



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

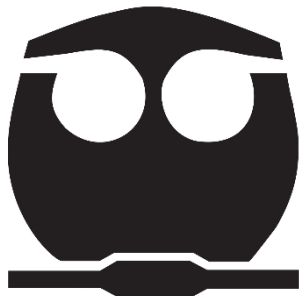
Tesis

**DETERMINACIÓN DE LA VÍA DE APOPTOSIS
MEDIADA POR EL TRATAMIENTO CON LA PROTEÍNA
QUIMÉRICA OMPC-CD154 EN LÍNEAS CELULARES DE
LINFOMA NO HODGKIN**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

MORALES MARTÍNEZ MARIO





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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Dr. Mario Adán Moreno Eutimio

VOCAL: Profesor: EBC Julio Cesar Martínez Álvarez

SECRETARIO: Profesor: Dr. Mario I Vega Paredes

1er. SUPLENTE: Profesor: Dr. Gibran Pérez Montesinos

2° SUPLENTE: Profesor: Dr. Gustavo Olvera García

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE SEÑALIZACIÓN MOLECULAR EN CÁNCER, UNIDAD DE INVESTIGACIÓN
MÉDICA EN ENFERMEDADES ONCOLÓGICAS DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI.
IMSS**

ASESOR DEL TEMA: DR. MARIO I. VEGA PAREDES

SUPERVISOR TÉCNICO: M EN C GERARDO PANTOJA ESCOBAR

SUSTENTANTE: MARIO MORALES MARTÍNEZ

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras.....	i
Índice de tablas.....	iii
Abreviaturas	iv
Resumen.....	v
Introducción	1
1 Cáncer	1
2 Linfoma no Hodgkin.....	3
2.1 Epidemiología de Linfoma no Hodgkin.....	5
2.2 Subtipos de Linfoma no Hodgkin.....	5
2.3 Factores de riesgo Linfoma no Hodgkin.....	7
2.4 Clasificación de Estadios de Linfoma No Hodgkin.....	7
2.5 Fisiopatología de Linfoma no Hodgkin.....	8
2.6 Diagnóstico y pruebas para diagnóstico.....	8
2.7 Tratamiento.....	9
2.7.1 Radioterapia.....	9
2.7.2 Trasplante de medula ósea.....	9
2.7.3 Quimioterapia.....	9
2.7.4 Inmunoterapia.....	10
2.7.5 Anticuerpos monoclonales como terapia vs cáncer.....	10
3 CD40 como blanco terapéutico.....	14
4 Interacción CD40-CD154.....	16
5 Proteína de fusión OmpC CD154.....	18
6 Apoptosis.....	19
7 Antecedentes directos.....	22
8 Justificación.....	23
9 Planteamiento del problema.....	24
10 Hipótesis.....	25
11 Objetivos.....	25
12 Materiales y métodos.....	26
13 Resultados.....	28
13.1 Purificación de proteína quimérica OmpC CD154 y OmpC recombinante....	28
13.2 Efecto de la proteína quimérica OmpC CD154 sobre la viabilidad celular de LNH.....	29
13.3 Efecto de la proteína quimérica OmpC CD154 sobre la proliferación de la línea celular de LNH Raji.....	31
13.4 El tratamiento con la proteína quimérica OmpC CD154 induce apoptosis dependiente de activación de caspasas en la línea celular de LNH Raji.....	32
13.5 Caspasa 8	32
13.6 Caspasa 9	33

13.7 Caspasa 3.....	34
13.8 BID.....	35
13.9 p-SAP/JNK.....	36
14 DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	37
15 ESQUEMA GENERAL.....	39
16 CONCLUSIONES.....	40
17 REFERENCIAS	41

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Principales tumores malignos según sexo.....	1
Figura 2. Porcentaje de morbilidad en adultos según sexo.....	2
Figura 3. Esquema de las modificaciones en los anticuerpos monoclonales.	9
Figura 4. Esquema de interacción entre CD40 y CD154. Se muestra que se favorece la formación de trímeros.	16
Figura 5. Esquema de cristalografía de interacción entre CD154 y CD40. Se giran para mostrar lo sitios de interacción.....	17
Figura 6. Modificado de “Targeting Apoptosis Pathways for New Cancer Therapeutic.....	19
Figura 7 Análisis por citometría de flujo de la inducción de apoptosis con yoduro de propidio y anexina V.....	20
Figura 8. Análisis electroforético de las proteínas OmpC y la porina quimérica OmpC CD154.....	26
Figura 9. Evaluación del efecto de la porina OmpC CD154 en la viabilidad celular de la línea celular Raji.....	27
Figura 10. Evaluación del efecto de la porina OmpC CD154 en la viabilidad celular de la línea celular Raji.....	28
Figura 11. Determinación de la proliferación celular después del tratamiento con porina OmpC CD154 en la línea celular Raji.....	29
Figura 12 A. Expresión de pro-caspasa 8.....	30
Figura 12 B. Análisis de la expresión de pro-caspasa 8.....	30

Figura 13 A. Expresión de caspasa 9.....	31
Figura 13 B. Análisis de la expresión de Caspasa 9.....	31
Figura 14 A. Expresión de caspasa 3 activa.....	32
Figura 14 B. Análisis de la expresión de caspasa 3 activa.....	32
Figura 15 A. Expresión de BID.....	33
Figura 15 B. Análisis de la expresión de BID.....	33
Figura 16 A. Expresión de JNK.....	34
Figura 16 B. Análisis de la expresión de BID.....	34
Figura 17. Esquema de la vía de apoptosis.....	37

INDICE DE TABLAS

	Pagina
Tabla 1. Incidencia y mortalidad en hombres y mujeres.....	4
Tabla 2. Clasificación de subtipos de linfoma no Hodgkin.....	5
Tabla 3. Anticuerpos monoclonales dirigidos contra blancos moleculares.....	10
Tabla 4. Anticuerpos monoclonales anti-CD40 en estudios clínicos.....	14

ABREVIATURAS

UICC: Unión Internacional contra el cáncer

INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía

OMS: Organización Mundial de la Salud

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Adquirida

FISH: Hibridación fluorescente *in situ*

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

CD: Cúmulo de diferenciación

TNF: Factor de necrosis tumoral

MAPK: Protein-quinasas activadas por mitógenos

ADCC: Citotoxicidad dependiente de anticuerpo

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

FDA: Administración de alimentos y medicamentos

FC: Fracción cristalizable

NK: Asesina natural

PMN: Polimorfonucleares

DT: Toxina Diftérica

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad

OmpC: Proteína de membrana externa tipo C

LNH: Linfoma no Hodgkin

DNA: Ácido desoxirribonucleico

IAP's: Proteínas inhibidoras de la apoptosis

RESUMEN

El Linfoma no-Hodgkin figura entre las diez principales tipos de cáncer. Tiene una incidencia de 4.7 y 3.6 casos por año en mujeres y hombres respectivamente. Así como una mortalidad de 2.6 en hombres y 2 en mujeres en México. Para el tratamiento del linfoma no-Hodgkin el estándar usado es R-CHOP (Ciclofosfamida, hidroxirubicina, oncovin, prednisona, además del anticuerpo monoclonal Rituximab). Actualmente se ha demostrado que el uso de R-CHOP conlleva diversas complicaciones propias de la quimioterapia. De igual manera se ha reportado que no todos los pacientes responden satisfactoriamente, de hecho aproximadamente el 60% de ellos muestra una respuesta favorable mientras que en el otro 40% no hay efecto. Es por ello que la búsqueda de alternativas es fundamental para el tratamiento de linfomas.

Se ha señalado que los linfocitos B sobre expresan una gran variedad de proteínas membranales tales como CD40 y CD20 entre otras, estas proteínas también se expresan en linfocitos B normales, sin embargo en linfocitos B de linfoma hay una sobreexpresión, lo cual los hace un potencial blanco terapéutico.

Diferentes trabajos han demostrado que la interacción de la molécula CD40 con su ligando CD154, es capaz de producir una disminución de la proliferación, así como un aumento en la apoptosis en líneas celulares de linfoma no Hodgkin de linfocitos B. Se ha reportado que la interacción entre CD40 y CD154 ocurre de manera más eficaz cuando se forma un trímero por este motivo se ha construido una proteína quimérica que tiene como base una porina de *Salmonella typhi* (OmpC) a la cual se la ha insertado la secuencia del ligando de CD40, CD154. La interacción de CD40 con esta proteína quimérica (OmpC CD154), es capaz de inducir disminución en la proliferación celular, así como un aumento de apoptosis en líneas celulares de Linfoma no-Hodgkin, mediante la activación de diversas vías de señalización, entre ellas, la inhibición de las vías canónica y no canónica de NF-kappa-B, y la activación de P38 MAPK. El propósito de este trabajo es determinar la vía de apoptosis por la cual ocurre la muerte celular en la línea celular de linfoma no Hodgkin, Raji. Nuestros resultados muestran que la proteína quimérica OmpC CD154 tiene un efecto de inducción de apoptosis e inhibición de la proliferación en comparación con la proteína OmpC nativa, y similar a un ligando humano recombinante de CD40, que fue empleado como control positivo, en una línea celular de linfoma no Hodgking, Raji. Dentro de este trabajo se determinó la vía de apoptosis que se activa mediante la técnica de western blot con uso del equipo ODISSEY cix de LICOR para la detección de la proteína mediante infrarrojo, así como la inducción de apoptosis por citometría de flujo. Encontrando que la proteína quimérica índice activación de las vías intrínseca y extrínseca de apoptosis mediada por caspasa 8 y 9 respectivamente y este entrecruzamiento de las vías puede estar mediado por la activación de BID y la subsecuente activación de la caspasa efectora caspasa 3,

mediado por la activación de JNK. Por lo que la proteína quimérica OmpC CD154 es capaz de inducir apoptosis en líneas celulares de linfoma no Hodgkin mediado por la vía extrínseca, por la interacción con CD40 y por la vía intrínseca mediado por la activación de BID. Por lo que nuestros resultados permiten reiterar la propuesta de que la proteína quimérica OmpC CD154 como un buen candidato terapéutico con un gran espectro citotóxico sobre líneas celulares de linfoma no Hodgkin

INTRODUCCIÓN

Cáncer

El cáncer engloba un grupo de enfermedades resultantes de la interacción de factores genéticos y externos (físicos y químicos), que producen la degeneración de células, originando lesiones precancerosas y posteriormente un tumor maligno (INEGI 2015).¹ Los tumores tienen la capacidad de atacar un tejido específico, así como diseminarse a varios tejidos. De manera normal, el cuerpo está compuesto por células que forman diferentes tejidos y que llevan a cabo su ciclo celular, cuando este se ve afectado, las células pueden comenzar a proliferar de manera desproporcionada en relación a su tasa de mortalidad, lo cual produce un desequilibrio en los tejidos y posteriormente el desarrollo de un tumor.²

A nivel mundial el cáncer representa un gran problema de salud dada la importante mortalidad que presenta. Se estima que más de 10 millones de personas son diagnosticadas con algún tipo de cáncer cada año.³ Existen más de 100 tipos de cáncer, estos son denominados dependiendo del sitio donde se originó. Según datos de la Organización Mundial de la Salud en el año 2012, la cifra de defunciones a causa de algún tipo de cáncer, fue de 8.2 millones de personas, se estima que para el año 2030 aumente a 13.1 millones de personas. Los varones son los más afectados principalmente por cáncer de pulmón, estómago, riñón, colon y esófago, mientras que las mujeres por cáncer de seno, pulmón, estómago, colon y cervical. En nuestro país del total de muertes registradas durante el año 2013, el 12.8% fueron a causa de algún tumor y de estos el 93.4% por tumores malignos (Organización Mundial de la Salud 2014^a).

Según la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC), en México el cáncer es la tercera causa de muerte y se estima que cada año hay 128 mil casos nuevos

A nivel nacional el Instituto Nacional de Estadística y Geografía, reportó en su documento titulado “Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de Febrero)”, publicado el 30 de enero de 2015 los siguientes datos:

Para el año 2012 la principal causa de mortalidad hospitalaria fue a causa de cáncer de órganos hematopoyéticos, en el mismo año más del 50% de los hombres egresados de un hospital fue a causa de una leucemia mientras que las mujeres por cáncer de seno. Los hombres han sido los más afectados, manteniendo un porcentaje de 57% del total de los casos, sin embargo, la mortalidad está ligeramente dominada por hombres con 51% del total de las muertes. (INEGI 2015)

1

En México durante la infancia predominan las neoplasias no epiteliales como la leucemia y los linfomas (INEGI 2015).¹ Para el año 2011 los principales tipos de tumores malignos que se presentaron fueron los tumores malignos en los órganos hematopoyéticos, los cuales responden al 59% del total de los cánceres, por sexo

concentra 58% en los hombres mientras que en las mujeres es un 59.3% del total de casos. Le siguen para hombres, las neoplasias en sistema linfático tejidos afines con un 9.7% y le sigue huesos y tejido articular con 5.6%, mientras que para las mujeres le sigue encéfalo con un 6.9% y hueso y tejidos articulares con un 5.8% Por otro lado las personas con 20 años o más, se ven afectados principalmente por neoplasias del epitelio. Para la población adulta, los tipos de tumores que afectan son diferentes según el sexo, siendo para hombres neoplasias en sistemas digestivos con 23.9%, seguido por tumores en órganos genitales con 12.2% con el tumor de próstata en primer lugar en frecuencia y finalmente con 9.8% los de órganos hematopoyéticos. Por otro lado las mujeres tienen como primer lugar al tumor maligno de mama con 29.6%, seguido por neoplasias en órganos genitales con 16.7% principalmente cuello del útero y útero. Con 14.3% las neoplasias de órganos digestivos tiene el tercer lugar.



Figura 1. Principales tumores malignos según sexo. (INEGI 2015) ¹

En este contexto, en el año 2012 del total de defunciones el 13% corresponden a tumores y de estas el 93.5% son tumores malignos.

