de estos 23 años y que se han quedado a formar parte de mi vida.

A mis compañeros de laboratorio y en especial a Daniel y Alondra porque supimos refugiarnos en la risa, incluso en los momentos más complicados, por la ayuda, las anécdotas y los tropiezos, porque sé que nuestra historia apenas comienza.

A los estudiantes que tuve oportunidad de orientar; por sus preguntas, su paciencia, esfuerzo y **amistad**.

Al técnico de laboratorio Don José por su dedicación y compromiso con nosotros.

A Itzel del Rio, Leonardo Trujillo y al Dr. Arturo Valle por compartir siempre su conocimiento amablemente.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABLAS	8
Resumen.....	9
Marco Teórico.....	10
Cáncer.....	10
Virus del Papiloma Humano.....	12
Clasificación del Carcinoma de Cérvix.....	15
Alternativas.....	17
Inmunidad.....	18
Inmunidad Innata.....	18
Sistema del Complemento.....	20
Inmunidad Adaptativa.....	21
Inmunidad Adaptativa Celular.....	21
Inmunidad Adaptativa Humoral.....	23
Anticuerpos.....	24
Receptores Fc.....	27
FcRn.....	33
Citocinas.....	36
Antecedentes.....	36
Justificación.....	38
Hipótesis.....	39
Objetivos.....	39
Materiales y Métodos.....	40
Material Biológico.....	40
Cultivo Celular.....	40
Extracción de RNA total.....	41
Cuantificación de RNA.....	41
Retrotranscripción (RT).....	42
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	42
Electroforesis	43
Resultados.....	45
Electroforesis RNA total.....	46
Resultados RT-PCR.....	46
Densitometría.....	48
Discusión de Resultados.....	52
Conclusión.....	56
Referencias.....	57
Apéndice I. Condiciones Utilizadas en la Técnica RT-PCR.....	62
Apéndice II. Reactivos y Soluciones Utilizados.....	64
Apéndice III. Preparación de Reactivos y Soluciones.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

- CPA: Células presentadoras de antígenos.
- BCR: Receptor de linfocitos B.
- CaCu: Cáncer Cervicouterino.
- cDNA: DNA complementario.
- CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad.
- DNA: Ácido desoxirribonucleico.
- Fc: Fracción cristalizable o constante.
- FcR: Receptor Fc.
- FcRn: Receptor neonatal Fc.
- Fc α R: Receptor Fc α .
- Fc ϵ R: Receptor Fc ϵ .
- Fc γ R: Receptor Fc γ .
- GPI: Glicosilfosfatidilinositol
- Ig: Inmunoglobulina.
- IgA: Inmunoglobulina A.
- IgD: Inmunoglobulina D.
- IgE: Inmunoglobulina E.
- IgG: Inmunoglobulina G.
- IgM: Inmunoglobulina M.
- IL-2: Interleucina 2.
- Ig: Inmunoglobulinas.
- JAK/STAT: Familia Janus de tirosinocinasas / factores de transcripción.
- kDa: Kilo Dalton.
- LPS: Lipopolisacáridos
- MBL: Lectina ligadora de manosa.
- NK: Natural Killer.
- PMN: Polimorfonucleares
- RNA: Ácido ribonucleico.
- RNAm: RNA mensajero.
- RNAr: RNA ribosomal.
- RT: Retrotranscripción.
- TCR: Receptor de células T.
- VPH: Virus del papiloma humano.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Estadios de la etapa invasiva del CaCu.....	17
Figura 2.- Vías de activación del sistema del complemento.....	21
Figura 3.-Clases del complejo mayor de histocompatibilidad.....	22
Figura 4.- Estructura esquemática de un anticuerpo.....	25
Figura 5.-Representación esquemática de las regiones hipervariables en un anticuerpo.....	25
Figura 6.- Representación de Receptores Fc de leucocitos humanos...	28
Figura 7.-Representación gráfica de las diferencias relativas en afinidad entre las subclases de IgG por los receptores Fcγ.....	31
Figura 8.-Funciones de FcRn.....	35
Figura 9.- Integridad del RNA de las líneas de cáncer de cérvix CALO e INBL	46
Figura 10.- Productos de amplificación para el gen β -actina en las líneas celulares CALO e INBL.	47
Figura 11.- Productos de amplificación para el gen FcRn en las líneas celulares CALO e INBL.	47
Figura 12.- Comparación de la expresión de los genes β -actina y FcRn en la línea celular CALO mediante histogramas.....	49
Figura 13.- Comparación de la expresión de los genes β -actina y FcRn en la línea celular INBL mediante histogramas.....	50
Figura 14.- Comparación de la expresión de ARNm para el gen FcRn en las líneas CALO e INBL.	51

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.- Estadísticas de mortalidad.....	11
Tabla 2.- Propiedades generales más importantes de la familia <i>papovaviridae</i>	13
Tabla 3.- Asociación entre los tipos de <i>Papillomavirus</i> descritos con la morfología y localización de las lesiones que provocan.....	14
Tabla 4.- Funciones y características de los diferentes receptores Fc. ...	33
Tabla 5.- Características de las líneas celulares CALO e INBL.	40
Tabla 6.- Secuencias de los primers B actina y FcRn.....	43
Tabla 7.- Valores numéricos proporcionados por el análisis densitométrico.....	48
Tabla 8.-Condiciones para RT.	62
Tabla 9.- Condiciones para cada reacción en la técnica PCR.	63

RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) ocasiona la muerte prematura de alrededor de 274 000 mujeres en el mundo y alrededor de 4000 en México año con año. Una solución terapéutica a este problema resulta por lo tanto una necesidad social prioritaria. Los programas de acción en nuestro país involucran actividades en la detección oportuna del cáncer en etapas preclínicas o clínicas iniciales, sin embargo, el rezago en la cobertura de estos programas, así como la carencia de infraestructura para desarrollar pruebas en comunidades aisladas, representa una problemática que desafortunadamente se traduce en cifras estadísticas de mortalidad a pesar de ser una enfermedad prevenible casi en un 100% (Programa de Acción Específico 2007-2012. Cáncer cervicouterino Secretaria de Salud México).

El éxito del cáncer se basa en el control de una gran cantidad de factores que promueven la división celular incontrolada como es: una desregulación de la transducción de señales moleculares, el escape a la detección inmunológica, la evasión de la apoptosis y la autorregulación de la transcripción génica. Todas estas características moleculares hacen del cáncer una enfermedad muy compleja y por lo tanto, un gran reto en la búsqueda de una solución terapéutica; es por esto, que resulta prioritario comprender todos los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo tumoral, para así proponer una estrategia terapéutica bien fundamentada que arroje resultados más efectivos en la erradicación de este mal.

En el presente trabajo se demuestra la expresión de RNAm para el gen del receptor neonatal Fc (FcRn) en líneas celulares de CaCu. FcRn ha sido reportado en otros tipos de cáncer, sin embargo aún no se le ha atribuido ninguna función relacionada al desarrollo tumoral.

En organismos sanos FcRn regula el transporte de inmunoglobulinas G (IgG); esta capacidad permite la inmunidad pasiva durante el desarrollo embrionario a través de la placenta y también durante la lactancia a través de la captación de IgG's provenientes de la leche materna en el intestino. Dichas funciones de FcRn podrían conferirle al tumor una herramienta más contra la detección inmunológica evitando la interacción de anticuerpos con los antígenos tumorales presentes en membrana, por lo que su estudio y caracterización son indispensables para el desarrollo de una terapia.

MARCO TEÓRICO

Cáncer

El Cáncer es un nombre común para enfermedades genéticas, producto de alteraciones en el ADN que generan una proliferación celular incontrolada. Las células cancerígenas pueden diseminarse a otras partes del cuerpo por el sistema sanguíneo y por el sistema linfático (American Cancer Society).

Casi todos los cánceres se originan a partir de una célula única, aunque siempre se necesita una suma de múltiples acontecimientos para que una célula pase del fenotipo normal al fenotipo transformado.

La mayoría de estas alteraciones implican cambios en la secuencia normal de ADN (es decir una mutación), que puede tener su origen en errores aleatorios de repetición, exposición a carcinógenos o defectos en los procesos de reparación de ADN.

Existen 6 características fundamentales para definir a una célula tumoral: el mantenimiento de señales proliferativas, inmortalidad replicativa, inducción de invasión y metástasis, evasión de supresores de crecimiento, inducción de angiogénesis y resistencia a la muerte.

También intervienen defectos de los genes que reparan el ADN. Los genes que promueven el crecimiento normal de la célula se denominan protooncogenes y la activación de dichos genes por mutación puntual, amplificación o alteración de la regulación, los convierte en oncogenes que promueven la proliferación del cáncer. A pesar de que todos los cánceres son genéticos, no todos son hereditarios (Guyton 2001).

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

La incidencia del cáncer se relaciona directamente con la edad. Los tumores malignos representan una de las mayores causas de mortalidad a nivel mundial, aproximadamente 13% de las defunciones mundiales, 8.2 millones de muertes por año, de las cuales más del 72% se registran en países de ingresos bajos y medios (INEGI, 2011).

Hay más de 100 tipos de cáncer. La mayoría de los cánceres toman el nombre del órgano o de las células en donde se originan (American Cancer Society).

En nuestro país durante 2011 se registraron 590 mil 693 defunciones (Tabla 1); 332 mil 646 fueron de varones y 257 mil 468 de mujeres. En estas cifras se reporta que, para las mujeres en el rango de edad de los 25 a los 64 años, la principal causa de muerte es por tumores malignos, alcanzando la cifra de 35 823 muertes, siendo dentro de éstas, el cáncer de mama, la enfermedad que causa el mayor número de víctimas (5 062), seguido por el cáncer cervicouterino (3 959).

Principales causas de mortalidad para mujeres en México durante el año 2011		
Orden de importancia	Causas	Defunciones
		Total: 259 669
1	Enfermedades del corazón.	50,226
	Enfermedades isquémicas del corazón	31,222
2	Diabetes mellitus	43,267
3	Tumores malignos	35,823
	De la mama	5,062
	Del cuello del útero	3,959
	Del hígado y las vías biliares intrahepáticas	2,800
4	Enfermedades cardiovasculares	16,971
5	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas	8,989
6	Accidentes	8,906
	De tráfico de vehículos de motor	3,615
7	Enfermedades del hígado	8,8829
	Enfermedad alcohólica del hígado	1,208
8	Influenza y neumonía	7,098
9	Ciertas afecciones originadas en el periodo perinatal	6,066
	Dificultad respiratoria del recién nacido y otros trastornos respiratorios originados en el periodo perinatal	2,711
10	Insuficiencia renal	5,374

Tabla1.-Estadísticas de mortalidad para mujeres en México durante el año 201. Fuente:INEGI

El CaCu es un problema de salud prioritario no sólo por su magnitud sino porque se trata de una enfermedad prevenible casi en un 100%. Cada año mueren alrededor de 274 000 mujeres por esta enfermedad y el 85% de los decesos ocurren en países en vías de desarrollo (De Vita et al 2008).

Una estrategia muy efectiva que se ha utilizado durante los últimos 50 años en países con altos ingresos económicos, es el tamizaje, el cual usa la prueba para la identificación del Virus del Papiloma Humano (VPH), el examen visual usando ácido acético y la vacuna contra el VPH. Se ha demostrado que un buen programa de tamizaje puede reducir la mortalidad causada por el cáncer (OMS, 2011).

Estudios revelan que la infección por VPH está vinculado en más del 97% de los casos de CaCu (Guyton, 2001).

Virus del Papiloma Humano

Se conocen más de 100 tipos de VPH, siendo ocho tipos de VPH (16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58) los causantes de cerca del 99.7% de todos los casos de oncogénesis cervical (Tabla 3) (Programa de acción específico CaCu 2007-2012. Secretaria de Salud).

Estos tipos de virus pertenecen a la familia *Papovaviridae*. Dicha familia se divide en dos subfamilias *Polyomavirinae* y *Papillomavirinae*, siendo este último grupo donde se encuentran todos los virus oncogénicos que afectan a los humanos (Tabla 2). El término papovavirus tiene como origen las dos primeras letras con que se designaron a los representantes iniciales de la familia (Papillomavirus del conejo, Polyomavirus de ratón *yimian vacoulatig* virus o SV40).

La cápside de la subfamilia *Papillomaviridae* presenta simetría icosaédrica y está formada por dos proteínas estructurales; una de ellas se conoce como la proteína mayoritaria de la cápside representando el 80% del contenido proteico viral. Esta proteína genera una respuesta neutralizante de anticuerpos específicos y está altamente conservada entre los diferentes tipos de VPH (Consuegra 2004).

Familia Papovaviridae	
Virión	Icosaédrico 45 a 55 nm de diámetro
Composición	ADN (10%) Proteínas (90%)
Genoma	ADN de doble cadena circular tamaño de 5 a 8 Kb
Proteínas	2 a 3 proteínas estructurales, ADN del virión asociado a histonas celulares.
Envoltura	No presentan. Suelen denominarse como virus desnudos
Replicación	Núcleo
Características notables de la familia	Estimulan la síntesis de ADN en la célula. Los <i>Papillomavirus</i> son considerados como agentes etiológicos de varios tipos de cáncer. Las oncoproteínas virales interactúan con las proteínas celulares supresoras de tumor.

Tabla 2.- Características generales de la familia de virus *Papovaviridae*.

A pesar de la gran diversidad de los HPV, su organización genómica es muy conservada. Todos presentan un grupo de genes de expresión temprana (E) y dos genes de expresión tardía (L), así como una región reguladora no codificadora. Todos sus genes están codificados en una sola cadena y usan un procesamiento diferencial de corte y empalme para la expresión individual de cada uno de sus genes. La capacidad oncogénica de cada uno de los HPV reside en dos productos virales: las proteínas E6 y E7, cuya expresión depende de un gran número de factores celulares y la presencia de la proteína viral reguladora E2.

Existen dos formas de replicación del ADN viral. La primera de ellas ocurre en las células basales de la epidermis donde el genoma se mantiene como un plásmido con un promedio de multiplicación de 11 copias por cada ciclo celular.

La segunda forma es conocida como replicación vegetativa y se lleva a cabo en células diferenciadas de la epidermis. Esta etapa se caracteriza por la generación de un gran número de genomas virales que garantizan la formación de la progenie (Consuegra 2004). Sin embargo la infección por VPH no es suficiente para la generación de un fenotipo maligno, ya que es necesaria la suma de un gran número de factores bioquímicos e inmunológicos para el desarrollo de la enfermedad.

Tipos de VPH	<i>Papillomavirus</i> Patología asociada	Localización
6,11,70	Verrugas genitales	Vulva, pene, periano, introito vaginal
1	Verrugas plantares	Plantas de los pies
2,4,26,27,29,75,76,77	Verrugas comunes	Manos
7		
3,10,28,49	Verrugas planas	Brazos, cara y rodillas
65	Verrugas pigmentadas	Cara y cuello
7	Verrugas de carnicero	Manos
5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19 al 25, 36, 46, 47, 50	Epidermodisplasia verruciforme	Cara, tronco y extremidades
36, 37, 38, 41, 48, 60, 63	Lesiones malignas de piel	Variable
16, 18, 31, 33, al 35, 39, 40, 42 al 45, 51 al 56, 58 al 62, 67 al 69, 71, 74	Neoplasia intraepitelial cervical y cáncer anogenital.	Vulva, pene, ano, periano, cérvix, vagina
6, 7, 11, 13, 30, 32, 57, 72, 73	Lesiones en vías respiratorias y cavidad oral	Boca, laringe, faringe esófago, pulmones
26, 49, 72, 73, 75 al 77	Lesiones en inmunodeprimidos	Variable

Tabla 3.- Asociación entre los tipos de *Papillomavirus* descritos con la morfología y localización de las lesiones que provocan.