En los jóvenes menores a veinte años, se observó que 5.1% murieron a consecuencia de un tumor de los cuales el 86% era canceroso, principalmente en órganos hematopoyéticos con una tasa de mortalidad de 2.53 defunciones por cada 100 mil personas, 2.9 en hombres y 2.14 en mujeres.

En cambio, para los adultos la principal causa de defunciones por tumores malignos fue por órganos digestivos con 33.18 por cada 100mil habitantes en esta edad. Seguida por neoplasias en órganos genitales la cual tiene una tasa de mortalidad de 15.08 por cada 100 mil habitantes.

Las neoplasias en órganos respiratorios e intratorácicos siguen con 10.72 y en el siguiente lugar está el cáncer de mama con 8,13 defunciones por cada 100mil.

La mortalidad cambia con el sexo ya que en mujeres el cáncer de mama es la segunda causa de muerte con 15.38 cada 100 mil.

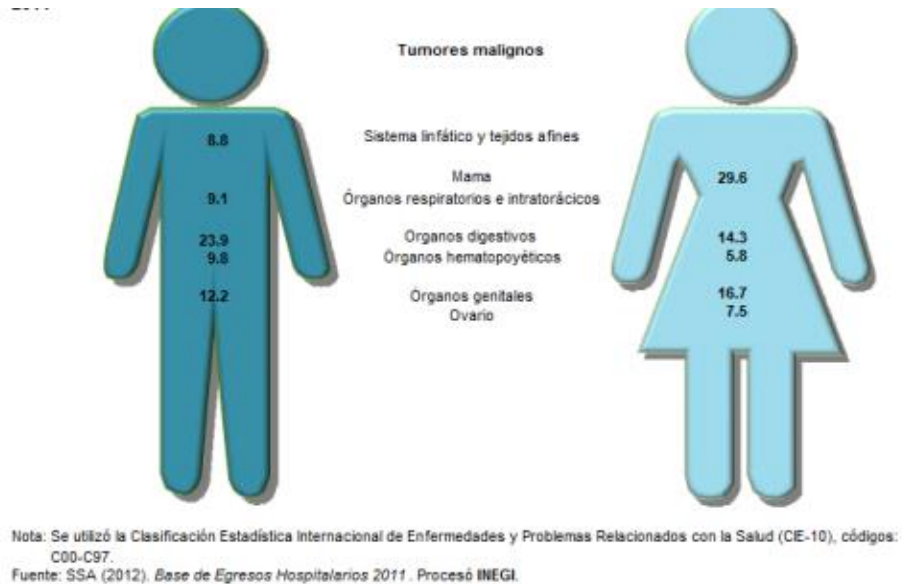


Figura 2. Porcentaje de morbilidad en adultos según sexo. ¹

En el año 2011 los principales tumores malignos fueron en órganos hematopoyéticos, dentro de los cuales están las leucemias linfocítica aguda y el Linfoma No-Hodgkin. Desde 1970 la incidencia de casos diagnosticados de Linfoma No Hodgkin se ha duplicado, en parte por mejores métodos diagnósticos así como al aumento de la infecciones con VIH ⁴. A continuación se muestran datos correspondientes a Linfoma no Hodgkin que ocupa una de los diez primeros puestos en tipos de cáncer.

Linfoma No-Hodgkin

Los linfomas son definidos, de manera simple, como las neoplasias malignas de los componentes celulares del sistema inmune. Históricamente los primeros en describir patologías que incluían una inflamación en los ganglios linfáticos con una etiología desconocida fueron entre otros, Carigie, Hodgkin, Wilks, etc con una publicación titulada “Sobre algunos aspectos mórbidos de las glándulas absorbentes y el bazo” en 1832. Finalmente en 1856 se acuñó el termino Linfoma de Hodgkin por Sir Samuel Wilks en reconocimiento a Thomas Hodgkin quien había descrito anteriormente la misma patología. ⁵

Fue hasta la primera parte del siglo XX con el establecimiento de la histopatología como disciplina en el diagnóstico médico que se comenzó a suponer, tras las

diferentes observaciones histológicas, que se trataba de enfermedades diferentes y que podrían tener diferente origen.

Los linfomas actualmente se clasifican en dos grupos, con base en diferentes patrones patológicos, inmunofenotípicos y de respuesta, en Linfoma de Hodgkin y Linfoma no Hodgkin ⁶ estos son distinguibles mediante exámenes microscópicos aunque en algunos casos requieren análisis de laboratorio para su identificación. ⁷ El Linfoma no-Hodgkin consta de varios subtipos que tiene similitud entre sí, y tienen como característica la proliferación de células linfáticas aumentada además de alteraciones a nivel cromosómico ⁸

El Linfoma No Hodgkin ocurre en componentes del sistema linfático. El tejido linfático está conformado por ganglios linfáticos y órganos del sistema inmunológico tales como el bazo además de los órganos encargados de la producción de sangre, como la médula ósea. Los ganglios linfáticos tienen una amplia distribución en el cuerpo y estos están formados casi totalmente por linfocitos tanto T como B. En ambos puede desarrollarse el linfoma, sin embargo los linfomas de linfocitos B forman el 85% del total de los Linfomas no Hodgkin mientras que los de T abarcan el 15% del total. Dado que los linfocitos malignos en el linfoma son similares a los linfocitos normales en cierto grado de maduración, es importante conocer el tipo de linfoma para considerar las opciones de tratamiento.⁹

Acorde al Atlas Global de Cáncer se tiene registro de la tasa de incidencia y de mortalidad en hombres en México fueron de 4.7 y 2.6 respectivamente, mientras que para las mujeres fue de 3.6 y 2 (cifras cada 100 mil personas) ³

Tabla 1. Incidencia y mortalidad de Linfoma no Hodgkin en hombre y mujer ³

Linfoma no Hodgkin			
	País	Conteo	Tasa edad estandarizada (Por cada 100mil personas)
Incidencia hombres	México	2 546	4.7
Incidencia mujeres	México	2086	3.6
Mortalidad hombres	México	1380	2.6
Mortalidad mujeres	México	1178	2
Prevalencia hombres	México	4730	11.7
Prevalencia mujeres	México	3970	9.3

Subtipos de Linfoma no-Hodgkin

Se han descrito diversos tipos de Linfoma no-Hodgkin. Históricamente han surgido diversas clasificaciones. Recientemente la Organización Mundial de la Salud propuso clasificar con base en la apariencia bajo el microscopio, características cromosómicas y presencia de proteínas específicas en la superficie celular.) ¹⁰ Actualmente los linfomas que tienen mayor frecuencia son el linfoma difuso y el linfoma folicular. En la tabla 2 se muestra la clasificación actual¹¹ que se refiere a las características microscópicas y de inmunofenotipo que actualmente se usa en la clínica.

Tabla 2. Clasificación de subtipos de Linfoma no-Hodgkin

Tipo de linfoma	Composición	Inmuno-fenotipo usual	Características genéticas
Linfoma de Células B			
Linfoma de células B de zona marginal del manto tipo MALT	Células pequeñas, células B de zona marginal, células plasmáticas, foliculares, lesiones linfoepiteliales	Monotipo slg+, clg+/- (IgM>IgG o IgA), CD20+, CD5-, CD10-, bcl6-, bcl2, CD43-/+ , ciclina D1	Clonas IgH; t(11;18)(API2-MALT1) en algunos casos de gástrico e intestinal; trisomía 3 o 18 en algunos casos; t(14;18)(IgH-MALT1) en algunos casos hepáticos
Linfoma de células grandes tipo B difusas	Núcleos grandes, centroblastos, células B inmunoblasticas y anaplasicas	Monotipos slg+, CD20+, cbl6+/-, CD10-/+ , CD43+/-	Clonas IgH, bcl6 anomalidades comunes; t(8:14)(c-myc-IgH) algunas formas: t(14;18)(IgH-BCL2)no communes
Linfoma de Burkitt	Células linfoide anaplasicas de mediano tamaño con centro nucleado, citoplasma basofílico, con cuerpos de macrófagos teñidos	Monotipo slgM+, CD20+, CD10+, bcl6+, bcl2-, Ki67-100%	Clonas IgH; t(8:14), t(2;8) o (8;22)(c-myc); casos endémicos y una minoría esporádica de casos de EBV+
Linfoma de células del manto	Células de pequeño o mediano tamaño, células ligeramente irregulares con escaso citoplasma	Monotipos slgMD+, CD20+, CD5+, CD10-, CD43+, ciclina D1+	Clonas IgH, T(11;14)(BCL1-IgH)
Linfoma foliular	Células con centros de características mixtas, células foliculares dendríticas	Monotipos slgMD+. CD20+, CD10, bcl2+, CD5-, CD43-, ciclina D1-	Clonas IgH, t(14;18)(IgH-bcl2) usualmente encontrados
Linfoma plasmabastico de células grandes (tipo células B)	Plasmabastos, células plasmociticas con muchos núcleos grandes mitosis	CD20-/+MUM1+, CD79a+, CD138+, clg-/+ , Ki76 grande	EBV+, muchos casos
Linfomas de células T/NK			
Linfoma de células T intestinal tipo enterohepatico	Células de pequeño o mediano tamaño o células grandes bizarras, muchas células reactivas	CD3+, CD4-/CD8->CD8+ granzima+ perforina+	Células T receptores de genes clonados
Linfoma nasal células T/NK	Pequeñas de mediano tamaño y/o células grandes linfoides atipias	CD3+, CD3+, CD5-, CD56+, enzimas + y perforinas +	Gen Receptor de células T de la línea germinal ; EBV+
Linfoma hepatoesplénico de células T	Células de mediano tamaño con centro citoplasmático claro en sinusoides hepáticos y pulpa roja esplénica	CD2+, CD3+, CD5-/+ , CD4-, CD8-/+ , TIA-1+	Clonas de genes receptores de células T, brazo corto de cromosoma 7q y trisomía 8 comúnmente
Linfoma de Hodgkin			
Linfoma clásico de Hodgkin	Células de Reed Stenberg y variantes	CD15+/-, CD30+, CD20-/+ , Pax5+, CD3-	EBV usualmente+, especialmente en estados de inmunidad anormal

Modificado de (Ariana Paola Canché-Arenas 2012) ¹¹

Factores de Riesgo para Linfoma no-Hodgkin

Clínicamente no es posible determinar una causa de linfoma. El Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos propone factores que aumentan la posibilidad de padecer Linfoma no-Hodgkin, se citan a continuación:

Sistema inmunitario debilitado, ya sea por uso de fármacos o enfermedades hereditarias. Infecciones: algunas infecciones han sido relacionadas con el aumento del riesgo de padecer linfomas, cabe mencionar que el linfoma no es contagioso. Algunas de las infecciones relacionadas son: VIH, Virus de Epstein Barr, *Helicobacter pylori*, virus linfotrópico humano de células T, tipo 1, virus de la Hepatitis C. Edad, como se mencionó anteriormente, se puede padecer linfoma desde antes de 20 años, sin embargo el aumento de la edad representa también un aumento para el posible padecimiento. ²

El Linfoma no-Hodgkin es un proceso tumoral y como tal requiere de varios eventos para modificar la regulación de la apoptosis y con ello generar el desarrollo del tumor. En este proceso están relacionados varios oncogenes, tales como c-myc, Bcl-1, Bcl-2, Bcl-3 y Bcl-6. Se ha señalado que el 85% de los linfomas tienen anomalías citogenéticas, la translocación más frecuente es 6(6q) que resulta en la pérdida de genes supresores de tumores. Además se describen proto-oncogenes y genes supresores involucrados, entre ellos Bcl-1 y Bcl-2 y LYT-10, algunos otros como se mencionó están relacionados con infecciones por virus, tal es el caso del linfoma de Burkitt endémico de África, que se relaciona con Virus Epstein Barr ^{12 131211}

Clasificación de Estadios del Linfoma No-Hodgkin

Para el tratamiento clínico, en linfoma no Hodgkin se ha dividido en estadios que a continuación se describen, esta clasificación es la más frecuente y se conoce con el nombre de Sistema de Ann Arbor de clasificación por etapas ¹⁴

Etapa 1. Las células de linfoma se encuentran en un grupo de ganglios linfáticos o en solo una parte del tejido dañado pero no en medula ósea ni hígado.

Etapa 2. Las células de linfoma se encuentran en dos grupos de ganglios, o bien se encuentran en órganos y han pasado a algún ganglio cerca del órgano.

Etapa 3. El linfoma se haya en ganglios linfáticos situados arriba y abajo del diafragma, además es posible detectarlo también en tejidos cercanos a esos ganglios linfáticos.

Etapa 4. Las células de linfoma se hayan en varias partes de órganos o tejidos además de estar presentes en los ganglios linfáticos.

Fisiopatología de Linfoma no-Hodgkin

Cabe señalar que la única manera de diagnosticar un Linfoma no-Hodgkin es mediante una biopsia. Para lo cual un patólogo especializado es capaz de indicar la clase de linfoma que se presenta sin embargo usualmente se requieren más pruebas a fin de confirmar el diagnóstico.

Diagnóstico y pruebas para diagnóstico

Inmunohistoquímica. Útil para diferenciar entre los distintos tipos de linfomas entre si y de otras enfermedades, basada en reacciones inmunológicas, un anticuerpo reconoce moléculas específicas en la superficie celular

Citometría de Flujo. Basada en una reacción inmunológica esta técnica consiste en el empleo de anticuerpos que reconozcan moléculas de la superficie celular que pueden o no estar dependiendo del tipo de linfoma, esto permite que se utilice para conocer inmunofenotipos y poder con ello identificar a cada tipo de célula, en comparación con la inmunohistoquímica se pueden identificar muchas más células, además de que los grupos de células se pueden separar y contar.

Citogenética. Permite evaluar los cromosomas de las células de linfoma. Se buscan translocaciones o alteraciones en los cromosomas que correspondan con el linfoma, esto permite identificar los tipos de linfoma.

Estas pruebas son capaces de evidenciar ciertas alteraciones, sin embargo no todas, de modo que se requiere el uso de técnicas con mayor poder para así tener un completo conocimiento de las posibles alteraciones presentes. Es por eso que se usan técnicas de genética molecular, tales como la Hibridación fluorescente in situ (FISH), PCR, etc.

Hibridación fluorescente in situ. Basada en la utilización de tintes fluorescentes que solo se adhieren a genes específicos o a cierta parte de cada cromosoma

PCR. Detecta cambios genéticos y cambios cromosómicos incluso aquellos que no son visibles al microscopio.

Estudios por imagen. Se hace uso de ondas sonoras, rayos x o partículas radioactivas para obtener una imagen del interior del cuerpo. Se usan para examinar un área que se sospecha tiene linfoma o bien para saber si se ha propagado el linfoma.

Tomografía computarizada. Permite observar a diferencia de los rayos x, una sección del cuerpo completa es útil para detectar linfomas en abdomen, pelvis, tórax, cabeza y cuello. Puede requerir una toma de colorantes de contraste.

Resonancia magnética. Generalmente usadas cuando hay sospechas de propagación a médula ósea o cerebro. De manera similar que la tomografía dan imágenes detalladas de algún tejido blando específico. A diferencia de las dos

técnicas anteriores está utiliza imanes de gran poder que generan patrones que después una computadora transforma en imágenes detalladas.

Estas pruebas son las más comunes usadas, sin embargo existen otras como ecografía, tomografía por emisión de positrones, gammagrafía con galio y gammagrafía ósea, etc. En resumen se clasifican los linfomas más comunes con base a si son Linfoma de B o T y se enumeran conforme a incidencia ¹⁵

Tratamiento

El tratamiento para Linfoma no-Hodgkin se basa principalmente en algunos aspectos propios del padecimiento, tales como:

- Tipo de linfoma no-Hodgkin que padece
- Estadio de la enfermedad
- Progresión del tumor
- Problemas de salud (si existen)

Con base en lo anterior, el tratamiento para linfoma puede variar, sin embargo actualmente existen cuatro tratamientos para el Linfoma no-Hodgkin y son radioterapia, trasplante de medula ósea, quimioterapia e inmunoterapia, estas dos últimas son actualmente el primer frente para el tratamiento de Linfoma no-Hodgkin.

Radioterapia.

Usando generalmente rayos X, la radioterapia es uno de los tratamientos de linfoma. Su uso se restringe casi exclusivamente a pacientes cuyo caso el linfoma compromete la vida y se requiere actuar con urgencia, tal es el caso de linfoma que ha invadido medula espinal o que ha comenzado a diseminarse. ¹⁶

Trasplante de Medula Ósea.

Considerado el último recurso consiste en el trasplante de medula ósea, ya sea autóloga o bien de algún pariente. Para tratar poder trasplantar de manera exitosa se deben eliminar primero precursores celulares. Cabe mencionar que la mejor opción es el trasplante autólogo aunque debido a que no se eliminan las células tumorales de manera total, existe el riesgo de recaídas aunque se reduce mucho la posibilidad de rechazo debido a que son sus mismas células. ¹⁷

Quimioterapia.

Se refiere al uso de fármacos citotóxicos y es el primer tratamiento en contra de Linfoma no-Hodgkin, hay varios regímenes para usar quimioterapia y dependen del estadio de la enfermedad además del tipo de linfoma.

Actualmente el tratamiento consta de cuatro fármacos que son Ciclofosfamida, hidroxirubicina, oncovin y prednisona que son por su mecanismo de acción un agente alquilante, inhibidor de formación de huso cromático, bloqueo de polimerización de tubulina e inhibidor de síntesis de proteínas respectivamente.

Cabe mencionar que estos tratamientos, sin bien atacan principalmente a células con alto nivel de proliferación, es inespecífico lo cual puede traer muchas consecuencias al paciente así también existe la posibilidad de que el paciente se vuelva refractario al tratamiento.^{18 19}

Inmunoterapia

Consiste en la utilización de componentes del sistema inmune que sean capaces de inducir, aumentar o disminuir, incluso suprimir la respuesta inmune. Un ejemplo claro de esto, es Rituximab, un anticuerpo monoclonal capaz de inducir apoptosis y que tiene como blanco la proteína CD20, un marcador molecular que está sobre-expresado en más del 85% de linfocitos B de linfoma lo cual le permite actuar sobre linfocitos B de linfoma en comparación con linfocitos B normales.

Existen múltiples anticuerpos utilizados en terapias para Linfoma no-Hodgkin los cuales son capaces al igual que Rituximab de producir respuestas sobre células tumorales, pueden tener diversos mecanismos de acción tales como activación del complemento, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, activar cascadas de señalización pro-apopticas. Cabe mencionar que estos anticuerpos pueden ser quiméricos (ratón-humano), o bien totalmente humanizados para reducir o evitar la inmunogenicidad e incrementar actividad inmunológica.²⁰

Anticuerpos monoclonales como terapia contra el cáncer.

Los anticuerpos monoclonales son anticuerpos dirigidos contra un blanco específico tumoral. Estos anticuerpos son producidos en un laboratorio, mediante técnicas de biología molecular han permitido emplear modificaciones como hibridización, quimerización y humanización²¹

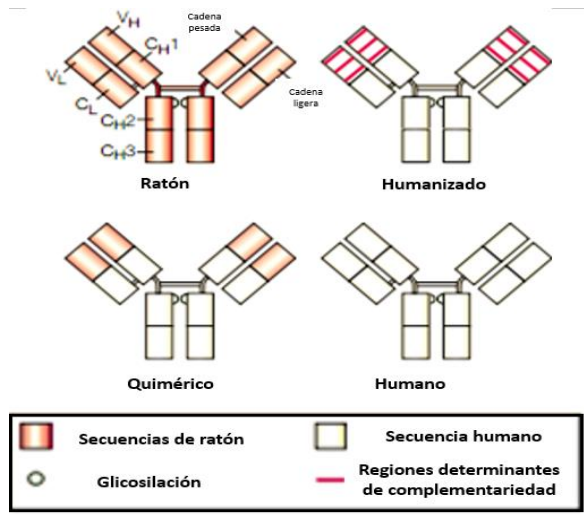


Figura 3 Esquema de las modificaciones en los anticuerpos monoclonales.²¹

Diversos autores han demostrado el uso de anticuerpos en animales, así como en humanos con resultados eficaces en el tratamiento de linfoma. Existen múltiples blancos de inmunoterapias, tales como la familia de TNF, véase TRAIL, CD40, CD137, Fas, LIGTH entre otros.

Específicamente en linfoma los más estudiados son Fas, TRAIL, CD40 y CD20, este último es usado de manera muy amplia dado que se encuentra en más del 90% de los linfomas; como ya se mencionó uno de los anticuerpos más usados es Rituximab que es un anticuerpo monoclonal dirigido hacia este blanco. De manera molecular se han reportado diferentes mecanismos de acción, tales como inhibición de la vía de p39 MAPK que es importante para la producción de IL-10, interleucina relacionada a tumorigénesis. También hay reportes de la inhibición de la vía de NF- κ B y disminución de la proteína Bcl-2 y Bcl-xl proteínas asociadas a resistencia.²² Existen muchos anticuerpos monoclonales dirigidos contra blancos moleculares que son candidatos de tener un papel importante en tumorigénesis, tal como se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Anticuerpos monoclonales dirigidos contra blancos moleculares.

Anticuerpo	Blanco	Indicación aprobación FDA	Aprobado en Europa	Mecanismo de acción
Anticuerpos desnudos: Tumores sólidos				
Trastuzumab (Herceptin Genentech): Humanizado IgG1	ERBB2	ERBB2-positivo cáncer de seno, como agente único o en combinación con quimioterapia como adyuvante ERBB2-positivo carcinoma gástrico o carcinoma gastro-esofagico como primera línea en combinación con cisplatino y capecitabina o 5 fluorouracil	similar	Inhibición de señalización de ERBB2 y ADCC
Bevacizumab (Avastin; Genentech/Roche): IgG1 humanizada	VEGF	Línea primaria o secundaria en el tratamiento de cáncer de colon metastasico en conjunto con quimioterapia basada en 5-fluorouracil; primera línea en el	similar	Inhibición de la señalización de VEGF

		tratamiento de NSCLC avanzado		
Cetuximab (Erbix; Bristol Myers Squibb) IgGq quimérica humano murina	EGFR	En combinación con terapia de radiación para el tratamiento inicial local o avanzado SCCHN;	Similar	Inhibición de señalización de ERBB2 y ADCC
Panitumumab (Vectibix Amgen); IgG2 humana	EGFR	Como agente simple para el tratamiento o pretratamiento de carcinoma colorectal metastasico con expresión de EGFR	Similar	Inhibición de señalización de ERBB2
Ipilimumab (Yervoy; Bristol Myers Squibb); IgG1	CTLA4	Para el tratamiento de melanoma metastasico		Inhibición de la señalización de CTLA4
Anticuerpos desnudos: Tumores hematológicos				
Rituximab (Mabthera; Roche); igG1 quimerica humano murina	CD20	Para el tratamiento de NHL y CLL Linfocitos B positivos. Para mantenimiento de NHL folicular CD20 positivo	Similar	ADCC inducción directa de apoptosis y CDC
Alemtuzumab (Campath; Genzyme); igG1 humano	CD52	Como agente para el tratamiento de Leucemia linfocítica crónica.	Similar	Inducción directa de apoptosis y CDC
Ofatumumad (Arzera;Genmab)	CD20	Tratamiento para pacientes con CLL refractario a Fludarabina y alemtuzumab	Similar	ADCC y CDC
Anticuerpos conjugados: Tumores hematológicos				
Gemtuzumab oxogamicin (Mylotarg; Wyeth) IgG4 humanizada	CD33	Para el tratamiento de paciente con leucemia mieloide aguda con CD33 positiva	No aprobado	Liberación de toxina caliqueamicina

Brentuximab vedotin (Adcetris; Seattle Genetics): Igchimerica	CD30	Para el tratamiento de Linfoma y linfoma anaplásico refractarios	No aprobado	Liberación de toxina caliqueamicina
Y-marcado Ibritumomab tiuxetan (Zevalin; IDEC Pharmaceuticals) IgG1 murino	CD20	Tratamiento de LNH folicular o de bajo grado, refractario	Similar	Liberación del radioisótopo Y
I-marcado tositumomab (Bexxar; GlaxoSmithKline): IgG2 Murino	CD20	Tratamiento de pacientes con expresión de CD20, LNH refractario	Estatus de medicamento concedido en 2003	Liberación del radioisótopo I. Inducción directa de apoptosis

Actualmente la FDA tiene aprobados aproximadamente 30 anticuerpos monoclonales, así también tiene cerca de 150 en estudios clínicos.

Como ya se mencionó anteriormente los anticuerpos monoclonales son capaces de producir respuesta de diversas maneras, ya que pueden involucrar la activación del sistema de complemento, así también pueden actuar por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), en esta caso el dominio FC o fracción cristalizante es capaz de atraer a otras células ya sean efectoras como asesinas naturales (NK), polimorfonucleares (PMN), macrófagos, o bien a las células blanco. Otro de los mecanismos por los cuales pueden actuar los anticuerpos es mediante el bloqueo de factores de crecimiento o mediante inducción de arresto celular y apoptosis.

Además del uso de anticuerpos monoclonales, también se ha usado ampliamente otra estrategia la cual consiste en la unión covalente a toxinas o nucleótidos radioactivos. Los cuales según estudios clínicos de tumores xenograftos, ha demostrado tener más potencia que los anticuerpos sin conjugar, sin embargo también han mostrado niveles no aceptados de toxicidad por lo cual es una estrategia cuestionada ²³ Recientemente se ha aprobado el uso de los primeros anticuerpos conjugados que son Gemtuzumab (anti CD33/ozogamicina), Tositumomab (antiCD20/Iodo¹³¹) e ibritumomab (anti CD20/tituxetan)

Para que un anticuerpo monoclonal sea efectivo la elección del blanco es de suma importancia, dado que de ello depende que el anticuerpo pueda o no funcionar. Un blanco debe acercarse lo más posible a lo ideal siendo así que estos deben estar abundantemente presente y de manera universal en todas las células tumorales, no

así en las células normales donde deben estar ausentes o bien en muy poca presencia. ²¹

Los anticuerpos conjugados con isotopos, dadas sus características de radioactividad deben ser administrados muy cerca de la zona donde se encuentra el tumor. Existen dos tipos los cuales son acoplados a partículas alfa o partículas beta, cada una de ellas confiere diferentes características a los anticuerpos. Particularmente las partículas alfa tienen como característica que son pesadas, con movimiento nuclear lento con un rango corto de acción en el tejido y una alta energía lineal de transferencia, en comparación con las partículas beta que tienen un rango de 20 a 100 veces mayor y mucho menor energía lineal de transferencia. Las partículas beta son de efecto de fuego cruzado esto es que además de destruir a las células tumorales a las cuales se une directamente también ataca a las que no se ha unido, esta situación limita las dosis dado que también representa toxicidad sobre las células normales. Algunos ejemplos de estas partículas beta son yodo 131 (I^{131}), Itrio 90 (Y^{90}), y Renio 188 (Re^{188}). En contraste las la terapia con partículas beta tales como Bismuto 213 (Bi^{213}), astatina 211 (At^{211}), y actinio 225 (Ac^{225}), tienen un efecto más potente y con más especificidad para atacar solamente a células tumorales. ^{24,25}

Algunos compuestos químicos o toxinas bacterianas o de plantas, pueden ser conjugados a anticuerpos para incrementar su potencia y reducir la toxicidad de las toxinas al dirigir las a un blanco específico. Algunas toxinas usadas con frecuencia son la toxina diftérica (DT), calicheamicina, exotoxina A de *Pseudomonas* (PE), proteína viral de *Phytolacca* (PAP) y gelonina. ²³

CD40 como blanco terapéutico

Se han descrito varios mecanismos inmunológicos que son resultado de la interacción entre CD40/CD154, uno de ellos incluye a las células NK humanas que al activarse por IL12, expresan CD154 que reconoce el CD40 expresado en células blanco, es decir es una vía de activación para las células NK. Contrariamente a lo que sucede en linfocitos B normales, CD154 inhibe el crecimiento de linfocitos B malignos bloqueando el ciclo celular e induciendo apoptosis, de modo que esta puede ser una alternativa en las neoplasias que expresan CD40.