Actualmente se han desarrollado vacunas terapéuticas y profilácticas contra el VPH, las cuales pueden prevenir más del 70% de nuevos casos de CaCu. Los mayores retos de la introducción de dicha vacuna es reducir el alto costo y la implementación de una eficiente plataforma de vacunación entre las mujeres adolescentes, ya que en algunos países los programas de vacunación resultan insuficientes (OMS, 2011).

Existen dos vacunas disponibles que ayudan en la prevención de ciertos tipos de VPH Gardasil® y Cervarix® (VPH -16 y VPH-18). La vacuna

Gardasil también protege contra dos tipos más de VPH (VPH -6 y VPH-11) que en conjunto causan el 90% de todas las verrugas genitales.

Si el virus logra escapar la detección inmunológica y generar un fenotipo maligno en las células diana, es probable que las células den origen al cáncer (American Cancer Society).

Clasificación del Carcinoma de cérvix.

La Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) realizó una clasificación estadiada dependiendo el grado de invasión que presenta el cáncer, respondiendo a los siguientes criterios.

- **El carcinoma de estadio I:** Se limita estrictamente al cuello uterino. No se debe tomar en cuenta la extensión al cuerpo uterino. El diagnóstico de los estadios IA1 y IA2 debe hacerse a partir de los exámenes microscópicos de un tejido extirpado, preferentemente un cono, que rodee la lesión entera.

Estadio IA: Cáncer invasor identificado a través de un examen microscópico únicamente. La invasión se limita a la invasión del estroma medida con un máximo de 5 mm de profundidad y 7 mm de extensión horizontal.

Estadio IA1: La invasión medida en el estroma no supera 3 mm de profundidad y 7 mm de diámetro.

Estadio IA2: La invasión medida en el estroma está entre 3 y 5 mm de profundidad y no supera 7 mm de diámetro.

Estadio IB: Las lesiones clínicas se limitan al cérvix, o las lesiones preclínicas son mayores que en el estadio IA. Toda lesión macroscópicamente visible incluso con una invasión superficial es un cáncer de estadio IB.

Estadio IB1: Lesiones clínicas de tamaño máximo de 4 cm.

Estadio IB2: Lesiones clínicas de tamaño superior a 4 cm.

-
- **El carcinoma de Estadio II** se extiende más allá del cérvix, pero sin alcanzar las paredes pelvianas. Afecta la vagina, pero no más allá de sus dos tercios superiores.

Estadio IIA: Ninguna afección parametrial evidente. La invasión afecta los dos tercios superiores de la vagina.

Estadio IIB: Afección parametrial evidente, pero la pared pelviana no está afectada.

- **El carcinoma de estadio III:** Se extiende hacia la pared pelviana. En el examen rectal, todas las zonas están invadidas por el cáncer entre el tumor y la pared pelviana. El tumor afecta el tercio inferior de la vagina. Todos los cánceres con una hidronefrosis o una disfunción renal son cánceres de estadio III.

Estadio IIIA: Ninguna extensión en la pared pelviana, pero afección del tercio inferior de la vagina.

Estadio IIIB: Extensión a la pared pelviana, hidronefrosis o disfunción renal.

- **El carcinoma de estadio IV:** se extiende más allá de la pelvis verdadera o invade la mucosa de la vejiga y/o del recto.

Estadio IVA: Extensión del tumor a los órganos pelvianos cercanos.

Estadio IVB: Extensión a los órganos distantes.

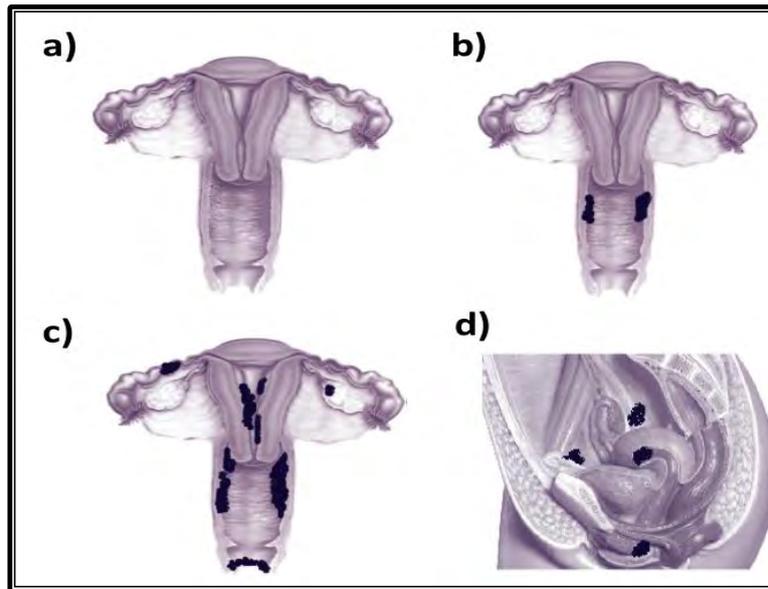


Figura 1. Estadios de la etapa invasiva del CaCu. La imagen ilustra con manchas negras la invasión del Cáncer de Cérvix a lo largo de cada estadio. a) Estadio I. b) Estadio II. c) Estadio III. d) Estadio IV. Tomado de Montalvo 2011.

Alternativas

El tratamiento del CaCu depende de la etapa y de la fase, es decir si se encuentra en un estadio temprano o avanzado de la enfermedad, del tamaño y forma del tumor, la edad y la salud general de la mujer.

Los diferentes tipos de tratamiento son usados constantemente en combinación, ya sea simultáneamente o secuencialmente.

Existen varias opciones de tratamiento disponibles para las lesiones pre-cancerosas y cancerosas del cérvix (López, 2006).

1. Fase pre-invasiva (Estadio 0 - Carcinoma in Situ).- El tratamiento puede incluir lo siguiente:

- Cirugía láser
- Criocirugía
- Procedimiento de extracción electroquirúrgica: es un procedimiento en el cual se usa un aro delgado de alambre eléctrico (por donde pasa la corriente) para extraer la sección del tejido con células anormales.
- Conización: es un procedimiento quirúrgico en el que se extrae una biopsia en forma de cono de la cervix.

2. Etapa invasiva (Estadios 1-4).- Cuando el cáncer ya ha invadido el cérvix y hay metástasis el tratamiento puede incluir:

- Radioterapia

-
- Quimioterapia
 - La histerectomía que se puede hacer de dos formas dependiendo del grado del cáncer 1) Histerectomía simple es la extirpación del cáncer, el cérvix y el útero. 2) Histerectomía radical envuelve la extirpación del cérvix, el útero, parte de la vagina y los ganglios de esa área.

Actualmente dado el avance de la investigación, se ha sumado la inmunoterapia como alternativa a este padecimiento, la cual resulta de gran interés por su alta especificidad hacia las células tumorales.

Se sabe que las neoplasias malignas pueden ser detectadas por el sistema inmunológico, sin embargo, la detección no implica la destrucción de la misma.

Las células neoplásicas no van a ser reconocidas como tales por el aparato inmunológico, sino sólo como portadoras de moléculas antigénicas. Tal reconocimiento resulta en la generación de todos los efectores de la respuesta inmune (Manual CTO de medicina y cirugía).

Inmunidad

El organismo es constantemente amenazado por la invasión de microorganismos lesivos (bacterias, hongos, protozoarios, virus etc.). Para defenderse de esta amenaza ha desarrollado varios mecanismos de defensa, que confieren al organismo cierta insensibilidad frente a las infecciones. A la acción de dichos mecanismos en conjunto se le denomina inmunidad.

Algunos de los mecanismos representan la primera línea de defensa del organismo contra las infecciones e incluyen fenómenos generales inespecíficos que actúan sobre diferentes microorganismos o sustancias con potencial invasivo sin discriminarlos, este tipo de inmunidad se clasifica como inmunidad congénita o innata (Abbas y col., 2008).

I) Inmunidad Innata

Dentro de los mecanismos que comprende la inmunidad innata se encuentran los siguientes (Abbas y col., 2008):

- Barreras físicas y químicas.
- Células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos) y linfocitos citolíticos naturales (NK).
- Proteínas de la sangre.
- Citocinas.

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

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

Si un microorganismo cruza la barrera epitelial y empieza a replicarse en los tejidos del hospedero; casi siempre es reconocido de inmediato por los fagocitos mononucleares, o macrófagos, que residen en estos tejidos. Los macrófagos maduran de modo continuo a partir de monocitos que abandonan la circulación y emigran hacia tejidos de todo el cuerpo.

La segunda familia de fagocitos, los neutrófilos, o leucocitos neutrofílicos polimorfonucleares (PMN), son células de vida breve que abundan en la sangre, pero no están presentes en tejidos sanos normales. Estas dos células fagocíticas tienen una función clave en la Inmunidad Innata porque pueden reconocer, ingerir y destruir muchos patógenos sin la ayuda de la respuesta Inmune Adaptativa (Murphy y col., 2008).

Los macrófagos y neutrófilos reconocen patógenos por medio de receptores de superficie celular que en conjunto se denominan Receptores Tipo Toll (Toll-like receptors TLR). Estas moléculas son capaces de distinguir patrones que muchos patógenos tienen en común (Murphy y col., 2008).

Los TLR se unen a varios componentes de los microbios como los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana externa de las bacterias gramnegativas, la flagelina en los flagelos bacterianos, el ácido lipoteicoico de la pared celular de las bacterias grampositivas, el DNA de las bacterias y el DNA y RNA de los virus; también reconocen algunos componentes de hongos y parásitos. Cuando los TLR encuentran componentes de los microorganismos, como el LPS de las bacterias gramnegativas, inducen una reacción defensiva en las células inmunitarias a través de la acción de citocinas, así se reclutan a otros macrófagos y células dendríticas, con el fin de aislar y destruir a los microorganismos como parte de la respuesta inflamatoria (Tortora y col., 2007).

En muchos casos, la unión de un patógeno a estos receptores conduce a un proceso llamado fagocitosis, seguida de la destrucción del patógeno dentro de un fagocito (Murphy y col., 2008).

Al momento de la fagocitosis, los macrófagos y los neutrófilos producen una variedad de otros compuestos tóxicos que ayudan a destruir al microorganismo fagocitado, como son los péptidos antimicrobianos, el óxido nítrico (NO), el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que son directamente tóxicos para las bacterias (Abbas, 2008).

Un efecto importante producido por la interacción entre patógenos y macrófagos es su activación, lo que da lugar a la liberación de citocinas y quimiocinas (citocinas quimioatrayentes), además de otros mediadores químicos que establecen un estado de inflamación en el tejido y atraen neutrófilos y células plasmáticas hacia el sitio de infección. Las citocinas inducen la expresión de las llamadas moléculas coestimuladoras, lo que permite que macrófagos y células dendríticas den paso a una respuesta inmunitaria adaptativa (Murphy y col., 2007).

A estos mecanismos celulares de defensa contra patógenos se suma el sistema del complemento, el cual consta de varias proteínas plasmáticas que actúan en conjunto para destruir y opsonizar microbios, o bien para reclutar células fagocíticas del sistema inmunológico.

I.I) Sistema del complemento

El sistema del complemento funciona a través de cascadas proteolíticas en las que se altera la estructura de una enzima precursora inactiva (zimógeno). Esta activación da lugar al cambio estructural de la siguiente proteína en la cascada promoviendo su activación. Bajo estas circunstancias la cantidad de productos proteolíticos aumenta y el conjunto de estas reacciones dan lugar a la defensa del hospedero frente a un potencial patógeno (Figura 2).

El sistema del complemento es capaz de detectar sustancias extrañas presentes en algunos microbios, lo que da lugar al inicio de la respuesta; se han descrito 3 formas o vías en las que se lleva a cabo esta reacción.

1.-Vía Clásica: Denominada así por ser la primera en describirse, se caracteriza por involucrar anticuerpos para su activación.

2.-Vía alternativa: En sentido filogenético esta vía es más antigua pero la segunda en describirse, se caracteriza por la detección directa (independiente de anticuerpos) de ciertas estructuras en la superficie microbiana.

3.-La vía de la lectina: Esta vía está caracterizada por utilizar una proteína denominada lectina ligadora de manosa (MBL, del inglés mannose-binding lectin) que reconoce manosas en glicoproteínas y glucolípidos bacterianos (Abbas y col., 2007).

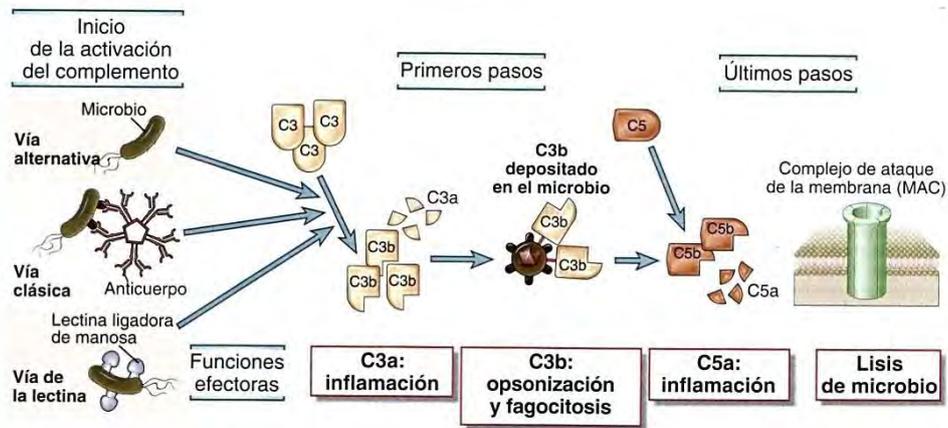


Figura 2.- Vías de activación del complemento. Se muestran las 3 vías de activación del sistema del complemento y las principales funciones de las proteínas más importantes involucradas, culminando en la formación del complejo de ataque de la membrana, el cual genera poros en la membrana de las células microbianas, provocando muerte celular.

II) Inmunidad Adaptativa

La inmunidad adaptativa o específica, es mediada por linfocitos e incluye la formación de anticuerpos y linfocitos activados que atacan y destruyen a un agresor específico.

Existen dos formas de inmunidad específica, la **inmunidad celular** que se caracteriza por la diferenciación de linfocitos T efectores capaces de eliminar específicamente antígenos por activación de fagocitos o por eliminación directa de células infectadas y la **inmunidad humoral**; esta última caracterizada por la síntesis de anticuerpos circulantes producidos por células plasmáticas formadas a través de linfocitos B.

Al contrario de la inmunidad innata, la inmunidad adaptativa es más lenta para responder, pero tiene un componente de memoria (Tortora y col., 2007).

II.I) Inmunidad adaptativa celular

Es llevada a cabo por la acción de linfocitos T. Estas células reciben su nombre debido a que se diferencian en el Timo. Dependiendo de la función son clasificados como linfocitos T citotóxicos y linfocitos T cooperadores (Koolman y Roehm, 2005).

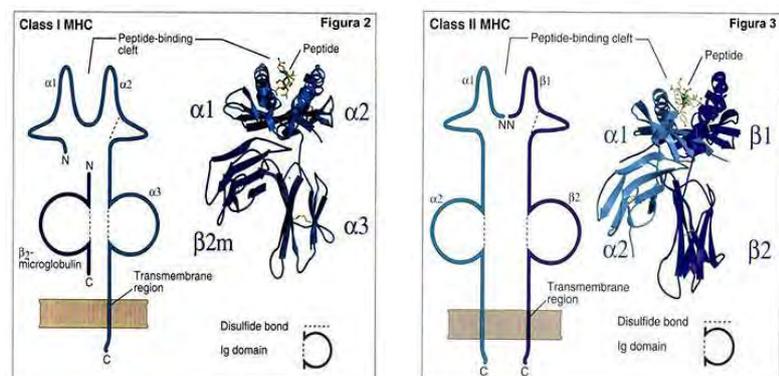
Los linfocitos T, responden a los antígenos por medio de receptores ubicados en su superficie, los receptores de linfocitos T (TCR, del inglés T-cell receptor). Las principales funciones de los linfocitos T son erradicar infecciones por microbios intracelulares y activar otras células como macrófagos y linfocitos B.