Existen diversos tratamientos que incluyen a CD154 tales como la administración sistémica de CD154, se ha establecido el empleo de antígenos tumorales en conjunto con CD154 incrementando de manera importante la respuesta contra estos antígenos, además se ha utilizado CD154 para inhibir la proliferación de líneas celulares en linfomas, así como el uso de anticuerpos anti-CD40 para inducir citotoxicidad, etc. ²⁶

Así también Dacetuzumab (SGN-40), que es un anticuerpo humanizado ha demostrado tener actividad antiproliferativa contra un panel de líneas celulares de linfoma de células B.

Dacetuzumab actúa uniéndose a CD40 e iniciando la señalización en células de linfoma activando vías de señalización que involucran a ERK ½, JNK y MAPK p38. La activación constitutiva de estas vías disminuye la expresión de oncoproteínas Bcl-6 y c-Myc en líneas celulares de linfoma mientras activa proteínas proapoptóticas como Fas y Bim.²⁷ Otros anticuerpos dirigidos vs CD40 han mostrado en estudios preclínicos una remarcada actividad terapéutica en el tratamiento de linfomas de células B.²⁸

Actualmente existen anticuerpos monoclonales anti-CD40 que han sido desarrollados y están en estudios clínicos, se muestran en la tabla 4:

Tabla 4. Anticuerpos monoclonales anti-CD40 en estudios clínicos

Anticuerpos monoclonales agonistas de CD40 en pruebas clínicas			
	CP-870, 893	Dacetuzumab	Chi Lob 7/4
Formulación	Humano	Humanizado	Químero
Isotipo	IgG2	IgG1	IgG1
Enfermedad	Melanoma Carcinoma pancreático Mesotelioma	Malignidades hematológicas especialmente linfoma No Hodgkin	Tumores sólidos, avanzados y linfomas
Combinaciones exploradas	Quimioterapia. Vacuna contra el melanoma Tremelimumab	Quimioterapia Rituximab	----

Anticuerpos monoclonales agonistas de CD40 en pruebas clínicas. Modificado²⁹

Interacción CD40-CD154

Diversos estudios han reportado que la molécula CD40 es importante en diversos procesos tumorígenicos. Esta proteína actúa como receptor de CD154. CD154 es una proteína tipo II miembro de la familia de TNF, que contiene 261 aminoácidos, con un dominio citoplasmático de 22 aminoácidos, un dominio transmembranal de 24 aminoácidos y un dominio extracelular de 215 aminoácidos el cual continúa un sitio único potencial de glicosilación.

CD154 consiste en dos hojas beta con una topología enrollada que forma un homotrímero simétrico plegado con tres sitios de unión cada uno creado por la interacción de dos monómeros. El gene que codifica para CD154 humano está localizado en el cromosoma X, posición Xq26.3-Xq27.1

En células no tumorales la interacción de CD40 con su ligando CD154 es importante dado que gracias a ella se llevan a cabo varias situaciones de los linfocitos B, tales como promoción del crecimiento y supervivencia, así también diferenciación de los linfocitos B, cambio de isotipo y producción de anticuerpos. En otras células también es esencial para la activación y diferenciación.³⁰

La interacción CD40 con su ligando (CD154), juegan un papel central en el control humoral y la inmunidad celular. La falta de CD154 en ratones knock out presenta alteraciones similares a el Síndrome de Hiper-IgM (HIGMX-1).³¹

CD40 se expresa de manera constitutiva en superficie de linfocitos B maduros e inmaduros, células dendríticas foliculares, progenitores hematopoyéticos, queratinocitos, células del epitelio basal, macrófagos, células endoteliales, células del epitelio tímico, fibroblastos, microglía, neuronas etc.³²

Por otra parte CD154 se encuentra en linfocitos TCD8 y CD4 que han sido activados a través del complejo TCR-MHC más la señal co-estimuladora, así también en linfocitos Th0, Th1 y Th2. Se ha demostrado también la expresión en basófilos, eosinófilos, mastocitos, células NK, monocitos células del endotelio vascular, células del músculo liso y plaquetas activadas.³³

Por estudios de homología, se han podido elaborar modelos tridimensionales de la interacción de CD40-CD154. Estos modelos muestran que CD154 forma un trímero y que CD40 se une al trímero de CD154 interactuando entre dos monómeros, este modelo propone que cada trímero de CD154 es capaz de unir tres moléculas de CD40.³⁴

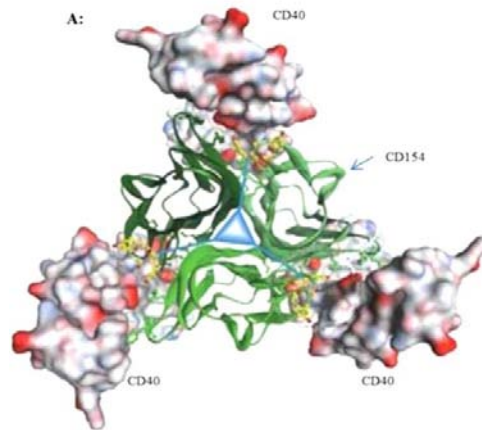


Figura 4. Esquema de interacción entre CD40 y CD154. Se muestra que se favorece la formación de trímeros. Modificado ³⁵

Mediante comparación y alineación con el TNF y la linfotoxina, datos cristalográficos y mutagénesis sitio dirigidas se identificaron las regiones de genes que hacen contacto con CD40.

Diversos estudios han podido evidenciar las regiones involucradas en la interacción, entre ellos el análisis de secuencias de CD154 en pacientes con HIGMX-1 el cual sugiere específicamente los aminoácidos K143, R203 y Q220. Por otro lado fracciones proteicas recombinantes de CD154 han demostrado que un fragmento soluble que incluye los residuos Y45-L261 fue capaz de inducir proliferación y cambio de isotipo. Otro fragmento de 18kDa que va del aminoácido E-108 al L-261 fue capaz de formar trímeros unir CD40 soluble e inducir proliferación. Con esto se sugiere que los aminoácidos que van de W-140 a S-149 son esenciales en la interacción con CD40. ³⁶⁻³⁸

Se ha reportado que el dominio extracelular de CD40 cristalizado, consiste en 170 aminoácidos y contienen tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), Cada CDR tiene de dos a tres puentes disulfuro que forman una estructura alargada similar a una escalera. Estos puentes son fundamentales para la estabilización de la estructura de CD40. El dominio extracelular de CD40 se une a una grieta entre pares de las subunidades de CD154 e interactúa con ambos de ellos. El área de interacción con CD154 derecho es de 611 Å² dos veces más grande que el de lado izquierdo que es 378 Å² ³⁹

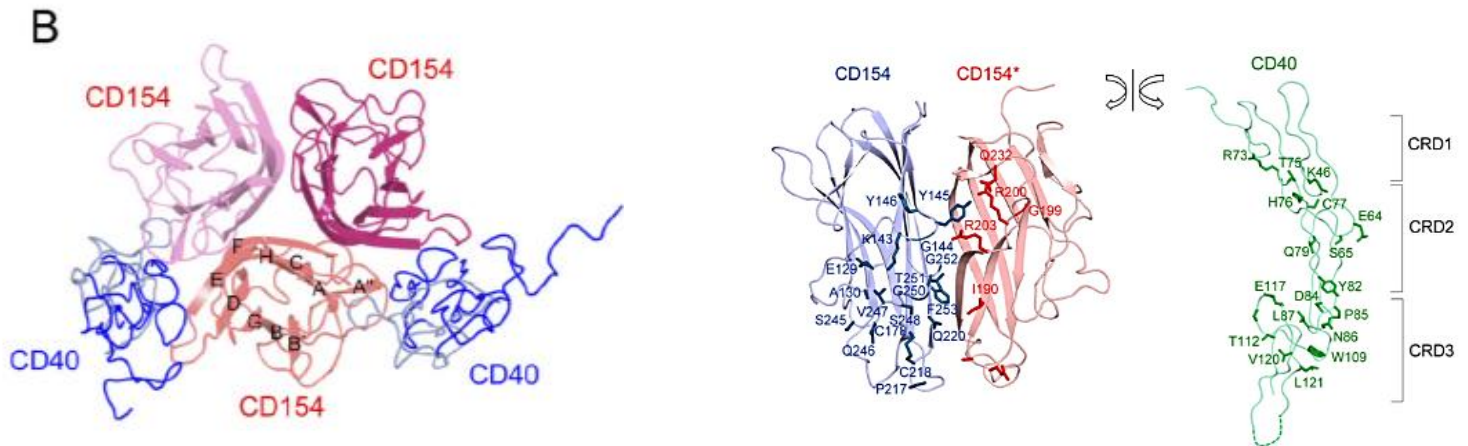


Figura 5 Esquema de cristalografía de interacción entre CD154 y CD40. Se giran para mostrar los sitios de interacción

Proteína de Fusión OmpC-154

Dentro del grupo de trabajo, se empleó la región de aminoácidos responsable de la interacción de CD154 con CD40, la región consta de diez aminoácidos (W. A. E. K. G. Y. Y. T. M. S.), que fue insertada en el asa cinco de la porina OmpC, esta porina demostró capacidad para conservar la estructura trimerica necesaria. Así también fue capaz de activar a líneas celulares de linfocitos B y linfocitos B de sangre periférica debido al incremento en la expresión de las proteínas MHC-II, CD23 y CD80, función que sucede a causa de interacción CD40/CD154 ⁴⁰

También dentro del grupo de trabajo se reportó que la inserción de la región W140-S149 de CD154 en la porina OmpC es capaz de unirse de manera específica a CD40 soluble o en células B humanas. Siendo este el primer reporte de una proteína de fusión capaz de unirse a su receptor específico e inducir activación de células B. ⁴⁰ Resultados preliminares en el laboratorio demostraron que la

Proteína quimérica OmpC/CD154 es capaz de inducir inhibición de proliferación y apoptosis en una línea celular de LNH que expresa CD40. Por lo que la finalidad de la presente tesis fue confirmar los hallazgos de que la proteína quimérica OmpC/CD154 es capaz de inducir apoptosis en líneas celulares de LNH y determinar la vía de apoptosis inducida por esta proteína.

Apoptosis

Los organismos multicelulares son una comunidad de células altamente organizada. El número de células de esta organización está regulada fuertemente no solo por el control del proceso de división celular, si no también existe un control del proceso de muerte celular. Cuando las células son innecesarias o se requiere recambio celular sucede un proceso de "suicidio celular" este "suicidio, conlleva la activación de un programa de muerte celular; este proceso se conoce como muerte celular programada y más comúnmente conocido como apoptosis palabra que viene del vocablo griego *apóptōsis*, que significa: *apó* "a partir de" + *ptōsis* "caída" ⁴¹

En organismos multicelulares la apoptosis juega varios roles esenciales; por ejemplo en el epiblasto de vertebrados, se eliminan a las células menos aptas, otro ejemplo muy claro es la remoción de células interdigitales durante la formación de las extremidades. También los excesos de células germinales masculinas son eliminados durante espermatogénesis temprana.

Durante toda la vida la muerte celular debe ser equilibrada con la proliferación celular, sobre todo en tejidos con alto recambio tales como el sistema hematopoyético y el epitelio intestinal. En el sistema inmune también juega un papel importante dado que células que no son funcionales o son peligrosas deben ser eliminadas. La muerte celular también impulsa la formación de conductos en la glándula mamaria así como la atrofia del timo con el envejecimiento.

La apoptosis es principalmente reconocida morfológicamente ya que implica varios cambios, tales como la formación de cuerpos apoptóticos en los cuales el contenido celular incluyendo núcleo y mitocondria se reduce y es rodeado por la membrana plasmática. Estos cambios también promueven la expresión de señales en la superficie de las células para atraer a células capaces de fagocitarlas y digerirlos en sus lisosomas.

Los primeros conocimientos moleculares en apoptosis, surgieron en los años 1980 y 1990 a partir de una notable convergencia de citogenética del cáncer y de la bioquímica con estudios genéticos pioneros sobre la muerte celular programada de desarrollo en *Caenorhabditis elegans*.

Actualmente se han descrito 2 vías de apoptosis que son la intrínseca o mitocondrial y la extrínseca o de receptores de muerte. La vía intrínseca es activada por un gran número de señales de estrés tales como daño al DNA causado por compuestos químicos o exposición a la radiación. Por el estrés celular se transmite una señal que conduce a la membrana externa mitocondrial a la liberación de numerosas proteínas pro-apoptóticas tales como citocromo C y SMAC DIABLO de la mitocondria al citosol. La familia de proteínas conocidas como BCL-2 son las responsables de la permeabilización de la membrana externa mitocondrial. Con la liberación del citocromo C inicia la formación de un complejo multiproteico conocido como apoptosoma, el cual consiste en citocromo c, factor activador de proteasa

apoptotica 1. (APAF1) y procaspasa 9, esto resulta en la activación de caspasa 9 y la consiguiente activación de caspasas río abajo. Por otra parte la liberación de SMAC de la mitocondria estimula la activación de las caspasas por la neutralización de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP's), que regulan la apoptosis Ver figura 6 Por otro lado la vía extrínseca es activada por la unión de los ligandos de muerte de la familia de factores de necrosis tumoral (TNF), con sus receptores TNF de superficie. Después de interacción ligando receptor, se forma un complejo multiproteico en la membrana plasmática que proporciona una plataforma de activación para Caspasa 8 y la posterior ejecución de caspasas.

Caspasa 8 por su parte puede actuar sobre otros sustratos diferentes de caspasas, uno de ellos es BID, que cuando es procesado se transloca a la membrana mitocondrial donde estimula la liberación del citocromo C y la activación de la vía intrínseca Ver figura 6. ⁴²

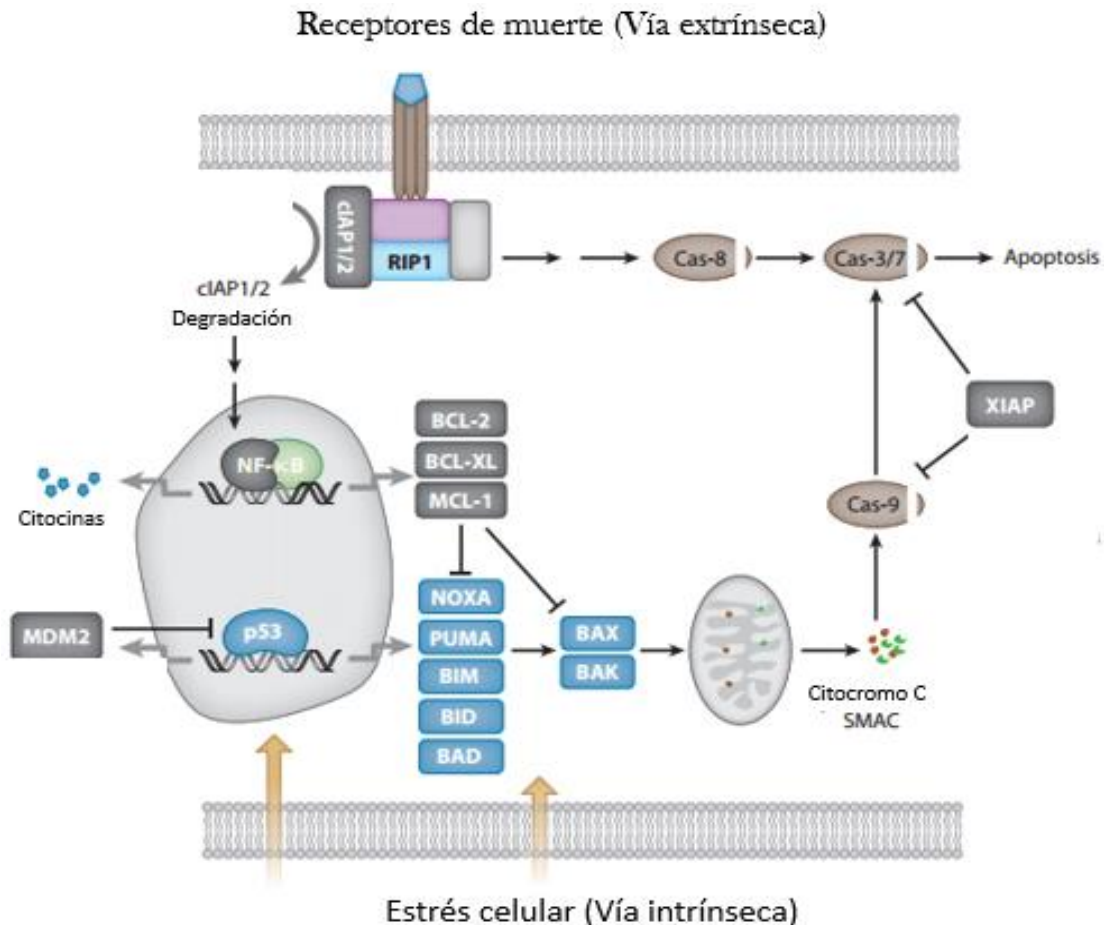


Figura 6 Modificado de "Targeting Apoptosis Pathways for New Cancer Therapeutic" ⁴²

Antecedentes directos.

En el grupo de trabajo se estudió la capacidad de la porina OmpC CD154 de promover apoptosis, para lo cual se realizaron experimentos con tratamientos con la porina OmpC CD154, porina nativa OmpC, así como un grupo control sin tratamiento y se analizó por citometría de flujo. Observando que las células tratadas con la proteína quimérica OmpC CD154 muestran una clara doble (85%), tinción para Anexina V y Ioduro de Propidio, a partir de las 6 horas de tratamiento indicando la capacidad de producir apoptosis en la línea celular Raji, observando un efecto mucho más marcado a las 24 horas donde se pudo observar mejor inducción de apoptosis (Pantoja-Escobar en Congreso de la Rama de Transducción de Señales)

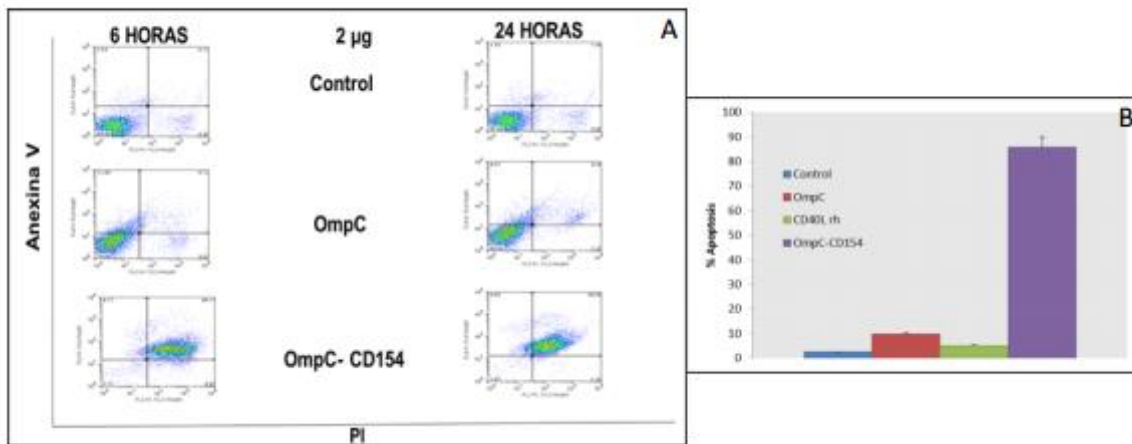


Figura 7 Análisis por citometría de flujo de la inducción de apoptosis con ioduro de propidio y anexina V. (tomado de Pantoja-Escobar Resumen de Congreso de la Rama de Transducción de Señales)

Lo anterior mencionado permite proponer el uso de esta proteína como una potencial terapia de linfoma no Hodgkin con base en la evidencia de unión a su receptor CD40 el cual se haya sobre expresado en las células de linfoma no Hodgkin

Justificación

En México, como a nivel mundial el cáncer es un problema de salud persistente con un importante impacto en los aspectos de salud y economía. En la actualidad se cuenta con terapias más efectivas que combinan agentes químicos con agentes biológicos. Sin embargo aún existen un número importante de pacientes que no responden o muestran una respuesta adecuada a las terapias actuales. Diversos reportes han colocado a CD40 como un blanco específico para el tratamiento específicamente de linfoma. En el caso específico de linfoma se ha hecho uso de anticuerpos anti-CD40, sin embargo, se han reportado problemas con la biodisponibilidad, es por ello que el uso de la proteína quimérica OmpC-CD154 la cual ha demostrado gran estabilidad a condiciones biológicas adversas que a su vez se traduciría en una mejor biodisponibilidad, podría representar una alternativa eficaz para el tratamiento del linfoma.

Planteamiento del Problema

Diversos estudios han reportado que la activación a través de la vía de CD40 mediante el uso de anticuerpos de reconocimiento específico (anti-CD40), es capaz de producir apoptosis en líneas celulares de linfoma. Es por ello que la molécula CD40 es un blanco importante para la inmunoterapia. En este trabajo se empleó la proteína quimérica OmpC CD154 como tratamiento en líneas celulares de linfomas humanos en un modelo *in vitro* y establecer la capacidad en la inducción de apoptosis y la vía de señalización involucrada. Esta proteína quimérica ha demostrado tener efecto sobre la viabilidad de las líneas celulares así como en la inducción de apoptosis. Sin embargo aún se desconocen los mecanismos por los cuales actúa.

Hipótesis

El empleo de la proteína quimérica OmpC CD154 en líneas celulares de Linfoma No-Hodgkin humano inducirá apoptosis a través de la vía CD40-CD154

Objetivo General

Determinar el efecto de la proteína quimérica OmpC CD154, en líneas celulares de linfoma humano, estableciendo los mecanismos de señalización involucrados en la posible inducción de apoptosis a través de la vía CD40/CD154.

Objetivos Específicos

Producción y purificación de la proteína quimérica OmpC CD154

Determinar si la proteína quimérica OmpC CD154 es capaz de inducir apoptosis en líneas celulares de Linfoma no-Hodgkin

Determinar si la proteína quimérica OmpC CD154 es capaz de inducir inhibición de la proliferación celular en líneas celulares

Determinar la vía de apoptosis en líneas celulares de linfoma no Hodgkin

Materiales y Métodos

Cepas Bacterianas y condiciones de cultivo

Escherichia coli DH5 α (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) ϕ F80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 end A1 hsdR17(r+, m) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1. *Escherichia coli* UH302: OmpC⁻, OmpF⁻. Las cepas bacterianas se transformaron con los plásmidos PST13 y PST13- cd154 y se cultivaron en medio Luria-Bertani (Gibco, BRL, Life Tech, Gaithersburg, MD) en medio sólido y caldo a 37 °C con 100 μ g/mL de ampicilina (Sigma, St. Louis, MO). El vector PST13 contiene el gene que codifica para la proteína OmpC de la *Salmonella enterica* serovar Thyphi (Agüero et al., 1987). El vector PST13 – CD154 tiene una sustitución en la región que codifica para el asa cinco de la porina OmpC por la secuencia que codifica el péptido Tyr140-Ser149 de CD154 ⁴⁰

Purificación de las proteínas quimérica OmpC CD154 y OmpC recombinante.

La purificación se realizó con base a la metodología reportada por Arockiasamy (Arockiasamy & Krishnaswamy, 2000). Brevemente, la purificación de las porinas se realizó a partir de un cultivo de las cepas de *E. coli* UH302 transformadas con pST13 que contiene el gene de la porina OmpC o bien con el vector que contiene el gen quimérico OmpC CD154 estas se cultivaron a 37 °C durante 18 h en medio sólido por estría cruzada, para aislar las colonias resistentes a ampicilina (100 μ g/mL) una vez aisladas se cultivaron en 4 litros de caldo Luria (Gibco BRL), incubado por 14 h a 37 °C y 200 rpm. Las células se centrifugaron a 2,399 x g por 30 min a 4 °C rotor 22.1 centrífuga Hermle Z36 HK (Hermle, Wehingen Alemania). La pastilla se lavó dos veces con solución salina al 0.9% y se centrifugó a 2,399 x g por 30 min, la pastilla final se guardó toda la noche a -20 °C (la pastilla fue de 17 g para la UH302 pST13 y de 11 g para la UH302 pST13-CD154). La pastilla se descongeló a 4 °C y se resuspendió en una solución de Tris-HCl 0.1 M (pH 7.2) y sometida a una prensa French a 20,000 psi 40K Cell Press (Thermo Scientific), con un flujo de 1 mL por min, las células lisadas se centrifugaron a 8,904 x g Rotor 70Ti (Beckman Coulter) por 10 min a 4 °C para remover las células no lisadas. El sobrenadante se centrifugó a 66,226 x g por 90 min a 4 °C usando una ultra centrífuga Optima L-100XP rotor 70 Ti (Beckman Coulter). La pastilla que contenía las membranas crudas se resuspendió en 100 mL de la solución I (Tris-HCl 50 mM, pH 7.7 MgCl₂ 10 mM y 2% de SDS) y se incubaron a 37 °C por 18 h en agitación. La suspensión se centrifugó a 10,596 x g por 30 min a 20 °C, la pastilla se resuspendió en 28 mL de la solución II (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10mM, EDTA 5mM, SDS 1% y 0.05% de β -ME, adicionado justo antes de su uso). Esta suspensión se incubó a 37 °C por 2 h y posteriormente se centrifugó a 10,596 x g por 30 min a 20 °C. La pastilla se resuspendió en 9 mL de la solución III (Tris-HCl 50mM, EDTA 5 mM, 0.2% de SDS, NaCl 0.4M y 0.05% de beta-ME). La suspensión se incubó por

2 h a 37 °C y se centrifugó a 10,596 x g por 20 min a 20 °C. El sobrenadante rico en porinas se recolectó y se guardó a temperatura ambiente. El paso anterior se repitió por lo menos cinco veces con 4 ml de la solución III. Las proteínas se analizaron por SDS- PAGE y se dializaron contra la solución IV (NaHCO₃ 10 mM, HEPES 10 mM) a 25 °C por 20 min, las proteínas se esterilizaron por filtración.

Líneas celulares

Se utilizaron la línea celular de linfoma No-Hodgkin: Raji (The American Type Culture Collection), cultivada en medio RPMI Advance (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) con SFB 4% (PAA, Australia).

Electroforesis

Se cultivaron las líneas celulares a una densidad de 1x10⁶ células/pozo en 2 mL de medio de cultivo en microplacas de cultivo celular de 6 pozos, con fondo 39 plano. Se incubaron las células tratadas con las proteínas OmpC, OmpC CD154 o CD154rh (a una concentración de 2 µg/mL) por 12, 18, 36 o 48 h a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 5%. Se lavaron las células con PBS (Bio-rad) estéril, se centrifugaron las células a 2790 x g centrifuga Hermle Z36HK (Hermle, Wehingen Alemania) y se colocaron en microtubos, se adicionaron 20-40 µL de Buffer de lisis Mper, (Pierce, Thermo scientific, Waltham, MA). Los lisados celulares fueron cuantificados con un espectrofotómetro empleando el método de Lowry y posteriormente fueron hervidos, después de adicionar regulador de carga, Laemmli buffer, (Bio-rad) por 10 min en un baño maría. Se prepararon geles de acrilamida para el corrimiento electroforético en una cámara mini-blot (Bio-rad), con un regulador de tris-glicina-SDS (Bio-rad) y con condiciones de corrimiento: 90 min a 80 volts.