Para poder realizar estas funciones, deben pasar por un proceso de activación previo donde células presentadoras de antígeno (APC del inglés antigen-presenting cells) exponen en su membrana péptidos ajenos al organismo con ayuda de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC del inglés major histocompatibility complex). La unión de estas moléculas con el TCR es capaz de activar a los linfocitos T. Esta unión se realiza de manera muy específica, la estructura de las moléculas del MHC no realizan discriminación alguna entre péptidos propios o extraños, de tal manera que el reconocimiento de un péptido microbiano se centra en la estructura del TCR; si este detecta un péptido extraño comienza una transducción de señales que promueve la activación del linfocito.

Las moléculas del MHC comparten en general la característica estructural de un surco o hendidura de unión al péptido, lo que resulta fundamental para la activación de linfocitos.

Existen dos clases de moléculas del MHC: la clase I y la clase II, que se diferencian entre sí por su estructura y función. Las moléculas de la clase I del MHC se caracterizan por tener una cadena α unida de manera no covalente a un polipéptido denominado β_2 microglobulina, se expresan en todas las células nucleadas y los antígenos peptídicos asociados a estas moléculas son reconocidos por linfocitos TCD8. La clase II del MHC posee dos cadenas polimórficas denominadas α y β y están encargadas de activar a los linfocitos T CD4. Estas moléculas se expresan en APC especializadas como macrófagos, linfocitos B y células dendríticas. (Tortora y col., 2007).

Figura 3.- Estructura tridimensional de las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I (izquierda) y de clase II (derecha).



La activación de linfocitos T promueve su diferenciación, ya sea como células efectoras o como células de memoria, las últimas sobreviven durante periodos largos y responden con rapidez al antígeno (Abbas y col., 2007).

II.II) Inmunidad adaptativa humoral

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

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

Existen dos subgrupos de linfocitos B:

- Linfocitos B de la zona marginal
- Linfocitos B foliculares

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

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

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

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

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

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

Una vez que la activación se ha llevado a cabo el linfocito B es capaz de segregar anticuerpos contra antígenos específicos (Abbas y col., 2007).

II.III) Anticuerpos

Los anticuerpos son moléculas de globulina con elevado peso molecular pertenecientes a la fracción de las inmunoglobulinas (Ig). Las inmunoglobulinas pueden estar presentes en sangre, pero también pueden estar adheridas a la membrana de linfocitos B donde representan los receptores fijadores de antígeno.

Las principales funciones de un anticuerpo radican en neutralizar y eliminar microbios infecciosos y toxinas microbianas.

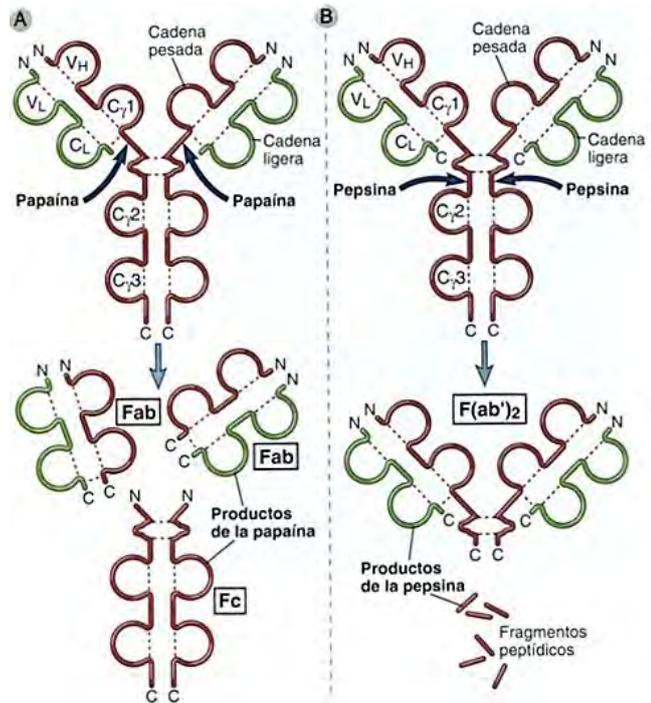
Ayudan al sistema inmune al:

- Unirse a los antígenos en la superficie de los patógenos y de esta forma prevenir que interactúen con las células del cuerpo (neutralización).
- Unirse a patógenos unicelulares formando agregados, los cuales son más fáciles de eliminar por los fagocitos (aglutinación).
- Activar al sistema del complemento, promoviendo la defensa de la inmunidad innata (opsonización).
- Al activar la citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC) (Álvarez-López y col., 2004; Koolman y Roehm, 2005).

Las funciones y su efectividad varían según el tipo o subtipo de inmunoglobulina y su localización (Álvarez-López y col., 2004).

Una molécula de anticuerpo tiene la forma de una Y dado que se compone por dos cadenas pesadas H (Heavy), cada una con un peso molecular alrededor de 50 000 y dos cadenas livianas L (light), cada una de peso molecular de alrededor de 25000 unidades. Cada brazo de la Y posee un sitio fijador de antígeno idénticos entre sí.

Figura4.- Estructura esquemática de un anticuerpo. La digestión mediante algunas enzimas como la papaína (izquierda) y la pepsina (derecha) ha permitido una caracterización más profunda sobre la estructura y funciones de los anticuerpos.



Las cadenas liviana y pesada intervienen en la conformación del sitio fijador del antígeno, dado que la porción de cada cadena interviniente representa una **región variable** denominadas V_H y V_L recibe el nombre de región variable, debido a que la secuencia de aminoácidos en esta región varía.

La variación de la secuencia de aminoácidos se limita sobre todo a las tres regiones hipervariables de las cadenas pesada y liviana respectivamente, los contactos con estas seis regiones variables son los responsables de la complementariedad estereoquímica entre las moléculas de antígeno y anticuerpo.

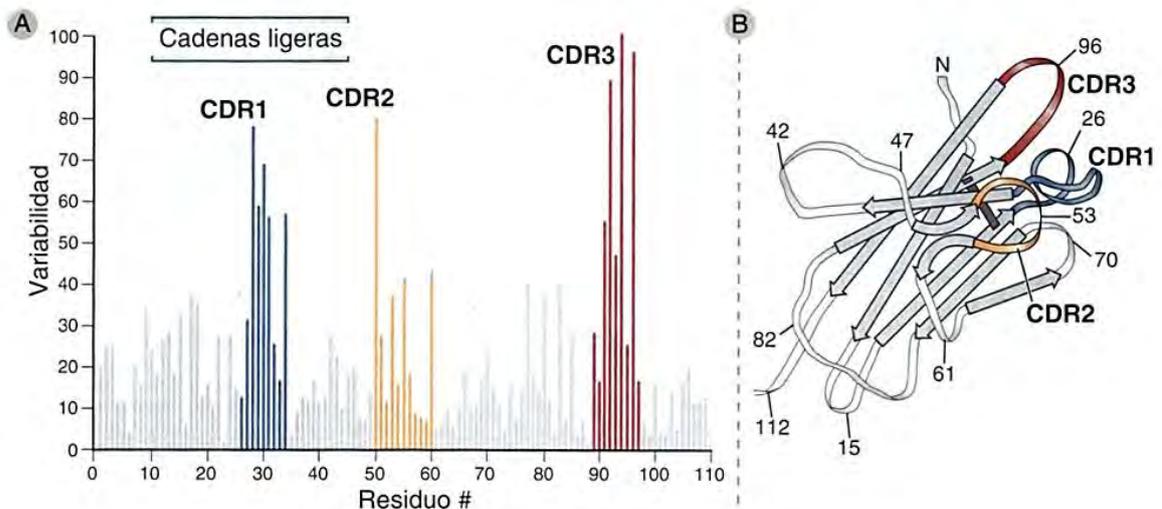


Figura 5.-Representación esquemática de las regiones hipervariables en un anticuerpo

El resto de las cadenas livianas y pesadas se componen de una **región constante** denominadas C_H y C_L respectivamente, dado que sólo presentan pequeñas variaciones en las secuencias de aminoácidos (Quedan origen a la diferenciación entre las cinco clases de inmunoglobulinas).

Los dos brazos de la Y representan los fragmentos Fab (antigen binding), mientras que el tronco de la Y representa el fragmento Fc (cristalizable).

La capacidad fijadora de antígeno se relaciona con los sitios fijadores de antígenos de las cadenas liviana y pesada, los efectos biológicos o funciones efectoras de la molécula del anticuerpo se relaciona con la región constante (Abbas y col., 2007).

La función biológica de las cinco clases de anticuerpo varía en relación con las variaciones de sus porciones Fc.

. Existen 5 clases de inmunoglobulinas: IgA, IgE, IgG, IgD e IgM.

- IgA: Posee dos subtipos IgA1 e IgA2 con una concentración en suero de 3,5 mg/ml, tiene una vida media en suero de 6 días y es secretada como monómero dímero o trímero, sus funciones se encuentran íntimamente relacionadas a la inmunidad en mucosas.
- IgD: No posee subtipos, ni es una forma secretada de anticuerpo, tiene gran relevancia como receptor para antígeno en linfocitos B vírgenes.
- IgE: No posee ningún subtipo, su concentración en suero es de 0.05 mg/ml y es secretada de forma monomérica, posee una sensibilidad inmediata ante parásitos helmintos.
- IgG: Existen cuatro subtipos 1, 2, 3 y 4, posee una concentración en suero de 13,5mg/ml, lo que la convierte en la Ig más abundante, su vida media es de 23 días y es secretada en forma monomérica.
Dentro de sus funciones está la opsonización de microbios, activación del complemento, citotoxicidad dependiente de anticuerpos e inmunidad neonatal. Es la única Ig capaz de atravesar la placenta (con menor eficiencia en el caso de la IgG2).
- IgM: Es pentamérica de unidades de cuatro cadenas y, al igual que la IgA, tiene la cadena J que facilita por medio de puentes disulfuro la unión de las distintas unidades (Álvarez-López y col., 2004). Se

encuentra en el suero y es muy eficaz en la activación del complemento.

Aparece antes que las otras clases de anticuerpos después de la inmunización, es la única clase de anticuerpo que produce el feto (Vidal-Gómez, 2006). La forma monomérica de IgM con una secuencia adherida a la membrana es el principal receptor de anticuerpo utilizado por los linfocitos B para reconocer el antígeno (Roitt y col., 2006). Con la unión de tan solo una molécula de IgM a una superficie celular extraña, se provoca un cambio conformacional de la región Fc de la Ig, que permite la interacción de C1q con el dominio CH3. Esta unión desencadena la cascada del complemento que tiene como resultado la lisis de la célula en cuestión (Álvarez-López y col., 2004).

Cuando un anticuerpo ha neutralizado al patógeno, las fracciones Fc son reconocidas por los receptores Fc de células específicas, para que de este modo, sean eliminados.

Receptores Fc

Los receptores Fc (FcR) son glicoproteínas transmembranales (Nimmerjahn y Ravetch, 2008). Son característicamente complejos proteicos multicadenarios que incluyen componentes de señalización y componentes de unión a Ig. Es un receptor de la superficie celular específico para la región constante carboxi-terminal de una molécula de Ig. La interacción anticuerpo/receptor Fc es específica del isotipo de inmunoglobulina (Parham, 2005).

Los FcR activan, regulan y modulan la Inmunidad, y cuentan con actividad dual, liberando señales tanto inhibitorias como activadoras (Hogarth y Pierteresz, 2012). El sistema inmune los utiliza para dos propósitos principales: el primero, hacer llegar los anticuerpos a sitios a los que no llegarían por la circulación de la sangre y la linfa; y, el segundo, reunir a los patógenos o a sus antígenos, que han sido capturados por el anticuerpo específico, con las células efectoras que responderán en formas que eliminarán la infección (Parham, 2005).

Después del reconocimiento del anticuerpo los receptores Fc se agregan en la membrana de la célula iniciando con esta agregación las vías de señalamiento que llevan a la activación celular. La activación de los fagocitos es la función más común que se atribuye a los receptores Fc (Tabla 4).

Los neutrófilos y los macrófagos comienzan a ingerir y destruir a los agentes patógenos recubiertos de IgG a través del proceso de fagocitosis (Takai, 2002).

Los leucocitos expresan receptores de superficie celular que se unen específicamente a la región Fc de varios isotipos y subtipos de Ig (Abbas y col., 2008). Se ha reportado que los leucocitos expresan principalmente 3 familias de FcR (Figura 6): FcγR (se une a IgG), FcεR (se une a IgE), y FcαR (se une a IgA) (Hogarth y Pietersz, 2012).

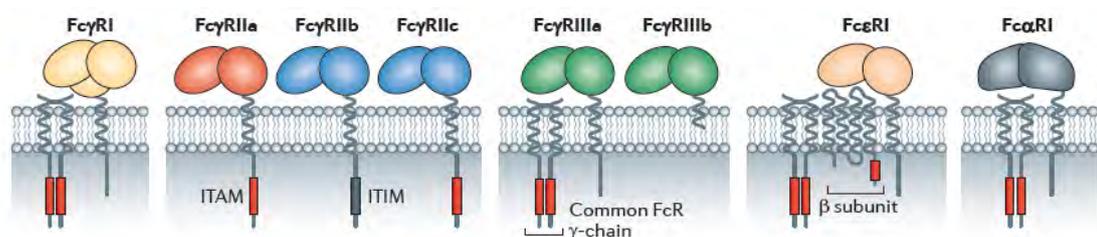


Figura 6.-Representación de Receptores Fc de leucocitos humanos(Hogarth y Pietersz, 2012).

a) FcγR: Es un receptor específico de la superficie celular para la región constante carboxi-terminal de las moléculas de IgG (Abbas y col., 2008). Es la familia más diversa de los FcR e incluye a 3 clases distintas de receptor codificadas en 6 genes: FcγR1a (CD64), FcγR1a (CD32a), FcγR1b (CD32b), FcγR1c (CD32c), FcγR1IIa (CD16a) y FcγR1IIb (CD16b) (Hogarth y Pietersz, 2012). Esta familia de receptores difiere en su estructura, distribución celular y afinidad hacia los IgG. Son expresados por la mayoría de las células hematopoyéticas, incluyendo a los fagocitos, linfocitos y plaquetas (Qin y col., 2004).

Ayuda a la presentación de antígenos, maduración mediada por el complejo inmune de células dendríticas, activación de células B, citotoxicidad mediada por anticuerpos, endocitosis y fagocitosis del complejo inmune y producción de citocinas (Qin y col., 2004; Nimmerjahn y Ravetch, 2008). No solo controlan la activación del Sistema Inmune innato, también están involucradas en regular la producción y especificidad de otros ligados anticuerpos (Nimmerjahn y Ravetch, 2008).

-
- FcγRI: Es un receptor de alta afinidad, a diferencia de los demás miembros de la familia, cuenta con un tercer dominio haciéndolo más específico a la unión con la fracción Fc y los anticuerpos de tipo IgG1 e IgG3 (Hogarth y Piertersz, 2012). FcγRI presenta una cadena α, que une a los anticuerpos IgG, asociada a un dímero de cadenas gamma (también llamadas cadenas FcRγ), cada cadena γ contiene residuos de tirosina que son fosforilados al activarse el receptor (Mora y Rosales, 2009).