Western Blot

Los geles obtenidos de la electroforesis se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa usando un transfer (Bio-rad) con condiciones de 60 min a 100 volts. Después las membranas fueron bloqueadas usando leche sin grasa al 5% (Bio-rad) durante 1 h en agitación constante, después se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios dirigidos a caspasas 3, 8 y 9, BID y JNK. Durante toda la noche en agitación constante a 4 °C. Se realizaron 3 lavados con agitación con TBS-Tween 20 0.1% (5 min) y se incubó con el anticuerpo secundario por una hora, se hicieron 3 lavados y se reveló por el método de infrarojo mediante el uso del equipo Odyssey CLx de Licor que permite la detección de proteínas por adición de anticuerpos específicos marcados con colorantes fluorescentes infrarojos. IRDye y VRDye. Optimizando así la detección de las bandas de proteínas

Resultados

Purificación de las proteínas quimérica OmpC CD154 y OmpC recombinante.

Las cepas bacterianas UH302 que contienen los vectores pST13 y pST13-CD154, fueron cultivadas a 37°C durante 18 horas en placas de agar de medio Luria-Bertani (Gibco, BRL, Life Tech, Gaithesburg, MD) por estría cruzada, con el fin de aislar colonias resistentes a ampicilina, debido a que los vectores mencionados contienen el gen de resistencia a dicho antibiótico. Una vez aisladas las cepas que contenían los vectores se sembraron en medio líquido Luria-Bertani (Gibco, BRL, Life Tech, Gaithesburg, MD) para crecerlas en cultivos masivos (4 litros de cada cepa). Se purificaron por el método descrito por Arockiasami (Arockiasami & Krishnaswamy 2000), descrito en la sección de Materiales y Métodos.

La pureza de las porinas OmpC y OmpC CD154 y su disposición trimérica se demostró mediante análisis electroforético. (Figura 8) El análisis por electroforesis muestra las bandas correspondientes a los pesos esperados 108 KDa para muestras sin desnaturalizar (carril A y C) y 36 KDa para muestras desnaturalizadas por calor (carril B y D). Lo que nos permitió demostrar la pureza de las proteínas y su capacidad de formar trímeros.

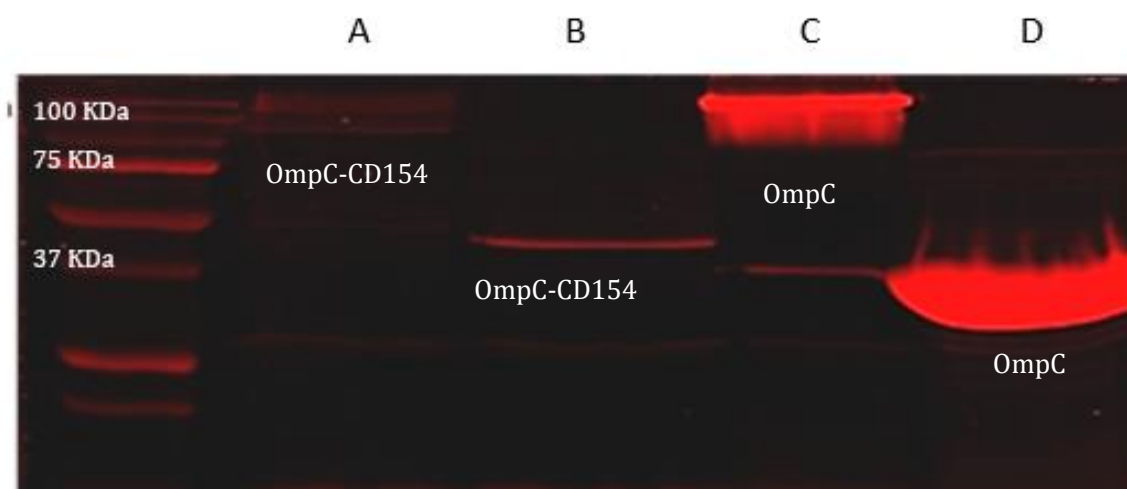


Figura 8. Análisis electroforético de las proteínas OmpC y la proteína quimérica OmpC CD154. Se realizó un corrimiento en gel de acrilamida y posteriormente se tino con azul de Coomassie y se analizó mediante un equipo infrarrojo. Se muestra claramente el corrimiento trimérico (carril A y C) y monomérico (carril B y D) de cada proteína.

Efecto de la proteína quimérica OmpC CD154 sobre la viabilidad celular de LNH

Para analizar si la proteína quimérica OmpC CD154 es capaz de afectar la viabilidad celular de líneas celulares de LNH que expresan CD40. Se trató la línea celular de LNH Raji con 2 $\mu\text{g/ml}$ de la proteína OmpC y OmpC CD154, y la proteína recombinante trimérica de CD154 y se analizó la viabilidad celular mediante exclusión con azul de tripano. Los resultados muestran que la proteína quimérica OmpC CD154 es capaz de disminuir la viabilidad más del 40% de la línea celular Raji en comparación con el tratamiento con proteína OmpC e incluso en comparación con el ligando trimérico recombinante humano de CD40 que la disminuyó menos del 40%. Esta disminución fue estadísticamente significativa ($p=0.005$) (Figura 10)

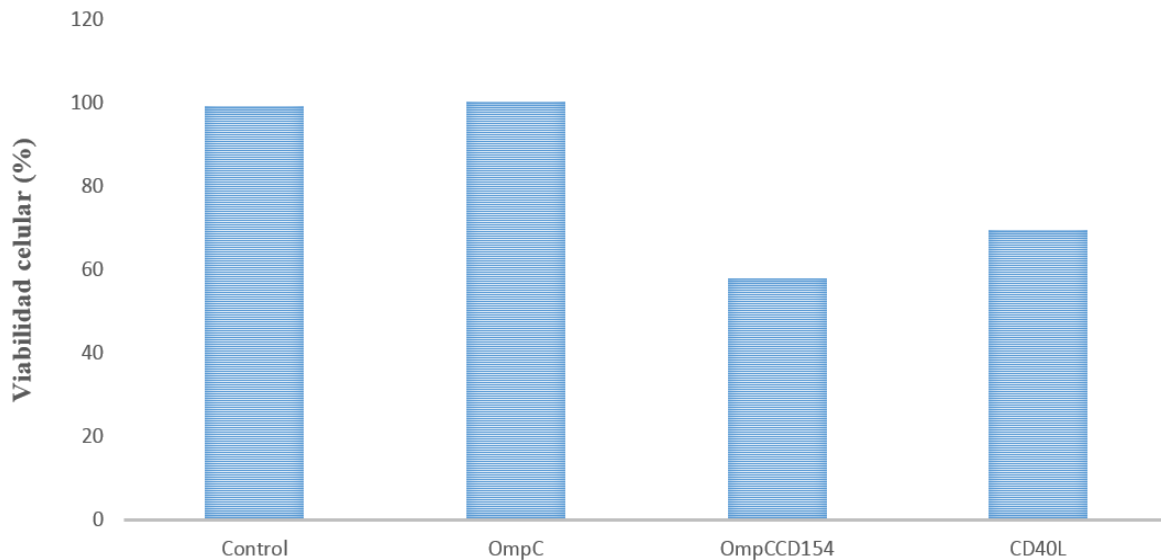


Figura 9. Evaluación del efecto de la proteína quimérica OmpC CD154 en la viabilidad celular de la línea celular Raji. Se determinó la viabilidad celular por exclusión con azul de tripano. Después del tratamiento por 24 horas con las diferentes condiciones, control sin tratamiento, OmpC, OmpC CD154 (2 $\mu\text{g/ml}$) y CD40L, se observa una menor viabilidad con la presencia de OmpC CD154 en comparación con la proteína OmpC * $p=0.005$ y del control sin tratamiento.

Para corroborar el efecto de la proteína quimérica OmpC CD154 sobre la línea celular Raji, analizamos la viabilidad celular mediante un contador de células semi automatizado como se describe en materiales y métodos. Los resultados muestran que la proteína quimérica OmpC CD154 inhibe la viabilidad celular de manera muy similar a como se determinó por exclusión con azul de tripano (Figura 10). Los resultados muestran que la proteína quimérica inhibe más del 50% la viabilidad celular comparada con el control sin tratamiento o comparado con la proteína OmpC. ($p=0.005$)

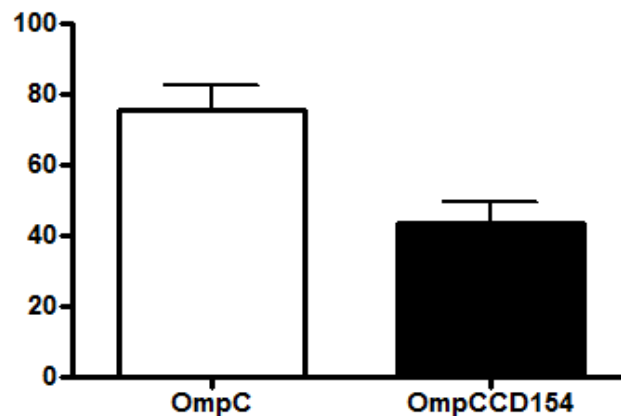


Figura 10. **Evaluación del efecto de la proteína quimérica OmpC CD154 en la viabilidad celular de la línea celular Raji.** Se determinó la viabilidad celular por exclusión por medio de un equipo semi automatizado TC10TM Automated Cell Counter de BioRad. Después del tratamiento por 24 horas con las diferentes condiciones, control sin tratamiento, OmpC, OmpC CD154 (2 $\mu\text{g/ml}$). Se muestra el análisis de la comparación entre la proteína OmpC control y la proteína quimérica OmpC-CD154 donde se observa una menor viabilidad con la presencia de OmpC CD154 en comparación con la proteína OmpC ($\approx 50\%$) ($p=0.005$).

Efecto de la proteína quimérica OmpC CD154 sobre la proliferación de la línea celular de LNH Raji

Para determinar si la proteína quimérica OmpC CD154 además de afectar la viabilidad celular también es capaz de afectar la proliferación celular. Se analizó la proliferación celular después del tratamiento con la proteína quimérica OmpC CD154 de la línea celular de LNH Raji, la cual se trató con 2 $\mu\text{g/ml}$ de las proteínas OmpC u OmpC-CD154 o el control positivo CD154 recombinante y el control negativo sin tratamiento, por 6, 12 o 24 horas y se determinó proliferación celular por un kit comercial de XTT, como se describe en materiales y métodos siguiendo las recomendaciones del fabricante. Como se muestra en la Figura 11, la proteína OmpC CD154 demostró tener un efecto de inhibición de la proliferación superior a las demás condiciones a partir de las 6 horas de tratamiento, siendo más pronunciado después de las 12 horas donde se observa una inhibición superior al 50 %, que se mantiene muy similar hasta las 24 horas de tratamiento. Esta inhibición fue estadísticamente significativa a partir de las 12 horas de tratamiento. ($p= 0.005$)

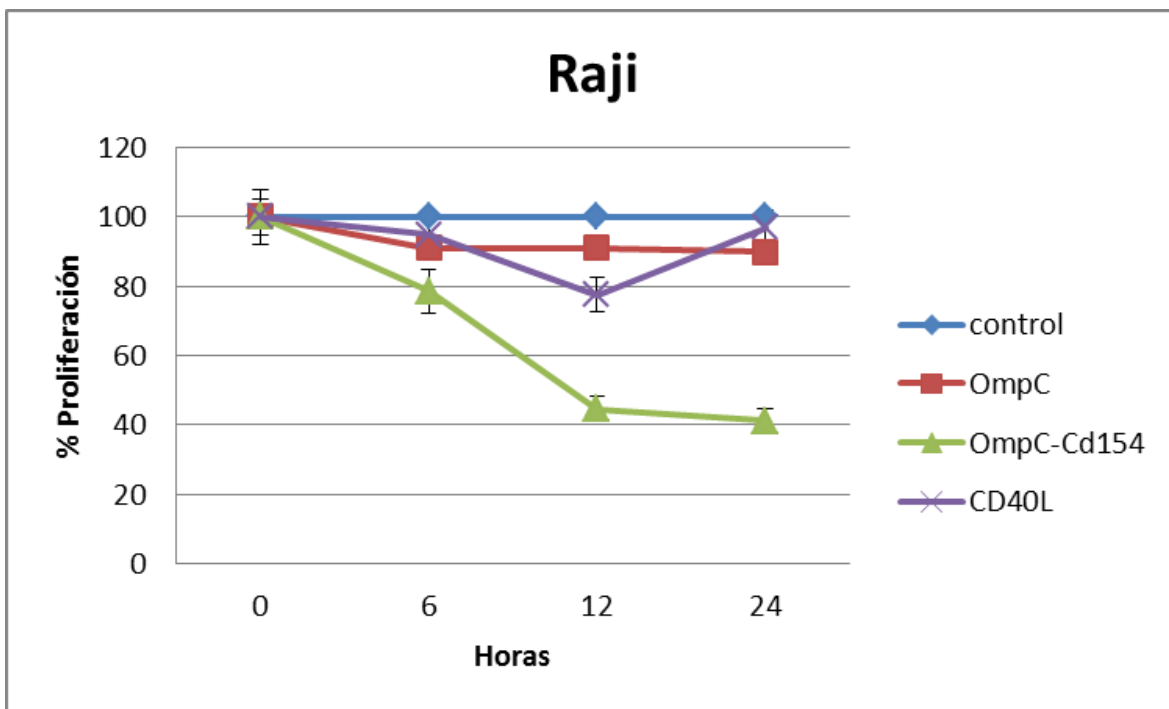


Figura 11. El tratamiento con la proteína quimérica OmpC CD154 de la línea celular de LNH Raji inhibe su proliferación. La línea celular Raji fue tratada con la proteína OmpC o la proteína quimérica OmpC-CD154 (2 $\mu\text{g/ml}$) por 6, 12 o 24 horas y se determinó la proliferación celular mediante la técnica de MTT. Se observa una afectación de la proliferación celular con el tratamiento con proteína OmpC CD154 a las 6, 12 y 24 horas ($p= 0.005$).

El tratamiento con la proteína quimérica OmpC CD154 induce apoptosis dependiente de activación de caspasas en la línea celular de LNH Raji.

Como se mencionó previamente, resultados en nuestro laboratorio muestran que el tratamiento con la proteína quimérica OmpC CD154 de líneas celulares de LNH induce apoptosis determinado por tinciones con Ioduro de Propidio y Anexina V (Figura 14). En este trabajo nos dimos a la tarea de determinar la vía de inducción de apoptosis en la línea celular de LNH Raji. Para evaluar la posible vía de inducción de apoptosis en esta línea celular analizamos la presencia de caspasas activas por western blot. Considerando que la proteína quimérica OmpC CD154 se une a la proteína CD40 expresada en la membrana celular de las líneas celulares de LNH donde ejerce su efecto biológico, analizamos en un principio la vía de inducción de apoptosis mediada por receptores, analizando la activación de Caspasa 8. Como se muestra en la Figura 12, la proteína quimérica OmpC CD154 es capaz de inducir una disminución de la pro-caspasa 8, lo que nos indica que induce el procesamiento de la pro caspasa a caspas 8 activa. La proteína OmpC no induce procesamiento de la pro-caspasa 8 al igual como el control, mientras que el control positivo la proteína recombinante CD154 si lo hace. Se analizó el procesamiento de la pro-caspasa 8 por Western Blot (Figura 12 A). El análisis desitométrico Mediante el uso del software ImageStudioLite 4.0® se confirma que existe una disminución de la pro-caspas 8 en las células tratadas con la proteína OmpC CD154 (FIGURA 12 B)

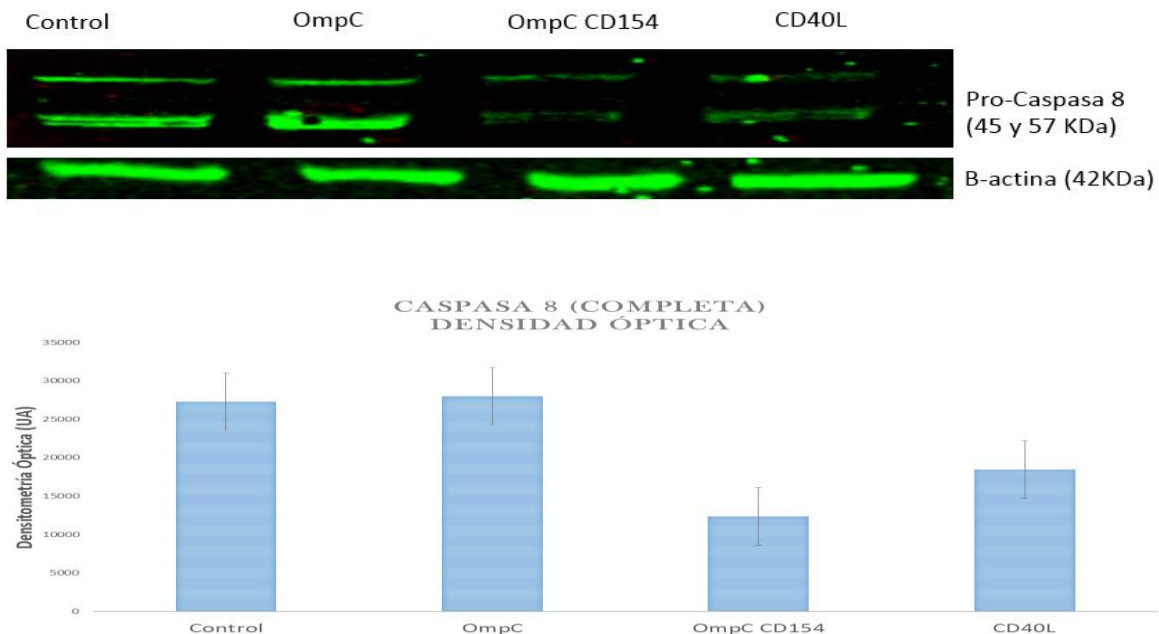


Figura 12. Procesamiento de la pro-caspasa 8. A) Se muestra la banda correspondiente a la caspasa 8 completa posterior al tratamiento con proteína quimérica OmpC CD154, OmpC, CD40L y control. La expresión disminuye con el tratamiento de OmpC CD154 y el control positivo CD40L. B) Se evaluó por densitometría de píxeles con el uso del software Image Studio Lite 4.0 ® la expresión de Pro-caspasa en células Raji con las diferentes condiciones Control, OmpC, OmpC CD154, CD40L. Se evidenció una mayor expresión de la caspasa 3 activa con OmpC CD154 y el control positivo CD40L

Caspasa 9

En este estudio también analizamos la posible participación de la vía intrínseca de la apoptosis. Por lo que analizamos la posible inducción del procesamiento de la caspasa 9 por el tratamiento con la proteína quimérica OmpC CD154. Se analizó el procesamiento de la pro-caspasa 9 por Western Blot (Figura 13 A). En comparación con los tratamientos con la porina OmpC y el la proteína humana recombinante de CD154. Interesantemente el tratamiento con la proteína quimérica OmpC CD154 también induce un procesamiento de las pro-caspasa 9 de manera muy similar con el control positivo. La pro-caspasa nueve mostró disminución mayor al que se produce en las otras condiciones antes mencionadas. Mediante el uso del software ImageStudioLite 4.0® se realizó un análisis densitométrico para evaluar la presencia de la pro-caspasa 9 y se comparó con los diferentes tratamientos

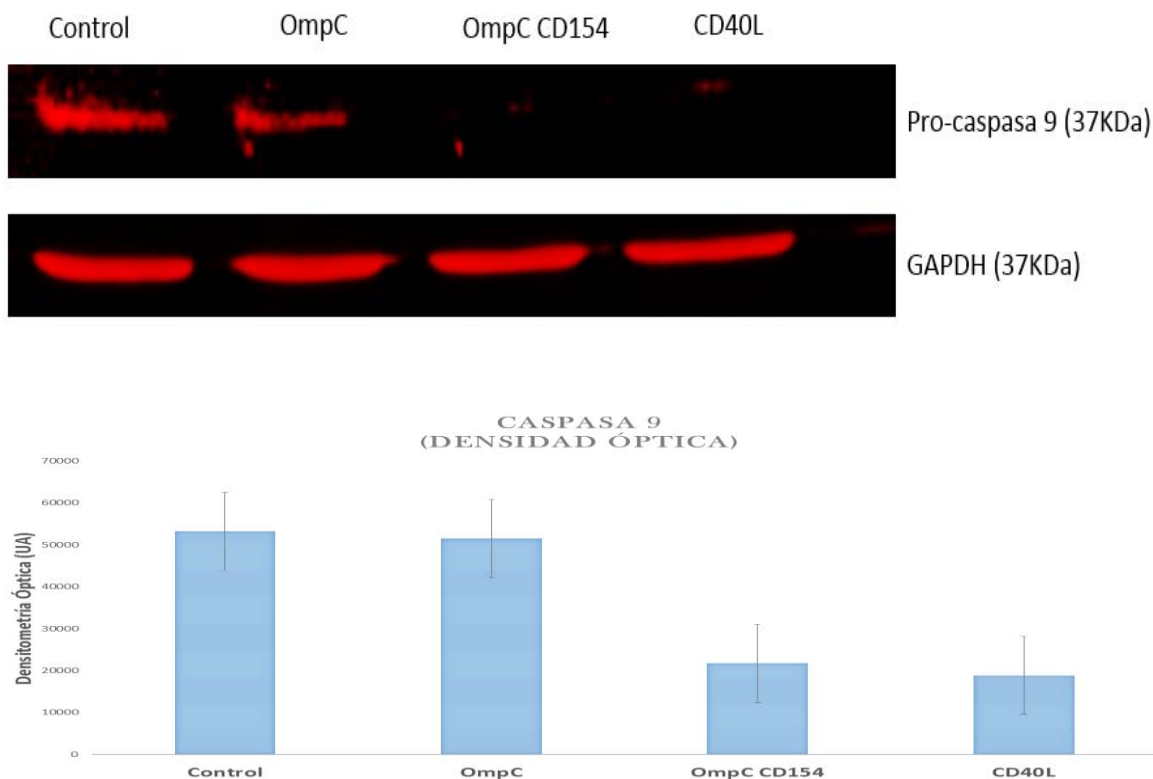


Figura 13. Inducción del procesamiento de la pro-caspasa 9 por el tratamiento con la proteína quimérica OmpC CD154. A) Se muestra la banda correspondiente a la pro-caspasa 9 posterior al tratamiento con porina OmpC CD154, OmpC, CD40L y control. La expresión disminuye con el tratamiento de OmpC CD154 y el control positivo CD40L. **B)** Se evaluó por densitometría de píxeles con el uso del software Image Studio Lite 4.0 ® la expresión de la pro-caspasa 9 en células Raji tratadas con las diferentes condiciones Control, OmpC, OmpC CD154, CD40L. Se evidenció una disminución de la expresión de la caspasa 9 con OmpC CD154 y el control positivo CD40L.

Caspasa 3

Con la finalidad de conocer si la activación de ambas vías de inducción de apoptosis (intrínseca y extrínseca) determinadas por el procesamiento de las caspasas 8 y 9 respectivamente conllevaba a la subsecuente activación de la caspasa efectora 3, analizamos la activación de la pro-caspasa 3 por western blot en células tratadas con la proteína químerica OmpC CD154. Como se muestra en la Figura 14 la proteína OmpC CD154 induce activación de la pro-caspasa 3 de forma similar al control positivo y lo que no sucede con la porina OmpC. Se observa una clara disminución de la pro-caspasa 3 y un ligero incremento en la caspasa 3 activa (17KDa). Al igual que en los casos de las caspasas 8 y 9 se realizó un análisis densitométrico mediante el uso del software ImageStudioLite 4.0® y se evaluó la presencia de la caspasa 3 activa y se comparó por análisis de densitomería de pixeles los diferentes tratamientos.

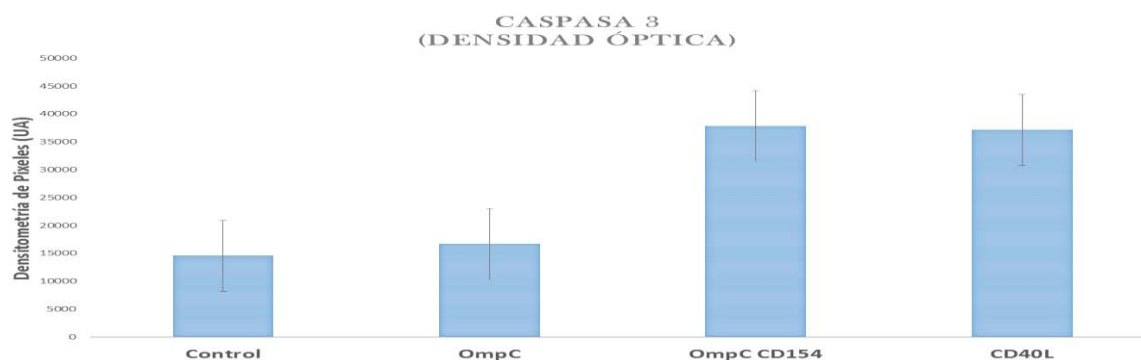
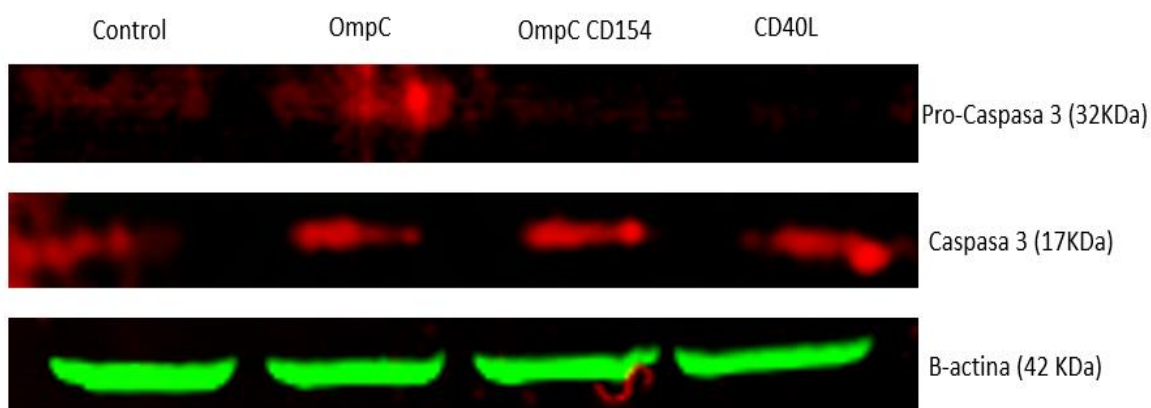


Figura 14. Inducción de la activación de Caspasa 3 mediante el tratamiento con la proteína químerica OmpC CD154 en la línea celular de LNH Raji. A) Se evaluó la expresión de caspasa 3 activa por western blot en células Raji con los diferentes tratamientos. Se usó beta-actina como control de carga. **B)** Se evaluó por densitometría con el uso del software Image Studio Lite 4.0® la expresión de caspasa 3 activa en células Raji con las diferentes condiciones Control, OmpC, OmpC CD154, CD40L.