Puede iniciar diferentes funciones celulares, entre ellas citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), recepción de antígenos e inducción a presentación de antígenos. Es expresado en neutrófilos polimorfonucleados, macrófagos, basófilos y mastocitos (Hogarth y Piertersz, 2012), células dendríticas foliculares (FDC), células endoteliales, células microgliales, osteoclastos y células mesangiales (Nimmerjahn y Ravetch, 2008).

Su expresión puede ser inducida por GM-CSF e IFN-γ (Hogarth y Piertersz, 2012). La transcripción del gen de FcγRI con IFN-γ activa a los macrófagos y, por esta razón, los macrófagos activados expresan concentraciones más altas de receptores que los monocitos en reposo (Abbas y col., 2008).

- FcγRII: Es una molécula con una cadena que contiene al motivo de inhibición del inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplasmático (Takai, 2002). Las isoformas del FcγRII se distribuyen de forma diferente en varios leucocitos. El FcγRIIa se encuentra principalmente en células fagocíticas (neutrófilos, monocitos y macrófagos), mientras que el FcγRIIb se expresa en muchos tipos de células incluyendo fagocitos, linfocitos, células cebadas y células dendríticas. La cadena α del FcγRIIa contiene un ITAM (motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina) en su porción citoplásmica, mientras que la cadena α del FcγRIIb tiene, en su parte citoplásmica, una secuencia diferente que también contiene tirosinas (ITIM), la cual inicia señales inhibitorias (Mora y Rosales, 2009), contrarrestando las señales positivas enviadas a los linfocitos B por el entrecruzamiento inducido por antígenos de las Ig de membrana. Por tanto, la agrupación de FcγRIIb, inducida por la ocupación con IgG1 o IgG3 polivalentes, puede detener la activación del linfocito B (Abbas y col., 2008).

Este tipo de receptores se unen a IgG principalmente cuando el anticuerpo forma parte de inmunocomplejos o se encuentra sobre microorganismos, o células opsonizadas, que muestran agrupaciones de regiones Fc (Abbas y col., 2008).

-
- FcγRIII: La porción extracelular de unión al ligando de FcγRIII es similar a FcγRII en estructura afinidad y especificidad por IgG (Abbas y col., 2008). El FcγRIII tiene dos isoformas: FcγRIIIa y FcγRIIIb (Mora y Rosales, 2009). El FcγRIIIa es una proteína transmembranal expresada principalmente por linfocitos NK (Abbas y col., 2008), está formado por una cadena α que une IgG y por un homodímero de cadenas γ que contienen cada una un ITAM (Mora y Rosales, 2009). FcγRIIIa, al igual que FcγRI, no contiene a ITAM *per se* pero forma de manera independiente complejos de receptores multisubunitarios, a través de su asociación no covalente con un dímero disulfuro (la cadena- γ “común” de los FcR), en donde se encuentra a ITAM dentro de la cola intracelular de cada cadena del dímero. Es asociado a homodímeros de la cadena gamma del FcR, homodímeros de la cadena δ de los TCR o heterodímeros compuestos por la cadena γ y δ del FcR (Abbas y col., 2008; Mora y Rosales, 2009; Hogarth y Pietersz, 2012).
 - FcγRIIIb es un receptor sin porción citoplásmica unido a la membrana por un enlace glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Mora y Rosales, 2009), es expresado únicamente en los neutrófilos, no media la fagocitosis ni desencadena la activación de los neutrófilos (Abbas y col., 2008).

Se ha reportado que IgG1, IgG3 e IgG4 tiene una alta afinidad, en el rango nanomolar, con los receptores de tipo FcγRI y γ que la unión monomérica de los IgG con este receptor es fácilmente detectable mediante citometría de flujo. IgG1 e IgG3 se unen a todos los FcγR, sus afinidades están en el rango nanomolar para FcγRI y en el rango submicromolar para FcγRIIb (Figura 7) (Cassard y col., 2006; Nimmerjahn y Ravetch, 2007; Hogarth y Pietersz, 2012).

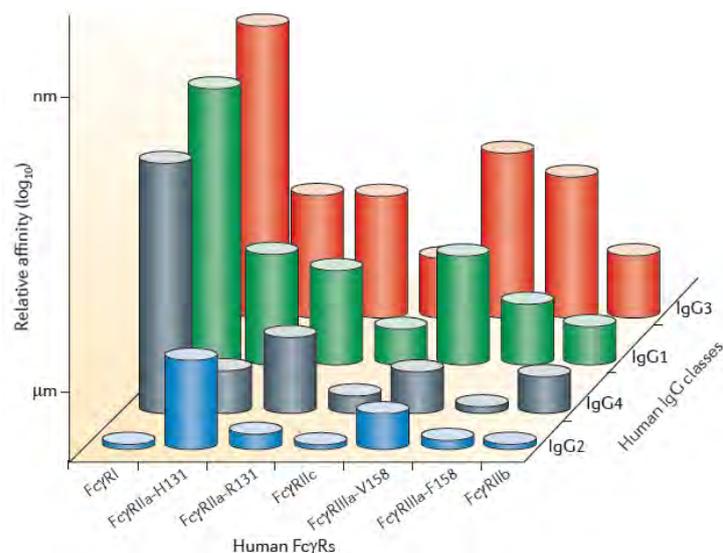


Figura 7: Representación gráfica de las diferencias relativas en afinidad entre las subclases de IgG por los receptores Fc γ (Hogarth y Pietersz, 2012).

b) Fc ϵ R: Dos tipos de receptores Fc ϵ R se han descrito: el receptor de alta afinidad Fc ϵ RI y el receptor baja afinidad Fc ϵ RII (CD23) (Mora y Rosales, 2009).

- Fc ϵ RI: Es un receptor de IgE expresado principalmente por los mastocitos y basófilos (Abbas y col., 2008). La molécula del receptor consta de cuatro polipéptidos separados en tres subunidades: cadena α , cadena β y dos cadenas idénticas entre sí denominadas γ . Mientras que la cadena α contiene el sitio de unión a IgE, las cadenas β y γ , son las estructura responsables de la activación celular que se produce tras el reconocimiento del antígeno, sugiriendo que después del reconocimiento antigénico, estas cadenas están implicadas en la transducción de señales (Álvarez-López y col., 2004).

Debido a su distribución este receptor tiene un papel central en el control de las respuestas alérgicas. Se expresa también en células presentadoras de antígeno y regula la producción de citocinas importantes que controlan la inflamación (Mora y Rosales, 2009).

- Fc ϵ RII: El receptor de baja afinidad a IgE es una lectina tipo C que tiene múltiples funciones como receptor soluble o receptor unido a la membrana celular (Mora y Rosales, 2009). Se considera una proteína de membrana integral tipo II, debido a su segmento aminoterminal de localización intracitoplasmática, hecho que representa una característica

diferencial con el resto de receptores Fc, cuyo extremo intracitoplasmático es C-terminal (Álvarez-López y col., 2004).

Controla el crecimiento y la diferenciación de células B y bloquea la unión de IgE a los eosinófilos, los monocitos y los basófilos (Mora y Rosales, 2009).

Existe en dos formas: FcεRIa se expresa constitucionalmente en los linfocitos B y FcεRIb que se induce por IL-4 en linfocitos T, células de Langerhans, monocitos, macrófagos y eosinófilos. Ambas median la endocitosis de las partículas recubiertas por IgE (Abbas y col. 2008).

FcαR: Es un receptor de IgA expresado en neutrófilos, monocitos y eosinófilos. Su cadena alfa de unión a los ligandos se asocia a un homodímero de cadenas γ y del FcR (Abbas y col. 2008). Se han reportado dos tipos de este receptor: Fcα/μR y el receptor Fc mieloide específico para IgA (FcαRI) (Mora y Rosales, 2009; Takai, 2002).

- Fcα/μR: Es una proteína transmembranal tipo I que tiene solamente una región tipo Ig en su parte extracelular y une débilmente IgA, pero se une a IgM con mayor afinidad (Mora y Rosales, 2009). Se ha propuesto que está involucrado en las etapas tempranas de la respuesta inmune hacia microorganismos (Takai, 2002).
- FcαRI: Este receptor presenta una alta afinidad por IgA y tiene dos regiones tipo Ig en su parte extracelular, además se asocia con un dímero de cadenas γ. El FcαRI se encuentra en la superficie de neutrófilos, eosinófilos, monocitos, algunos macrófagos (incluyendo células Kupffer) y algunas células dendríticas. El FcαRI es responsable de activar respuestas celulares dependientes de IgA como el estallido respiratorio, la degranulación y la fagocitosis por granulocitos, monocitos y macrófagos. En células dendríticas, participa en la presentación de antígenos (Mora y Rosales, 2009).

FcR	Afinidad por la inmunoglobulina	Distribución celular	Función
FcγRI (CD64)	Alta ($K_d < 10^{-9}$ M); se une a la IgG1 y la IgG3, puede unirse a IgG monomérica	Macrófagos, neutrófilos y eosinófilos	Fagocitosis; activación de fagocitos
FcγRIIA (CD32)	Baja ($K_d > 10^{-7}$ M)	Macrófagos, neutrófilos eosinófilos y plaquetas	Fagocitosis; activación celular ineficiente
FcγRIIB (CD32)	Baja ($K_d > 10^{-7}$ M)	Linfocitos B	Inhibición por retroalimentación de los linfocitos B
FcγRIIC (CD32)	Baja ($K_d > 10^{-7}$ M)	Macrófagos neutrófilos linfocitos NK	Fagocitosis; activación celular
FcγRIIIA (CD16)	Baja ($K_d > 10^{-6}$ M)	Linfocitos NK	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
FcγRIIIB (CD16)	Baja ($K_d > 10^{-6}$ M)	Neutrófilos	Fagocitosis ineficiente
FcεRI	Alta ($K_d < 10^{-10}$ M); se une a la IgE monomérica	Mastocitos, basófilos eosinófilos	Activación celular
FcεRII (CD23)	Baja ($K_d > 10^{-7}$ M)	Linfocitos B, eosinófilos, células de Langerhans	Desconocida
FcαR (CD89)	Baja ($K_d > 10^{-6}$ M)	Neutrófilos, eosinófilos, monocitos	Desconocida

Tabla4.- Funciones y características de los diferentes receptores Fc.

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

FcRn

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

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

La mórula compuesta por una masa celular externa y una masa celular interna dará origen al embrión y al trofoblasto respectivamente. El trofoblasto dará origen a la parte fetal de la placenta y se diferencia en una capa interna de células mononucleadas, el citotrofoblasto y una masa celular externa; el sincitiotrofoblasto.

Los anticuerpos maternos atraviesan la membrana placentaria como excepción del resto de las sustancias proteicas, por endocitosis mediada por FcRn que se localizan en el sincitiotrofoblasto. Los FcRn cumplen su función en el intestino de neonatos captando IgG de la leche materna para trasladarlas al feto. También se ha reportado que estos receptores están involucrados en la protección de IgG del catabolismo (Figura 8) (Chaudury ,2003).

La expresión de FcRn ha sido reportada en diferentes tejidos sanos como pulmón, riñón, cerebro, así como en células intestinales de neonatos y en algunos tipos de cáncer (colon, mama, ovario, colorectal, leucemia monocítica aguda) (Tymothy 2010).

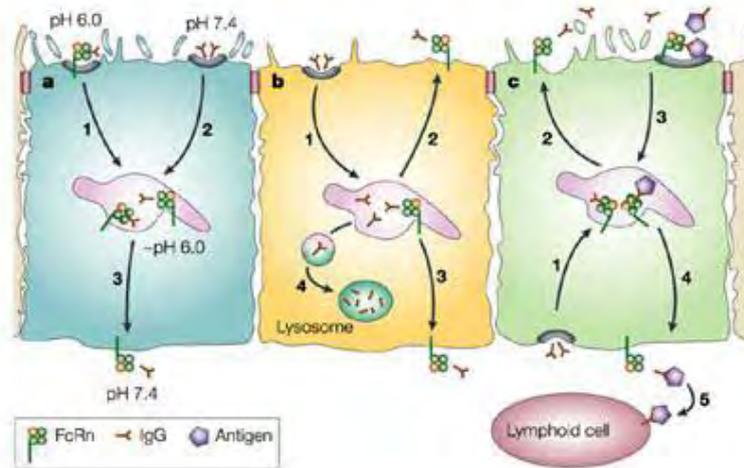


Fig.8.- Funciones de FcRn (a) **Transporte a través de membrana de IgG.** A un pH ácido (6- 6.5) las IgG se unen con los FcRn en la membrana celular, cuando el pH es neutral (7- 7.4) las IgG son internalizadas por endocitosis uniéndose a FcRn en compartimentos intracelulares de pH ácido. El complejo IgG-FcRn va ser transportado hasta la superficie basolateral donde el pH vuelve a ser básico, permitiendo así la liberación del anticuerpo. (b) **Control de la homeostasis de IgG.** Cuando ocurre la endocitosis de IgG por células epiteliales, se da una interacción en los endosomas con FcRn, lo cual evita la degradación de IgG reciclando anticuerpos con la posterior liberación al torrente sanguíneo, o bien promoviendo el transporte hacia la superficie basolateral. Se ha detectado que IgG que no se unen a FcRn activan una vía de degradación en lisosomas. (c) **Papel del complejo IgG-FcRn en el sistema inmune y tolerancia.** IgG endocitadas por células epiteliales provenientes de la superficie basolateral interactúan con FcRn para su liberación en el polo apical, de la misma forma, IgG unidas a algún antígeno pueden utilizar el transporte mediado por FcRn y activar células del sistema inmune o tolerancia. Tomada de Rojas y Apodaca (2002).

A pesar de los avances conseguidos en el tratamiento del cáncer por la introducción de nuevos agentes quimioterápicos y la optimización de sus combinaciones, los resultados tanto en la enfermedad localmente avanzada como en la enfermedad metastásica siguen siendo modestos. Sin embargo, el progresivo conocimiento de los mecanismos moleculares de las células neoplásicas ha permitido desarrollar fármacos destinados a bloquear la acción de diferentes proteínas comprometidas en vías de señalización críticas para el crecimiento y división celular.

Aún existen muchas vías moleculares involucradas en el desarrollo tumoral que no han sido descritas detalladamente y que se encuentran bajo constante investigación con fines terapéuticos.

Uno de los ejemplos mejor estudiados en inmunoterapia es el efecto de las citocinas sobre el desarrollo tumoral.

Citocinas

Las citocinas son polipéptidos o glicoproteínas, hidrosolubles, que varían en peso dentro del rango de los 8 y 30 kDa. Dentro de este nombre se agrupan: interleucinas, quimiocinas, interferones, factores estimuladores de colonias, factores de crecimiento y factores de necrosis tumoral (Barros, 2011). Estas moléculas resultan de gran interés por su capacidad de regular la respuesta inmune a través de los procesos de atracción, activación, proliferación y diferenciación de leucocitos. También, ciertas citocinas, poseen otras funciones fuera del campo inmunológico como en la embriogénesis y la diferenciación celular, entre otras.

Las citocinas se unen a receptores específicos que se encuentran en la membrana de las células blanco, iniciando una cascada de transducción intracelular que alteran el patrón de expresión génica, provocando una determinada respuesta biológica (Roitt, 1998).

Dentro de la clasificación de citocinas el subgrupo de las interleucinas ha sido ampliamente estudiado por su gran potencial en el desarrollo de terapias eficaces contra el cáncer, un ejemplo es la Interleucina2 (IL-2).

Antecedentes

En 1976 en los laboratorios del National Cancer Institute fue descubierto el Factor de Crecimiento de Células T (TCGF), que fue renombrado en el Segundo Taller Internacional de Linfocinas en Suiza 1979 como Interleucina-2 (IL-2).

La IL-2 es una proteína de 15 kDa, producida principalmente por células T-CD4⁺, y en una menor cantidad, por células T-CD8⁺. Actúa por medio de las subunidades de receptor para IL-2 (IL-2R α , IL-2R β y IL-2R γ), usando la vía intracelular JAK/STAT (Familia Janus de tirosinocinasas / factores de transcripción) para estimular el crecimiento y la proliferación de linfocitos T y células B. También, induce a la producción de otras citocinas, como, por ejemplo, IFN γ y FNT β , lo que resulta en la activación de monocitos, neutrófilos y células NK. Promueve la actividad citotóxica mediada por linfocitos T y células NK contribuyendo así a la generación y la propagación de las respuestas inmunológicas específicas del antígeno (Raeburn, 2002). La IL-2 recombinante es una de las citocinas empleadas en la inmunoterapia contra tumores sólidos, dada su capacidad de activar algunos sistemas citotóxicos antitumorales del huésped. La terapia con IL-2 recombinante se inició en 1984, basada en su papel como factor de crecimiento de linfocitos.

El grupo de trabajo del laboratorio de Oncología Celular de la FES-Zaragoza, demostró la presencia de las cadenas alfa, beta y gamma de RIL-2 en las líneas celulares CaCu, CALO e INBL. Además, se ha reportado un efecto dual de IL-2 sobre la proliferación *in vitro* en dichas líneas celulares de manera dosis dependiente, en donde 100 UI/mL inhibe la proliferación mientras que 10UI/mL la promueven (Rangel, 1995)

Lo antes mencionado abre una nueva línea de investigación para identificar el papel que juegan los FcRn en el desarrollo tumoral, tomando en cuenta que las funciones descritas para el FcRn podrían conferir a la células tumorales mecanismos para evadir el reconocimiento de las células inmunológicas.

La eliminación de células tumorales por activación de complemento mediada por anticuerpos, sólo ocurre cuando se satisfacen dos condiciones: 1) los anticuerpos deben tener libre acceso a las células neoplásicas y 2) tales células deben poseer los antígenos específicos adecuadamente expuestos en su superficie. Estas dos condiciones se cumplen en forma ideal en las leucemias experimentales producidas por virus. En cambio, los anticuerpos dirigidos en contra de antígenos tumorales presentes en la superficie de células de neoplasias epiteliales sólidas que no circulan, o que poseen nula o baja densidad de antígenos, tienen poco o ningún efecto en la viabilidad o el crecimiento de la neoplasia.

Finalmente, los anticuerpos son inefectivos cuando se supera una cierta dosis crítica de células neoplásicas (Carga tumoral). La competencia de antígeno-IgG entonces podría verse disminuida por la internalización de IgG por acción de FcRn. Por lo que es importante determinar la presencia de este tipo de receptor en diferentes tipos celulares.

Justificación

Alrededor de 3500 mujeres mueren anualmente en nuestro país debido al CaCu situándose como la segunda causa de muerte por tumores malignos en mujeres. Esta situación presenta a la erradicación del CaCu como una necesidad social prioritaria.

Numerosos grupos de científicos trabajan en esclarecer los mecanismos moleculares que utilizan las células tumorales para su crecimiento y división, así como aquellos mecanismos relacionados con la ineficiencia del sistema inmune para la erradicación de este mal. Identificar dichos procesos enmarca el primer paso en el diseño de una terapia eficiente.

Debido a las funciones específicas que presentan los FcRn, su expresión puede significar una ventaja en el desarrollo tumoral mediante la evasión del sistema inmunológico; dicha expresión se ha reportado en algunos tipos de cáncer como carcinoma de corion, mama, ovario, colorectal y algunas leucemias, por lo cual es indispensable caracterizar la vía molecular y el rol que juega el FcRn en las células tumorales y el desarrollo de la enfermedad.

Hipótesis

Los FcRn son proteínas transportadoras de IgG que se han reportado en células de carcinoma ductal, lobulillar y coriónico. Dado que las líneas celulares de CaCu CALO e INBL también tienen un origen epitelial, se espera encontrar expresión de RNAm para el gen FcRn en ambas líneas celulares.

Objetivo

Determinar si existe expresión de mRNA para FcRn en las líneas de carcinoma de Cérnix CALO e INBL.

Objetivos Particulares

- Obtener cultivos de las líneas celulares de CaCu CALO e INBL.
- Cultivar ambas líneas en presencia de 100UI/mL de IL-2 a 24, 48 y 72 hrs.
- Analizar los productos de amplificación para el primer específico de FcRn.

Materiales y Métodos

Material Biológico

Las líneas celulares utilizadas en este proyecto fueron CALO e INBL (Tabla-5); ambas líneas derivadas de carcinoma de cérvix, las cuales fueron obtenidas del material criopreservado perteneciente a la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC) de la Facultad de estudios Superiores Zaragoza.

Línea celular	Estadio clínico	HPV	Características
CALO	II B	18	Carcinoma de origen epidermoide de células grandes no queratinizadas. No metastásico.
INBL	IV B	18	Carcinoma de origen epidermoide de células grandes no queratinizadas. Metastásico.

Tabla 5.- Características de las líneas celulares CALO e INBL.

Cultivo Celular

Las líneas Celulares, CALO e INBL, se cultivaron en medio de cultivo RPMI-1640^(MICROLAB), suplementado con 10% de SFB (Suero Fetal Bovino) ^(GIBCO), previamente desactivado, en cajas Petri de 25 cm³. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora ^(FORM SCIENTIFIC, USA) a 37°C, con un pH de 7.0-7.2 y con una atmosfera húmeda saturante al 5% de CO₂.

El número inicial de células para cada ensayo fue de 1.x10⁶ de las líneas celulares, CALO e INBL, las cuales se cultivaron en presencia y ausencia de IL-2 recombinante humana, los cultivos se mantuvieron, durante diferentes tiempos: 24, 48 y 72 hrs. (tiempos propuestos para realizar comparación con cinéticas de proliferación en ausencia y presencia de IL-2) para posteriormente realizar la extracción de RNA total.

Extracción de ARN Total

Transcurridos los tiempos de cultivo con y sin tratamiento, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos, eliminando el sobrenadante para después realizar la extracción del RNA mediante el uso de la solución TRIzol™ (INVITROGEN) de isotiocianato de guanina. El botón celular se homogenizó en 1mL de la solución de TRIzol™ dejándose reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente, para favorecer la disociación de los complejos de nucleoproteínas. Transcurrido el tiempo, se añadió 200 µL de cloroformo a los tubos Eppendorf de 1.5 mL agitando vigorosamente para formar una emulsión, durante 3 minutos, para posteriormente incubar otros 3 minutos en hielo. Finalizada la incubación, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se recuperó la fase acuosa, la cual contiene el RNA total.

Esta fase se mezcló con 500 µL de isopropanol, con el fin de precipitar el RNA, incubándose durante 24h a -70 °C, para luego centrifugar las muestras a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C, el sobrenadante se desechó, y el botón obtenido se lavó con 1mL de etanol frío al 70%, asegurándose de que se mezcle perfectamente bien, enseguida se centrifugó a 7500 rpm durante 10 minutos a 4°C dejando evaporar el etanol durante 1h y media.

El precipitado obtenido se resuspendió con agua libre de RNAsas conservando el stock a -70 °C.

Cuantificación de RNA

La concentración de RNA se determinó en un biofotómetro, para normalizar las muestras e igualar concentraciones. Para ello se realizó una dilución 1:50 tomando 4 µL del stock de la muestra y resuspendiendo en 196 µL de agua inyectable, esto se colocó en una celda para determinar las concentraciones de RNA (µg/mL) haciendo la lectura en el biofotómetro a una absorbancia de 260nm, relacionándola con la absorbancia de 280nm para obtener un valor que nos permitió inferir su estado de pureza.

Para un grado de pureza óptimo e indicativo de no degradación de RNA se toma el valor de 260/280nm superior a 1.5 e inferior a 2.0. Se aplicó la relación existente para la cuantificación espectrofotométrica de ácidos nucleicos, en este caso RNA, de 1 unidad de densidad óptica equivalente a 40 µg/mL. Para obtener la concentración de RNA se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia 260 (Volumen de disolución) (40)}_{1000}}{1000} = 1 \mu\text{g} / \mu\text{L}$$

En donde:

- Absorbancia 260: Lectura dada por cada muestra en el biofotómetro
- Volumen de disolución: Se utiliza una dilución 1:50 (4 μL de muestra más 196 μL de agua inyectable) en un volumen de 200 μL .
- 40: Unidad de densidad óptica (1 UDO) equivale a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del biofotómetro.

Retrotranscripción (RT)

La concentración de RNA utilizado para la técnica es de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para cada una de las muestras, para lo cual, se utilizó un kit de RT en el que se establecieron las siguientes condiciones para cada reacción (1Rx), el cual se multiplica por el número de muestras (células cultivadas en presencia y ausencia de IL-2).

Para ello se utilizaron los siguientes reactivos para (1Rx): 4 μL de Amortiguador 5x el cual contiene DTT (PROMEGA), 1.5 μL de dNTP's (Desoxirribonucleótidos trifosfato) (INVITROGEN) 10 Mm, 1 μL de Enzima MMLVRT (PROMEGA), 2 μL de Oligo dt (PROMEGA), 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Muestra, Agua libre RNAsas (FERMENTAS), llegando a un volumen total de 25 μL .

Toda la manipulación de reactivos y muestras se realizó en hielo resuspendiendo para la incorporación de cada uno de los reactivos.

Las reacciones se colocaron en un termociclador (EPPENDORF ESTANDAR) el cual será programado a 42 °C durante 1 hora. El DNAC obtenido se conservó a -70°C.

Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Con los DNAC obtenidos de la RT se llevó a cabo la PCR utilizando 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, las condiciones para (1Rx) se establecen utilizando un kit de PCR GoTaq Polimerasa, las cuales se multiplicaron por el número de muestras (células cultivadas en presencia y ausencia de IL-2). Para su realización se usaron los siguientes reactivos: 5x Green que contiene MgCl_2 (PROMEGA) (6 μL), dNTP's (INVITROGEN) 10

Mm (0.8 μL), Primer 1 (UNIPARS, S.A.) (Sentido) (1 μL), Primer 2 (UNIPARS, S.A.) (Antisentido) (1 μL) (Tabla 6), GoTaq Polimerasa (PROMEGA) (0.15 μL), Muestra DNAC (4 μL), Agua libre RNAsas (FERMENTAS) (7.05 μL), llegando a un volumen

total de 20 μ L. Toda la manipulación de reactivos y muestras se realizó en hielo y resuspendiendo para la incorporación de cada uno de los reactivos.

El protocolo que se utilizó consistió en:

- I. Fase de desnaturalización del DNA: 94 °C durante 6 min.
- II. Fase de alineamiento del DNA: 54 °C durante 2 min.
- III. Fase de extensión del DNA: 72 °C durante 2 min.
- IV. Fase de disociación: 94 °C durante 45 seg.
- V. 30 ciclos de repetición del paso 2 al 4.
- VI. Fase de alineamiento del DNA: 54°C durante 2 min.
- VII. Fase de extensión del DNA: 72 °C durante 7 .min
- VIII. Fase de estabilización: 20 °C durante 30 min.

Gen	Secuencia del primer (5'-3')	Pares de bases (pb)
β-actina	Sentido: gggtcagaaggattcctatg Antisentido: ggtctcaaacatgatctggg	234
FcRn	Sentido ggaggagctctgttgaggag Antisentido gctcagagatgccagtgt	241

Tabla 6 .- Secuencia sentido y antisentido, del primer a utilizar para la detección del gen de interés(FcRn) así como β - actina como control interno de la técnica

Electroforesis

En la electroforesis existe un movimiento de partículas cargadas en un campo eléctrico, los ácidos nucleicos están cargados de forma negativa debido a su esqueleto de grupos fosfato, por lo tanto migraran hacia el ánodo. La electroforesis de ácidos nucleídos es el método habitual para separar, identificar y purificar moléculas o fragmentos de DNA y RNA en función de su tamaño y movilidad.

Para visualizar la expresión del producto obtenido de la PCR de cada una de las muestras se realizó una electroforesis con 4 μ L del producto amplificado en un gel de agarosa al 1.5%. Para la preparación del gel de

agarosa, se pesaron 1.5 g de agarosa la cual se diluyó con 100 mL de TBE 1X en un matraz de 150 mL.

Para tener un mejor homogenizado la dilución se calentó a 50°C durante 4 minutos aproximadamente. Después de montar la cámara de electroforesis se procedió a verter la dilución de agarosa más 6 µL de bromuro de etidio en la cámara de electroforesis, inmediatamente se colocó un peine con 12 pozos.

Terminado el tiempo de polimerización de la agarosa (25´ aproximadamente) se procedió a retirar el peine y montar la cámara para la corrida electroforética, en el cual se colocó 1L de buffer de corrida (TBE 0.5X).

Posteriormente se colocaron 4 µL de muestra en los pozos al igual que 2 µL de escalera de pares de bases, Gene Ruler, más 2 µL de buffer de carga. El tiempo de corrida fue de 1 hr a 80 volts.

Para la visualización de los ácidos nucleicos se utilizó un colorante fluorescente, bromuro de etidio, el cual tiene la propiedad de intercalarse entre las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos y aumentar en esas condiciones su fluorescencia, de modo que emite luz visible (color naranja) cuando es excitado por radiación ultravioleta (300nm) de un transluminador ^(UVP, USA).

De este modo se visualizó el producto de amplificación (cDNA) y la identificación de los productos de interés, que para este caso es el mRNA del *FcRn*, por sus tamaños en pares de bases en relación al recorrido de cada banda con el marcador o escalera de peso molecular (Gene Ruler™), así como la identificación del RNA total en sus subunidades 28S y 18S.

Cabe señalar que los ensayos antes mencionados se realizaron tanto para las células cultivadas en ausencia, que sirven como controles del experimento, y células cultivadas en presencia de IL-2 recombinante humana que es el tratamiento del experimento.

RESULTADOS

En la investigación molecular una de las técnicas más utilizadas para evaluar la regulación génica es la de RT-PCR. Esta técnica nos permite amplificar secuencias de ADN complementario (ADNc) obtenido por retrotranscripción utilizando como molde RNAm.

En este estudio se utilizó dicha técnica para analizar el efecto de IL-2 sobre la expresión de RNAm para el gen FcRn.

Los FcRn son las moléculas encargadas del transporte de inmunoglobulinas de tipo G a través de las células permitiendo así importantes procesos fisiológicos como la inmunidad pasiva transfiriendo anticuerpos de los capilares de la madre al feto a través de la placenta o bien captando IgG directamente de la leche materna al pasar por el intestino en neonatos, también juegan un papel clave en la vida media de las IgG's protegiéndolas de su degradación en las respuestas adaptativas humorales.

Se ha descrito que FcRn está involucrado en la eficacia del sistema inmune facilitando la interacción de IgG's con células fagocíticas. Las IgG's unidas a algún antígeno son capaces de utilizar el transporte mediado por FcRn y activar células del sistema inmune.

Este tipo de receptor ha sido reportado en diferentes tipos de cáncer, sus funciones en el desarrollo tumoral no han sido debidamente descritas.

En estudios previos se ha demostrado que 100UI/ml de IL-2 inhiben la proliferación de células de carcinoma de cérvix, es por esto que en el presente trabajo se evaluó la expresión de RNAm para el gen FcRn en las líneas celulares de CaCu CALO e INBL cultivadas en ausencia y presencia de IL-2 a los tiempos de 24, 48 y 72 horas.

Por este motivo se llevó a cabo una extracción de ARN total a los tiempos previamente establecidos y se realizó un gel de electroforesis con los productos de la extracción, con el fin de identificar las subunidades de RNA ribosomal 28s y 18s que son un indicador de integridad en el ARN total obtenido.

En los resultados obtenidos se identificó la presencia en el gel el par de bandas correspondientes a la sub-unidad grande ribosomal (28S) y a la sub-unidad pequeña ribosomal (18S) sin variaciones con respecto al tiempo de cultivo. Es de notar que las extracciones obtenidas de células cultivadas en presencia de IL-2 muestran una mayor cantidad de ARNt y ARNm, concentrado en la parte inferior de las imágenes (Figura 9).

Electroforesis para RNA total

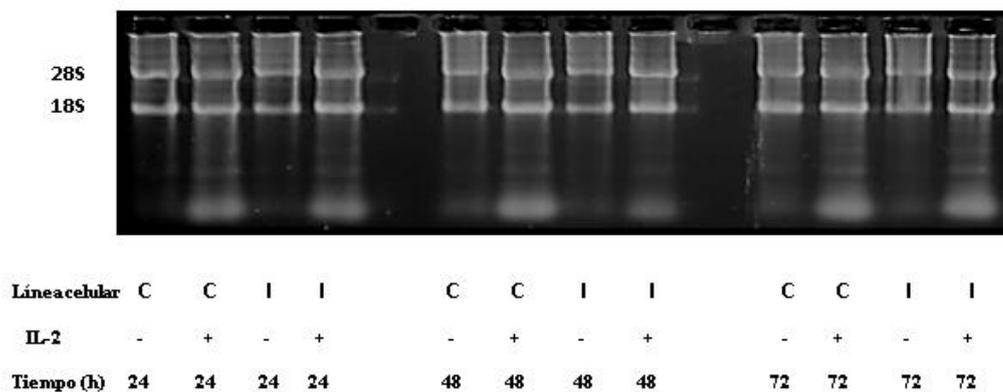


Figura 9.- Integridad del RNA total de las líneas de cáncer de cérvix CALO (C) e INBL (I), cultivadas a 24, 48 y 72 horas en presencia (+) y ausencia (-) de IL-2. Esta imagen se obtuvo con ayuda de un fotodocumentador(UVP Doc-It LS) se muestra una imagen obtenida con filtro negativo.

Una vez confirmada la integridad de RNA en los ensayos realizados para ambas líneas celulares, se realizó una retrotranscripción para obtener ADNc utilizando como molde el ARNm. Con el DNAc obtenido para las diferentes muestras se realizó la amplificación para el gen B-actina y FcRn, en ambas líneas celulares, mediante PCR.

Resultados de RT-PCR

El gen de B-actina es utilizado como control interno de técnica, ya que se trata de una proteína constitutiva de la célula, indispensable para la estructura del citoesqueleto.

Los resultados muestran que la expresión de RNAm para el gen B-actina se mantiene constante a través del tiempo tanto en la línea celular CALO como en INBL, sin cambios en su expresión al cultivar las células con 100 UI/mL de IL-2 (Figura 10).

Productos de amplificación para el gen β -actina

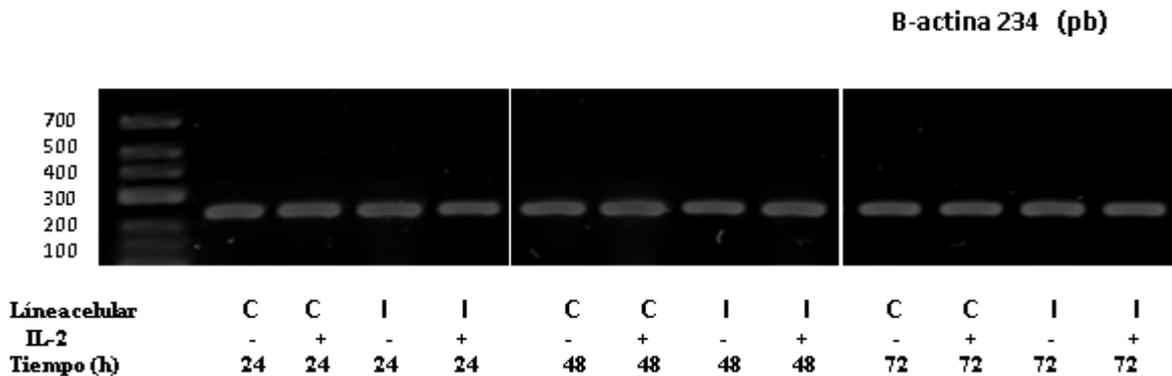


Figura 10.-Productos de amplificación para el gen β -actina (234 pb) en las líneas celulares CALO (C) e INBL (I) cultivadas a diferentes tiempos en presencia (+) o ausencia (-) de IL-2. Imagen con filtro negativo.

Nuestros resultados para el gen de FcRn muestran un efecto diferencial en la transcripción al utilizar 100UI/mL de IL-2. Para la línea CALO se observa una inhibición de la expresión de RNAm desde las 24 horas que continúa disminuyendo conforme el tiempo aumenta. Para la línea celular INBL los resultados muestran una inhibición de la expresión de RNAm en todos los tiempos, siendo el tiempo de 48 horas cuando se observa una inhibición más notoria (Figura 11).

Productos de amplificación para el gen FcRn

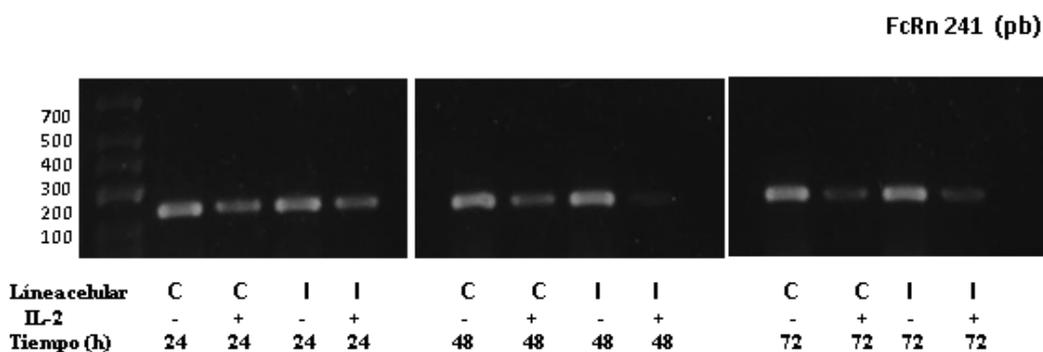


Figura 11.- Productos de amplificación para el gen FcRn (241 pb) en las líneas celulares CALO e INBL cultivadas a diferentes tiempos en presencia (+) o ausencia (-) de IL-2. Imagen con filtro negativo del gel de electroforesis para los productos de amplificación del gen FcRn.

Densitometría

A través, del análisis densitométrico se logró comparar numéricamente el efecto que tiene IL-2 sobre la expresión de RNAm para el gen FcRn en las líneas celulares CALO e INBL a los tiempos de 24, 48 y 72 horas (Tabla 7). En la línea celular CALO cultivada en ausencia de IL-2 se observa un aumento de la masa (ng) de las bandas de los productos de amplificación que es directamente proporcional al tiempo.

Para el caso de las células de la línea CALO cultivadas en presencia de IL-2 observamos una disminución de la masa del producto de amplificación para FcRn, sin depender del tiempo de cultivo. Mientras que en el caso de la línea celular INBL se observa una menor cantidad de masa (ng) para el gen FcRn a las 48 horas. Cabe destacar que cuando las células INBL fueron cultivadas en presencia de IL-2 se aprecia una disminución notable de la masa para el producto de amplificación para FcRn para todos los tiempos.

Etiqueta	Rf	I-Max	I-Vol	Masa[ng]	Corrección de Fondo	Ratio (ng)
C 24-	0.72	136	93038	9.88	0	-1.24
C 24+	0.7	103	67466	8.64	0	
C 48-	0.66	133	84893	10.62	0	-2.89
C 48+	0.64	97	52334	7.73	0	
C 72-	0.63	138	77159	10.94	0	-3.78
C 72+	0.62	79	171072	7.16	0	
I 24-	0.7	136	82510	10.72	0	-3.26
I 24+	0.68	108	58798	7.46	0	
I 48-	0.65	137	84489	11.03	0	-6.36
I 48+	0.64	70	18506	4.67	0	
I 72-	0.62	134	84161	10.88	0	-5.2
I 72+	0.63	71	35791	5.68	0	

Tabla 7.- Valores numéricos proporcionados por el análisis densitométrico de los productos de amplificación para el gen de FcRn. (RF: Línea de referencia, I-Max: Intensidad máxima proporcionada en lumens [Im], I-Vol: Correlación con los valores de volumen de todas las variables, Masa(ng): Cantidad de ácido nucleico presente en la muestra, Corrección de Fondo: Retoque de la fotografía, Ratio(ng): diferencia en nanogramos entre los ensayos estimulados con IL-2 y sus controles.

Con el propósito de tener una mejor representación de los productos obtenidos para FcRn de cada tiempo. Los datos se muestran mediante histogramas. El área bajo la curva indica el efecto diferencial que IL-2 provoca sobre la expresión del gen FcRn para ambas líneas celulares en todos los tiempos

Para el caso de la línea celular CALO se observa que existe un efecto diferencial sobre la expresión de ARNm para el gen FcRn en los ensayos cultivados en presencia de IL-2 a la concentración de 100UI/mL, donde la expresión disminuye conforme avanza el tiempo contrastando con el control de técnica B-actina donde la expresión de RNAm permanece constante en todos los tiempos (Figura 12).

Histogramas de actividad para los genes B- actina y FcRn a través del tiempo en la línea celular CALO mediante análisis densitométrico

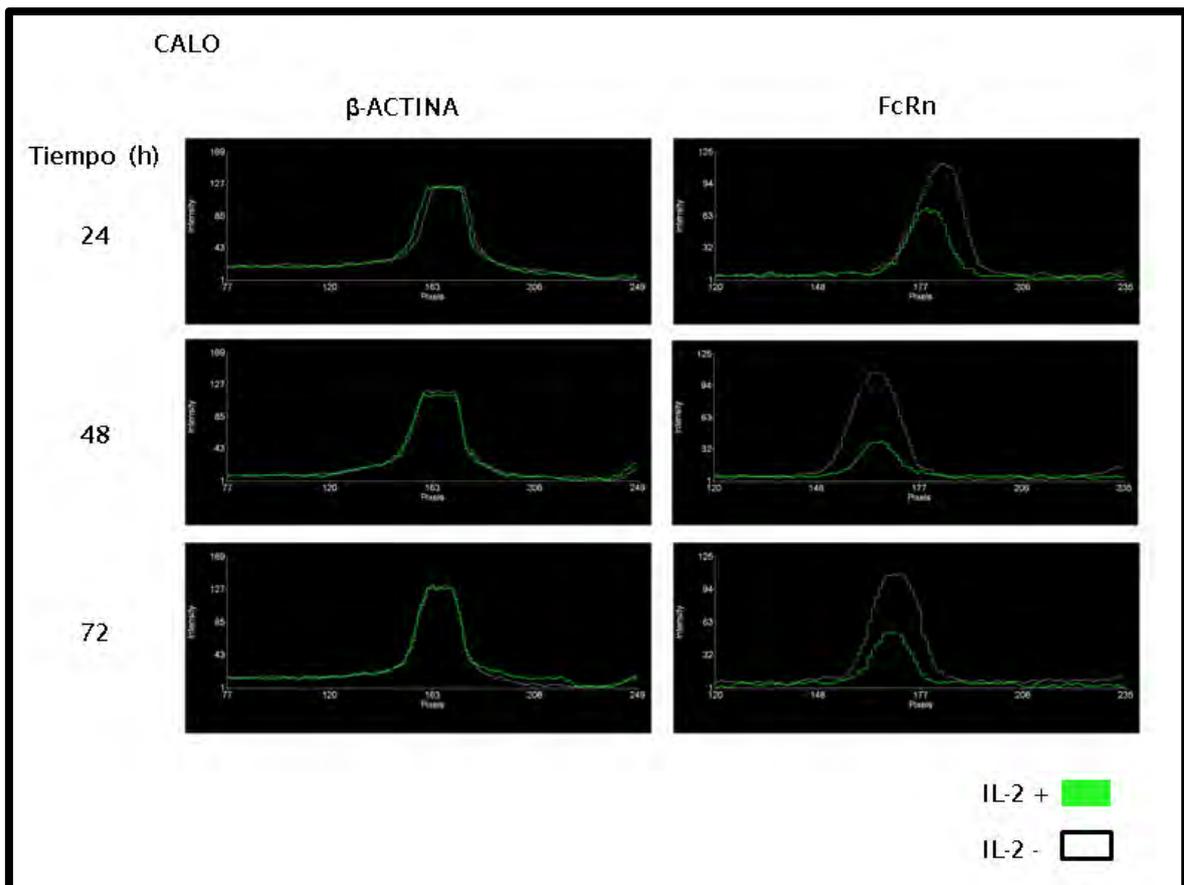


Figura 12.- Comparación de la expresión de los genes β -actina y FcRn en la línea celular CALO mediante histogramas.

Para el caso de la línea celular INBL existe un efecto diferencial sobre la expresión de ARNm para el gen FcRn cuando las células fueron cultivadas en presencia de IL-2 a la concentración de 100UI/mL, se observa que la expresión para el gen FcRn disminuye en todos los casos siendo más representativo al tiempo de 48h, contrastando con el control de técnica β -actina donde la expresión de RNAm permanece constante en todos los tiempos (Figura 13).

Histogramas de actividad para los genes β -actina y FcRn a través del tiempo en la línea celular INBL mediante análisis densitométrico.

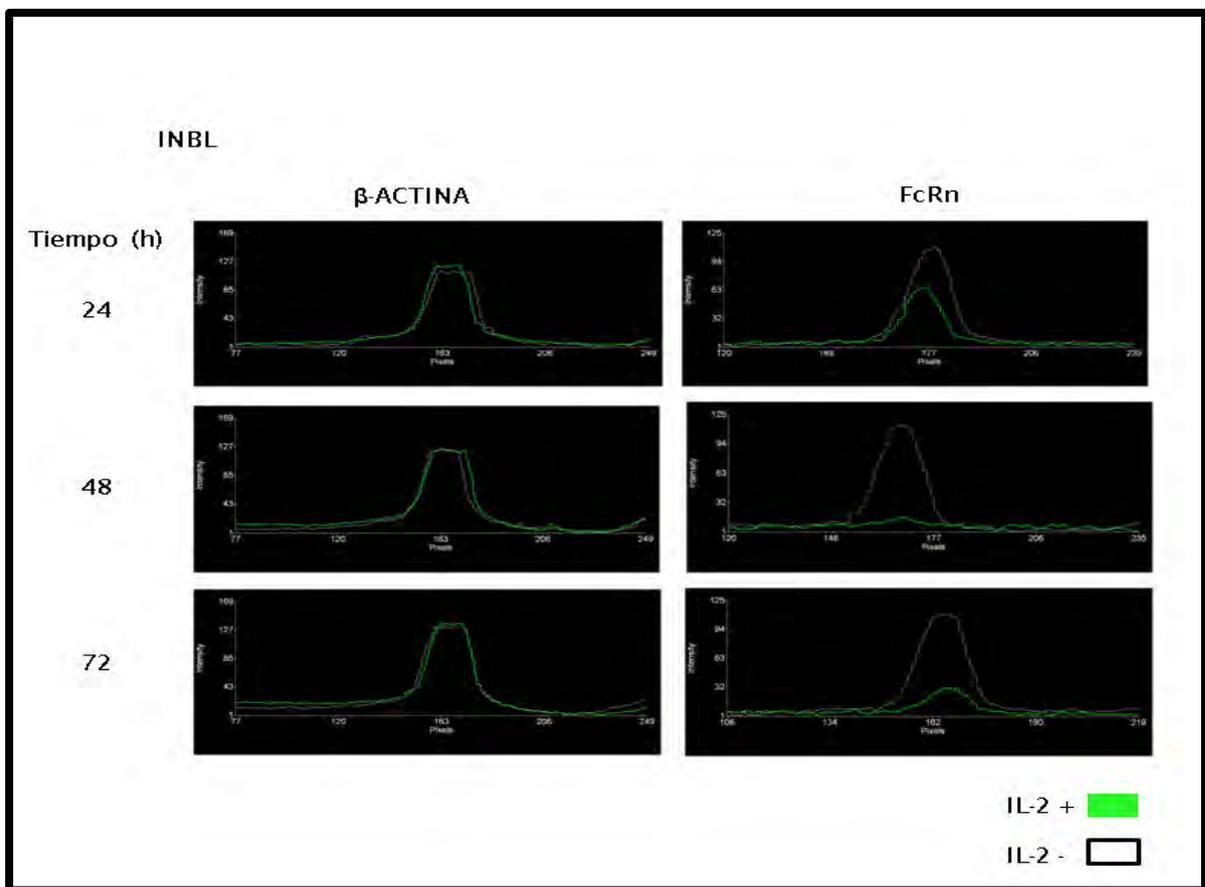


Figura 13.-Comparación de la expresión de los genes β -actina y FcRn en la línea celular INBL mediante histogramas.

El efecto diferencial provocado por IL-2 sobre la expresión de RNAm para el gen FcRn en ambas líneas celulares, disminuye en todos los casos siendo más representativo dicho efecto en la línea celular INBL para todos los tiempos (Figura 14).

Comparación de los histogramas de actividad para el gen FcRn entre la línea celular CALO y la línea celular INBL a través del tiempo

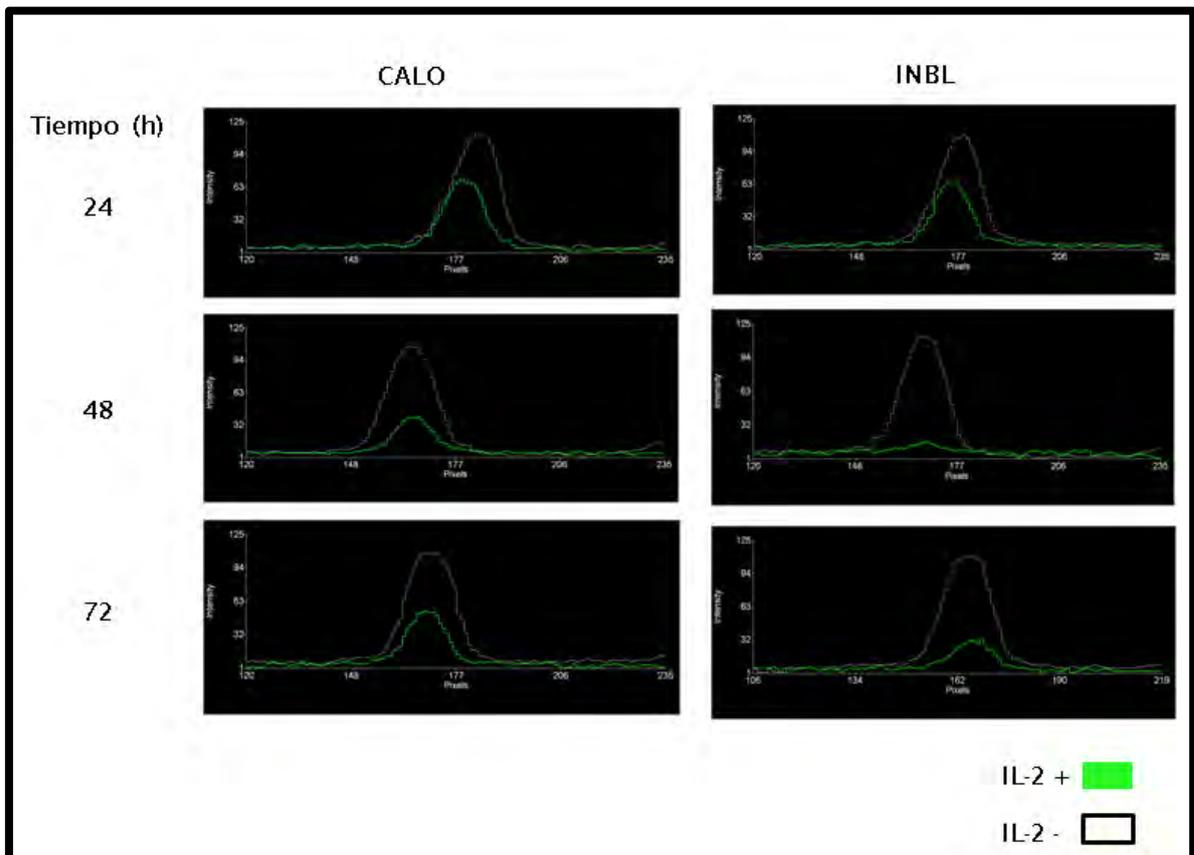


Figura 14. Comparación de la expresión de ARNm para el gen FcRn en las líneas CALO e INBL.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el cáncer es la primera causa de muerte a nivel mundial, el desarrollo de una terapia eficiente para los pacientes con cáncer se ha visto obstaculizado por la extraordinaria complejidad de esta enfermedad y los diversos procesos moleculares que permiten a las células tumorales evadir la detección inmunológica.

Una de las alternativas más prometedoras contra el desarrollo del cáncer es la inmunoterapia que entre sus ventajas busca la erradicación de este mal, a través de tratamientos selectivos que van dirigidos únicamente a las células tumorales a diferencia de los tratamientos actualmente utilizados, que resultan sumamente invasivos o agresivos hacia tejidos sanos, como es el caso de la quimioterapia, la radioterapia o la cirugía

La inmunoterapia es clasificada en dos clases: activa y pasiva. La primera pretende estimular el sistema inmune del paciente para favorecer una respuesta efectiva frente al tumor, mientras que la segunda pretende el control del tumor mediante la administración de mediadores (anticuerpos, células) con capacidad de destrucción celular intrínseca e independiente de la situación del sistema inmune del paciente (Ruiz-Alonso y col., 2004)

La inmunoterapia como opción para el tratamiento del cáncer brinda promisorias esperanzas para cientos de pacientes en todo el mundo; por esta razón muchos laboratorios han enfocado sus estudios en esta alternativa que avanza de manera vertiginosa. En particular los avances alcanzados en el Laboratorio de Oncología Celular de FES-Zaragoza muestran que IL-2 es un excelente agente terapéutico contra el carcinoma de cérvix, ya que no solo actúa directamente sobre las células tumorales sino que también actúa como un potente mediador y activador de las células del sistema inmunológico como: Linfocitos T, células NK, Macrófagos y Linfocitos B. Asimismo, IL-2 se ha empleado como terapia en otros tipos de cánceres, incluyendo Sarcomas, Cáncer de Pulmón, Carcinoma de mama y Linfomas.

En estudios previos se ha descrito que el efecto inhibitorio que IL-2 tiene sobre el desarrollo tumoral, se debe de manera parcial a la capacidad de promover la infiltración de linfocitos T y células NK al sitio del tumor, la presencia de esta citocina favorece la expresión de las subunidades de su receptor (RIL-2) en células del sistema inmunológico, así como en fibroblastos, células endoteliales, y en algunos tipos de tumores sólidos, como en el caso de las líneas celulares empleadas en este estudio (Rocha et al ,2004; Rangel et al, 2010).

Además, se ha reportado que el RIL-2 se expresa de manera funcional en estas líneas celulares de CaCu y que dichas células son capaces de producir y secretar pequeñas cantidades de IL-2, lo que sugiere una dependencia de las células de CaCu por este factor para su proliferación.

A principios del siglo XX Ehrlich sugirió que las células malignas podían ser detectadas y erradicadas por el sistema inmunológico. El principio de la inmunovigilancia sostiene que cuando surgen células aberrantes, son reconocidas y eliminadas por células efectoras. Los fallos en esta respuesta serían la causa de la aparición de un tumor (Manual CTO de medicina y cirugía, 2007).

El crecimiento de un tumor implica que las células malignas consiguen eludir la respuesta inmune frente a ellas o, al menos modularla para que sea menos intensa que la capacidad proliferativa del tumor. Existen varios mecanismos que utilizan las células para evitar su destrucción como:

- Modulación antigénica: La célula deja de expresar ciertos antígenos en su membrana mientras le suponga una desventaja.
- Secreción de productos inmunosupresores.
- Expresión de moléculas protectoras en la superficie como es el caso de la variedad mutante ICAM-1 evitando la detección por complemento.

La detección y erradicación tumoral también puede llevarse a cabo a través del sistema del complemento mediada por anticuerpos, esto sólo ocurre cuando se satisfacen dos condiciones: 1) los anticuerpos deben tener libre acceso a las células neoplásicas y 2) tales células deben poseer los antígenos específicos adecuadamente expuestos en su superficie. Estas dos condiciones se cumplen en forma ideal en las leucemias experimentales producidas por virus. En cambio, los anticuerpos dirigidos en contra de antígenos tumorales presentes en la superficie de células de neoplasias epiteliales sólidas que no circulan, o que poseen nula o baja densidad de antígenos, tienen poco o ningún efecto en el crecimiento de la neoplasia. Los anticuerpos son inefectivos cuando se supera una cierta dosis crítica de células neoplásicas (Carga tumoral).

Aún existen muchas vías moleculares involucradas en el desarrollo tumoral que no han sido descritas detalladamente y que se encuentran bajo constante investigación con la finalidad de establecer nuevas alternativas terapéuticas. Tal es el caso de la expresión de nuevos receptores que les permitan evadir la respuesta inmune.

Recientemente se ha reportado que el FcRn está presente en algunos tipos de cáncer, (corion, mama, ovario, colorectal, leucemia monocítica aguda), sin embargo, su papel en el desarrollo tumoral aún no se ha aclarado.

Los FcRn son moléculas encargadas del transporte de inmunoglobulinas de tipo G a través de las células, esto permite que se lleven a cabo importantes procesos fisiológicos en el ser humano como la inmunidad pasiva, transferida de la madre al feto por la placenta y durante la lactancia a través del intestino. También, juegan un papel clave en la vida media de las IgG protegiéndolas de su degradación en las respuestas adaptativas humorales.

Se ha descrito que los FcRn están involucrado en la eficacia del sistema inmune facilitando la interacción de IgG con células fagocíticas. Las IgG unidas a algún antígeno son capaces de utilizar el transporte mediado por FcRn y activar células del sistema inmune. Lo antes mencionado abre una nueva línea de investigación para identificar el papel que juegan los FcRn en el desarrollo tumoral, tomando en cuenta que las funciones descritas para el FcRn podrían conferir a la células tumorales mecanismos para evadir la respuesta inmunológica.

En este sentido son muy importantes los resultados obtenidos en el presente trabajo. Ya que demostramos que las células de CaCu sintetizan el RNAm para FcRn. Por lo que pensamos que también pueden expresar la proteína transmembranal. Estos resultados apoyan la teoría de que el FcRn está involucrado en la evasión del sistema Inmunológico que se observa en pacientes con este tipo de tumor. Pensamos que el receptor podría estar evitando la unión de IgG's con los antígenos tumorales, generando una competencia ventajosa para el tumor y su desarrollo. Dicha competencia evitaría la interacción antígeno-IgG debido a la internalización de IgG por acción de FcRn.

Estudios previos demostraron que la unión de FcRn con las IgG's se da de una manera pH dependiente donde, un pH ligeramente ácido (≤ 6.5) favorece la unión de FcRn a la IgG's. Esta teoría cobra importancia, ya que se sabe que el microambiente tumoral es ligeramente ácido debido

al aumento de glucólisis por parte de las células tumorales. Dicha condición haría más eficiente a FcRn para eliminar los anticuerpos que han sido producidos contra las células tumorales.

Algunas terapias utilizan las funciones de FcRn con el fin de mejorar sus resultados. Esto se lleva a cabo a través de la modificación de la porción Fc en anticuerpos terapéuticos sin embargo, el hecho de que FcRn se encuentre expresado en las células tumorales podría estar relacionado con la modesta efectividad de esta técnica. Por lo que resulta importante, determinar la presencia de este receptor, en células tumorales, antes de proporcionar una terapia a base de anticuerpos.

Se ha demostrado que los anticuerpos en cultivo con células tumorales, son capaces de alterar la proliferación celular a pesar de no estar dirigidos hacia un antígeno presente en membrana (Nelson et al. 2001), por esta razón suponemos que el efecto sobre la proliferación, se debe a la unión de la porción Fc de los anticuerpos con el FcRn de la célula tumoral, lo cual activaría vías involucradas en el aumento de la división celular.

Los resultados obtenidos mediante este estudio demuestran de manera contundente que existe expresión de RNAm para el gen de FcRn y que dicha expresión está siendo regulada por IL-2 inhibiendo la transcripción del mensajero para este gen. También es importante mencionar que existe una expresión diferencial del FcRn, lo cual depende del estadio de la línea celular y por lo tanto también se tiene una respuesta diferencial a IL-2 siendo más efectiva para células en estadios avanzados, como el de INBL estadio IVB metastásico.

Xindong Liu reportó en 2013 que la activación de IFN γ y a través de la vía JAK/STAT-1 es capaz de regular a la baja la expresión de FcRn, es por esto que pensamos que el efecto diferencial provocado por IL-2 en la expresión a nivel transcripcional de FcRn, está relacionada con la activación de IFN γ , ya que se sabe que el RIL-2 es capaz de activar esta vía y también se ha reportado que las líneas celulares utilizadas en este trabajo (CALO e INBL) expresan funcionalmente el RIL-2.

La principal contribución de este trabajo es proporcionar información sobre la biología molecular de las células de CaCu. Ya que el saber que las células de CaCu sintetizan el mensajero para FcRn permitirá ofrecer el mejor tratamiento para este tipo de tumor evitando el uso de anticuerpos, que podrían contribuir su crecimiento.

CONCLUSIÓN

- Las líneas celulares de CaCu CALO e INBL expresan de manera continua RNAm para el gen FcRn.
- La línea de CaCu CALO al ser cultivada en presencia de IL-2 a una concentración de 100 UI/mL presenta un efecto diferencial en la expresión de RNAm para el gen FcRn regulando a la baja su transcripción a través del tiempo.
- La línea de CaCu INBL al ser cultivada en presencia de IL-2 a una concentración de 100 UI/mL presenta un efecto diferencial en la expresión de RNAm para el gen FcRn regulando a la baja su transcripción, obteniendo el valor más bajo a las 48 horas.
- IL-2 promueve una mayor inhibición en la expresión de RNAm para FcRn en la línea celular de estadio más avanzado (INBL estadio IVB metastásico).

REFERENCIAS

- Abbas, A., Lichtman, A. (2008). *Inmunología celular y molecular*. Sexta Edición. Editorial Saunders Elsevier. México.
- Akilesh S, Christianson GJ, Roopenian DC, Shaw AS. Neonatal FcR expression in bone marrow-derived cells functions to protect serum IgG from catabolism. *J Immunol* 2007;179:4580-4588.
- Alonso de Ruiz, P., Lazcano-Ponce, E., Hernández-Ávila, M. (2000). *Cáncer Cervicouterino: Diagnóstico, Prevención y Control*. Editorial Médica Panamericana. México.
- American Cancer Society. What is Immunotherapy? [en línea]. 2 de Febrero del 2013 [24 de Septiembre del 2013]. Disponible en: <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/immunotherapy/immunotherapy-what-is-immunotherapy>
- Andrew, S. M.; Titus, J. A. (1997). Fragmentation of Immunoglobulin G. *Current Protocols in Immunology*. 21:2.8.1–2.8.10.
- *Antibodies: structure and function*. En: Golsby RA, Kindt TJ Osborne BA, Kuby J eds. *Immunology*, 5th ed. Filadelfia: WB Freeman Company, 2003; 76-104.
- Álvarez-López, M.R., López-Álvarez, M.R., Muro-Amador, M. (2004). Rinitis Alérgica: Mecanismos y Tratamiento. Mra Editores. Barcelona, España. p.p. 392.
- Cassard, L., Cohen-Solal, J., Camilleri-Broët, S, Fournier, E., Fridman, Wolf, H, Sautès-Fridman, C. (2006). Fc gamma receptors and cancer. *Springer Semin Immun* 28:321–328.
- Chaudhury C, Mehnaz S, Robinson JM, et al. The major histocompatibility complex-related Fc receptor for IgG (FcRn) binds albumin and prolongs its lifespan. *J Exp Med* 2003;197:315-322.
- D-zul-Rosado, K., Puerto-Solís, M., González-Losa, M. (2004). Cáncer cervicouterino: métodos actuales para su detección. *Rev. Biomed*; 15:233-241.
- De Schryver, A, Huys, J., & Vakaet, L. (1992). Systemic treatment of early breast-cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy: 133 randomized trials involving 31000 recurrences and 24000 deaths among 75000 women: 1. *LANCET*, 339(8784), 1–15

-
- De Vita, Hellman, Rosenberg et al. Cancer Principles and Practice of Oncology 8^{ed} (2008)
 - Ertürk, G., Bereli, N., Uzun, L., Tümer, M. A. (2011). Affinity Separation and Characterization of IgG Subfragments by Fast Protein Liquid Chromatography with HiTrap_r Protein A Column. *J. Biol. & Chem.*, 2011, 39 (2), 133-138.
 - Gómez-Medellín, L., M., Cañas-Cali, C., Anaya-Medellín, J., M. Receptores Fcγ y autoinmunidad. *Acta Med Colomb* 2005; 30: 27-35.
 - Guyton-Hall (2001) Tratado de fisiología médica, Mc Graw Hill Décima edición.
 - Hogarth, M., Pietersz, G. (2012). Fc receptor-targeted therapies for the treatment of Inflammation, Cancer and beyond. *Drug Discovery*; 11; 311-331.
 - Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Estadísticas a propósito del Día Mundial contra el Cáncer [en línea]. Febrero, 2013 [10 de julio de 2013]. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2013/cancer0.doc>
 - Julien, S., Videria, P. A., Delannoy, P. Sialyl-Tn in Cancer: (How) did we miss the target? *Biomolecules* (2012) 2, 435-466.
 - Karla R. Dzul-Rosado, Marylin Puerto-Solís, María del R. González-Losa. Cáncer cérvico uterino: Métodos actuales para su prevención (2004).
 - Kendall A. Smith, Helen L. Henry y Anthony W. Norman. Interleukin 2 (IL-2), of enciclopedia of hormones (2002)
 - Koolman, J., Röhm, K. (2005). Color Atlas of Biochemistry. Second Edition. Thieme Editions. USA.
 - Lewis, M. (2004). Análisis de la situación del Cáncer Cérvicouterino en América Latina y el Caribe. OPS. USA.
 - López-Saavedra, A., Lizano-Soberón, M. (2006) Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología* 1
 - Manual CTO de medicina y cirugía (2007) Séptima edición.

-
- Martínez-Hernández, J.C. (2004). Calor de Adsorción y estudios de la actividad catalítica de una enzima sulhídrica sobre SiOH₂ mesoporoso con alta área específica. UAM-I. p.p. 16.
 - Mora, N., Rosales, C. (2009). Funciones de receptores Fc en mecanismos de defensa y regulación inmunológica. Rev Invest Clin 61 (4): 313-326.
 - Murphy, K., Travers, P., Walport, M. (2008). Inmunología de Janeway. Séptima Edición. McGraw-Hill Interamericana Editores. México.
 - National Care Institute. ¿Qué es el cáncer? [en línea]. Febrero, 2013 [10 de Julio de 2013]. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>.
 - National Care Institute. Terapias biológicas para el cáncer [en línea]. 12 de junio de 2013 [24 de Septiembre de 2013]. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/recursos/hojasinformativas/tratamiento/terapias-biologicas-respuestas>
 - Nelson, M. B., Nythus, j. K., Oravec-Wilson, I., Barbera-Guillem, E. (2001). Tumor Cells Express FcγRI which contributes to Tumor Cell Growth and a Metastatic Phenotype. Neoplasia; Columen 3, No. 2: 115-124.
 - Nimmerjahn, F., Ravetch, J. (2007). Antibodies, Fc receptors and cancer. Current Opinion in Inmmunology;19:239-245.
 - Nimmerjahn, F., Ravetch, J. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. Nature Reviews, Inmmunology;8;34-47.
 - Organización Mundial de la Salud. (2011). Global status report on noncommunicable diseases 2010. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Italia.
 - Organización Mundial de la Salud. Cáncer [en línea]. Febrero, 2013 [10 de Julio de 2013]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
 - Paez, G. EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy SCIENCE VOL 304 4 JUNE 2004
 - Pardoll D. Does the immune system see tumors as foreign or self?. Annu Rev Immunol 2003;21:807-839.

-
- Parham, P. (2005). *Inmunología. Segunda Edición*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
 - Passarge, E. (2004). *Genética: Texto y Atlas. Segunda Edición*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
 - Qin, H., Edberg, J. C., Gibson, A. W., Page, G.P., Teng, L., Kimberly, R.P. (2004). Differential Gene Expression Modulated by the Cytoplasmic Domain of FcγRIa (CD64) α-Chain. *The Journal of Immunology*, 173: 6211–6219.
 - Rangel-Corona, R. (2003). Inmunoterapia del Cáncer. *VERTIENTES Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 6(1):58-62.
 - Rangel Rosalva, Rocha Leticia Ramírez, José Luis, Ibarar Ma. J., Solorza Gilberto, Monroy Alberto, Ramírez Miguel A, Herrera Angel, and Weiss-Steider Benny. Generation of memory CD4+, CD8+, CD45Ro+ and CD16+ lymphocytes activated with IL-2 IFNγ and TNFα with specific cytotoxicity against autologous cervical cancer cell in mixed lymphocytes tuour culture (1995).
 - Roitt, I., Delves, P., Martin, S., Burton, D. (2006). *Inmunología. 11° Edición*. Editorial Panamericana. España.
 - Rojas. Apodaca ,G. Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells (2002)
 - Serrano-Hernández, A. Células colaboradoras (TH1, TH2, TH17) y reguladoras (Treg, TH3, NKT) en la artritis reumatoide. *Reumatol Clin*. 2009;05:1-5. - Vol. 05 Núm.Extra.1.
 - Simister NE, Mostov KE. An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. *Nature* 1989;337:184-187.
 - Soler-Gómez, M., D., Garcés-Honrubia, V., Zorrilla-Ayllón, I. (2007). *Cáncer y cuidados enfermeros*. Ediciones Difusión Avances de Enfermería. Madrid, España.
 - Takai, T. Roles of Fc Receptors in Autoimmunity. *Nature* 2002; 2 (580-592).
 - Takai, T. Fc Receptors and Their Role in Immune Regulation and Autoimmunity. *Journal of Clinical Immunology*, 2005, Vol. 25 (1); 1-18.

-
- Tortora, G., J., Funke, B. R., Case, C. (2007). *Introducción a la Microbiología*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina.
 - Vidal-Gómez, J. (2006). *Psicoimmunología*. Publicacions, Edicions de la Universitat de Barcelona.
 - Ward ES, Zhou J, Ghetie V, Ober RJ. Evidence to support the cellular mechanism involved in serum IgG homeostasis in humans. *Int Immunol* 2003;15:187-195.
 - West AP, Jr., Bjorkman PJ. Crystal structure and immunoglobulin G binding properties of the human major histocompatibility complex related Fc receptor. *Biochemistry* 2000; 39:9698-708.
 - Xindong Liu, (2009) The functional regulation of FcRn expression and FcRn-mediated antigen presentation.

APENDICE I.

Condiciones utilizadas en la técnica RT-PCR.

a. Retrotranscripción:

Para el presente estudio se partió de 2µg de RNA total para todas las muestras (controles y estímulos). Para lo cual se utilizó la siguiente fórmula:

$$1 \mu\text{g} / \mu\text{L} = [(\text{Absorbancia } 260) (\text{Volumen de la disolución}) (40)]/1000$$

Absorbancia 260: Lectura dada por cada muestra en el biofotómetro.

Volumen de disolución: Se utilizó una dilución 4:200 en un volumen de 200µL.

40: Unidad de densidad óptica (1 UDO) equivale a 40µg/mL del biofotómetro.

Teniendo los cálculos de todas las muestras, y partiendo de 2µg de RNAm se prosiguió a realizar la RT con las siguientes condiciones establecidas para una reacción (Rx), (Tabla 8). Cada una de las condiciones por reactivo se multiplicó por el número total de reacciones que se quisieron obtener (3 controles y 3 tratamientos)

REACTIVOS	1 RX	6RX (controles)	6RX (estimulo)
Amortiguador 5x ^(INVITROGEN, USA)	5 µl	30 µl	30 µl
DNTP's (Desoxirribonucleótidos trifosfato) (INVITROGEN, USA) 5µM	1.5 µl	9 µl	9 µl
Enzima MMLV (RT) (INVITROGEN, USA)	1 µl	6 µl	6 µl
Oligo DT ^(PROMEGA, USA)	1.8 µl	10.8 µl	10.8 µl
Agua libre de RNAsas ^(FERMENTAS, USA)	X µl	X µl	X µl
Muestra (2µg /mL)	X µl	X µl	X µl
Volumen Total	20 µl	120 µl	120 µl

Tabla 8. Condiciones para RT.

b. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Con los DNAc obtenidos de la RT se llevó a cabo la PCR utilizando las condiciones establecidas para 1 Rx, las cuales se multiplicaron por el número de reacciones que se requieren para cada línea celular tanto de controles como ensayos con estímulo se realizó lo mismo (Tabla 9), para cada primer utilizado en el presente estudio (β -actina, FcRn).

Reactivos	1 Rx	12 RX β - actina	12 RX FcRn
Amortiguador 5x Green ^(PROMEGA, USA)	6 μ l	42 μ l	42 μ l
DNTP's 10 Mm ^(INVITROGEN, USA)	0.8 μ l	9.6 μ l	9.6 μ l
Enzima GoTaq Polimerasa ^(INVITROGEN, USA)	0.15 μ l	1.8 μ l	1.8 μ l
Primer 1 (Sentido) ^(UNIPARS, S.A.)	1 μ l	12 μ l	12 μ l
Primer 2 (Antisentido) ^(UNIPARS, S.A.)	1 μ l	12 μ l	12 μ l
Agua libre de RNAsas ^(FERMENTAS, USA)	7.05 μ l	84.6 μ l	84.6 μ l
Muestra de DNAc	4 μ l	48 μ l	48 μ l
Volumen Total	20 μ l	240 μ l	240 μ l

Tabla 9. Condiciones para cada reacción en la técnica PCR.

APENDICE II.

Reactivos y Soluciones Utilizados.

Soluciones para cultivo

- RPMI-1640/10% SFB
- Solución fisiológica de verseno
- Solución de Fosfatos (PBS)
-

Reactivos Extracción ARN Total

- Trizol (Invitrogen)
- Cloroformo
- Isopropanol
- Etanol 70%
- H₂O inyectable
- H₂O libre de RNAsas

Reactivos Retrotranscripción (RT)

- Amortiguador 5X (Promega)
- DTT 0.1M (Invitrogen)
- Enzima MMLV-RT (Promega)
- DNTP´S 5mM (Invitrogen)
- Oligo dT (Promega)
- H₂O libre de RNAsas (Fermentas)

Reactivos (PCR)

- Amortiguador 5X Green GoTaq (Promega)
- DNTP´S 10 mM (Invitrogen)
- Enzima GoTaq DNA Polimerasa 5u/ L (Promega)
- Primers: β - actina (1:5), Caspasa -8 (1:5), FcRn (1:5) (Unipars S.A)
- H₂O libre de RNAsas (Fermentas)

Reactivos y soluciones para electroforesis

- Agarosa (Invitrogen)
- TBE 10X, 1X, 0.5 X
- Gel de agarosa al 1.5%
- Marcador de peso molecular
- Buffer de carga Blue/yellow 6X (promega)
- Bromuro de etidio

APENDICE III.

Preparación de Reactivos y Soluciones

- **Desactivación del Suero Fetal Bovino (SFB)**

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

- **DNTPS 10 mM (MIX)**

Todos los nucleótidos se encuentran a una concentración de 100 mM, de los cuales se toman las siguientes cantidades:

- A 100µl (Invitrogen S.A de C.V. México)
- G 100 µl (Invitrogen S.A de C.V. México)
- T 100 µl (Invitrogen S.A de C.V. México)
- C 100 µl (Invitrogen S.A de C.V. México)

Estos se diluyen en 600 µl de agua libre de RNAsas para obtener 1 mL a una concentración de 10 mM.

- **TBE 10X**

- Tris base 108g (Sigma Chemical Co.U.S.A)
- Ácido bórico 55g (Sigma Chemical Co.U.S.A)
- EDTA 0.5 M 40 mL. (Sigma Chemical Co.U.S.A)

Se lleva a 1000 mL con agua destilada, si hay precipitaciones debe descartarlas. Se guardó a Temperatura Ambiente hasta su uso.

- **TBE 1X**

Tomar 50 mililitros de TBE 10X y diluirlo en 450mililitros de agua destilada.

- **TBE 0.5X**

Tomar 250mililitros de TBE 1X y diluirlo en 250mililitros de agua destilada

- **Solución fisiológica de Verseno**

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

- Tris base 3.04 g (Sigma chemical Co.U.S.A)
- Cloruro de sodio 8.00 g (Sigma chemical Co.U.S.A)
- Cloruro de potasio 0.04 g (Sigma chemical Co.U.S.A)
- Etilen -diamen-tetra-acético(EDTA) 0.40 g (Sigma chemical Co.U.S.A)

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

- **Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS)**

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

- Cloruro de magnesio
Co.U.S.A) 0.10 g (Sigma chemical
- Cloruro de calcio
Co.U.S.A) 0.10 g (Sigma chemical
- Cloruro de sodio
Co.U.S.A) 8.00 g (Sigma chemical
- Cloruro de potasio
Co.U.S.A) 0.20 g (Sigma chemical
- Fosfato monoácido de sodio
Co.U.S.A) 2.16 g (Sigma chemical
- Fosfato diácido de potasio
Co.U.S.A) 0.20 g (Sigma chemical

El cloruro de magnesio y de calcio se disuelven en 100 ml de agua bidestilada y después se adicionan los 100 ml que contengan el cloruro de magnesio y de calcio. Se ajusta el pH a 7.2 - 7.4 utilizando HCL 8N y se afora finalmente a un volumen final de 1000ml. Esta solución se esteriliza por medio de autoclave a 20 lbs durante 20 min, la solución se almacena a 4°C hasta el momento del uso.