BID

Dados los resultados obtenidos en los cuales se observó una activación de caspasa nueve que pertenece a la vía intrínseca, así como de caspasa 8 que es de la vía extrínseca; se procedió a analizar la proteína BID la cual se ha reportado como vínculo entre ambas vías de apoptosis mediada por caspasas. Esta proteína funciona al truncarse para posteriormente actuar sobre la mitocondria para iniciar la liberación de proteínas que conllevaran a apoptosis con la formación del apoptosoma, finalizando con la activación de caspasa 3. Analizamos entonces la expresión de BID la cual se encuentra claramente disminuida en presencia de proteína quimérica OmpC CD154 y CD40L en comparación con el control y con OmpC. (FIGURA 15 A). Se realizó también un análisis densitométrico con el software ImageStudioLite 4.0®. Para comparar por densitometría de pixeles la expresión de BID (FIGURA 15B)

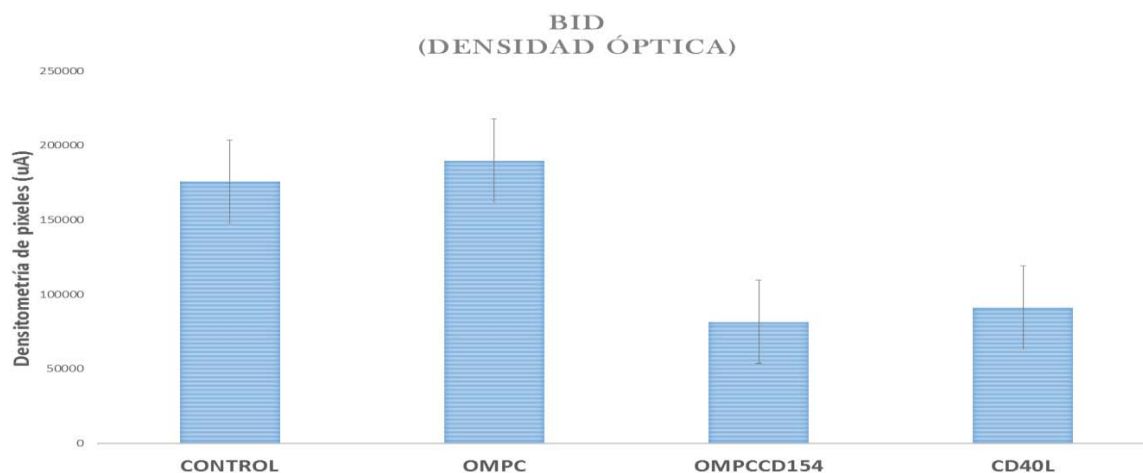
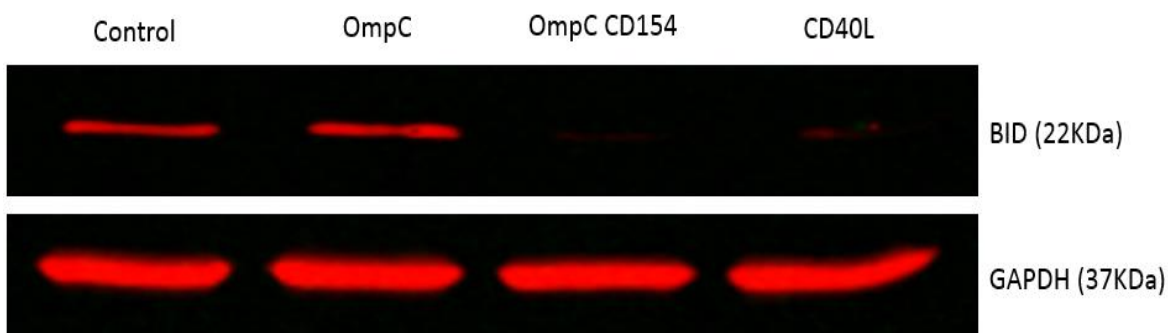


Figura 15 A.. Expresión de BID. Se evaluó la expresión de la proteína BID posterior al tratamiento con porina OmpC CD154, OmpC, CD40L y control por western Blot. La expresión disminuye con el tratamiento de OmpC CD154 y el control positivo CD40L. **B)** Se evaluó por densitometría de pixeles con el uso del software Image Studio Lite 4.0 ® la expresión de BID en células Raji con las diferentes condiciones Control, OmpC, OmpC CD154, CD40L. Se evidenció una disminución de la expresión de BID con OmpC CD154 y el control positivo CD40L.

Phosfo-SAP/JNK

Finalmente se analizó la proteína JNK, la cual esta reportada como responsable de activar a la caspasa 8 al fosforilarse como consecuencia de la interacción CD40/CD154. Por esta razón se analizó mediante westernblot la expresión de la proteína JNK fosforilada. En comparación con los tratamientos con porina OmpC y el ligando humano recombinante de CD40. Fosfo-SAP/JNK mostró aumento mayor al que se produce en las otras condiciones antes mencionadas. (FIGURA 16 A). Mediante el uso del software ImageStudioLite 4.0® se evaluó la presencia de fosfo-SAP/JNK activa y se comparó por análisis de densitometría de pixeles los diferentes tratamientos (Figura 16 B).

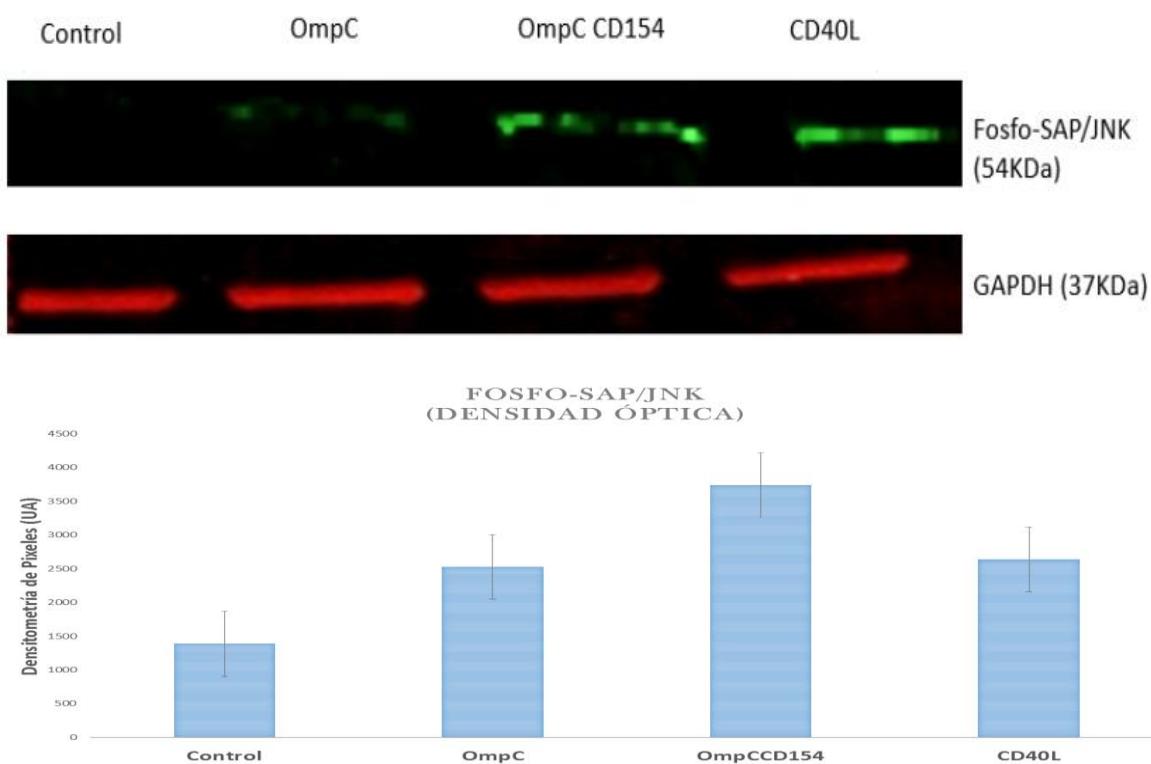


Figura 16 A. Expresión de JNK.A) Se muestra la banda correspondiente a la JNK fosforilado posterior al tratamiento con porina OmpC CD154, OmpC, CD40L y control. La expresión aumenta con el tratamiento de OmpC CD154 y el control positivo CD40L. **B).** Se evaluó por densitometría de pixeles con el uso del software Image Studio Lite 4.0 ® la expresión de BID en células Raji con las diferentes condiciones Control, OmpC, OmpC CD154, CD40L. Se evidenció una disminución de la expresión de BID con OmpC CD154 y el control positivo CD40L.

Discusión de Resultados

A lo largo del estudio de la biología del linfoma, diversos estudios han implicado la participación de CD40 con su desarrollo, así como en otros tipos de cáncer y es mediante su interacción con su ligando CD154 que se cree induce un papel oncogénico. De manera normal la interacción de CD40/CD154 es importante para el desarrollo, promoción, crecimiento y supervivencia de los linfocitos B, así también está involucrado en el cambio de isotipo y producción de anticuerpos.⁴⁰ Así también se ha demostrado que es esencial para la activación y diferenciación de otras células como células dendríticas y linfocitos T CD8 (Ridge *et al.*, 1998; Bennett *et al.*, 1998). En procesos malignos CD40 tiene una importante participación. Ya que se ha demostrado que en procesos malignos la presencia de CD154 soluble es crucial para la permanencia y malignidad de cáncer de pulmón. Diferentes estudios han demostrado que el uso de anticuerpos dirigidos contra CD40 ha tenido un efecto positivo en el tratamiento contra el cáncer.²⁷ Ya sea por no permitir su interacción con su ligando CD154 o por un efecto directo del anticuerpo. Luego entonces, CD40 es un blanco terapéutico importante para el desarrollo de nuevas estrategias.

Considerando estas observaciones, dentro del grupo de trabajo se desarrolló la modificación por inserción de aminoácidos de una región de CD154 que se ha demostrado es la implicada en la unión con CD40 en la porina OmpC de *Salmonella typhi*. Esta proteína quimérica denominada OmpC CD154, ha demostrado capacidad para unirse de manera efectiva a su receptor CD40.⁴⁰ Estudios previos en el laboratorio Demostraron que la proteína quimérica OmpC CD154 es capaz de inducir inhibición de la proliferación y viabilidad celular en líneas celulares de LNH, así como de muerte celular por apoptosis. Sin embargo se desconocía la vía o las vías de inducción de apoptosis de esta proteína, por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar el mecanismo por el cual se produce la apoptosis de la línea celular Raji mediante el tratamiento con la porina OmpC CD154.

La proteína quimérica OmpC CD154 demostró tener capacidad de disminuir la viabilidad celular de la línea celular Raji en comparación con los controles como la porina OmpC nativa, esto de manera consistente con resultados previos en el laboratorio. También fue consistente con su capacidad de inhibir la proliferación celular, y nuevamente el efecto de la proteína quimérica es de forma significativa al de los controles. Con lo que podemos concluir que el tratamiento con la OmpC CD154 tiene un efecto importante en la línea celular Raji de Linfoma no Hodgkin. Como ya se mencionó el principal objetivo de este trabajo fue determinar el mecanismo por el cual la proteína quimérica OmpC CD154 induce apoptosis. Por lo que se determinó la activación de caspasa 3 ya que es considerada como un punto de no retorno en el proceso de apoptosis. Se observó que el tratamiento con OmpC CD154 tiene un efecto muy evidente en la activación de esta caspasa en la línea

celular Raji. La disminución de la Pro-caspasa 3 aunada al aumento de la caspasa 3 activa nos indica que el tratamiento induce apoptosis mediada por caspasas.

CD40 es un receptor de membrana miembro de la superfamilia del receptor TNF, lo que lleva a pensar que la apoptosis ocurre por vía extrínseca, para ello se analizó la expresión de pro caspasa 8. Posterior al tratamiento con las diferentes condiciones se encontró que OmpC CD154 es capaz de producir una disminución de la pro-caspasa 8 similar al control positivo del ligando recombinante de CD40, lo cual indica que esta vía se activa al tratamiento con OmpC CD154. Así también se analizó la presencia de la caspasa 9 activa. Los resultados no fueron contundentes para la activación de esta caspasa. Con base en estos resultados se decidió analizar el procesamiento de la proteína BID la cual ha sido reportada como unión entre las dos vías de apoptosis mediada por caspasas. BID es procesada por la caspasa 8 y posteriormente BID actúa sobre la caspasa 9. Se evaluó el efecto de OmpC CD154 sobre BID, para ello se buscó la presencia de la proteína BID procesada, hallando que se encuentra truncada en el caso de OmpC y CD40L. Como se sabe la activación de BID ocurre tras su procesamiento (truncamiento). Se analizó también la pro-caspasa 9 encontrando una evidente disminución de la proteína, esto confirma la participación de la vía intrínseca. Finalmente esto nos muestra que el tratamiento con OmpC CD154 es capaz de producir apoptosis mediante vía extrínseca e intrínseca.

A pesar de la diferencia de inicio de la vía intrínseca y la extrínseca, estas convergen en la activación de caspasas efectoras. Además, existe un entrecruzamiento de las dos vías, en donde la muerte por vía extrínseca puede llevar también a la muerte por la vía intrínseca. En algunas células, solamente una pequeña cantidad de FADD y C-8 son reclutados al DISC, por lo que la activación de C-8 es insuficiente para llevar a cabo la apoptosis; por esto, se requiere el involucramiento de la mitocondria para generar la apoptosis. La señalización apoptótica mediada por el receptor de muerte puede activar la vía mitocondrial a través de la proteína BID, de un solo dominio BH3. La C-8 activada en el DISC es suficiente para procesar (o "cortar") a BID en el citosol generando a tBID (BID procesada) el cual se transloca a la mitocondria permitiendo la disfunción mitocondrial y la formación del apoptosoma, finalizando en la apoptosis

Con el fin de confirmar la activación de la vía extrínseca y con base en otros estudios publicados, en los cuales se evidencia que la fosforilación de JNK precede a la activación de la caspasa 8, que posteriormente lleva a apoptosis ⁴³ Se analizó el efecto de OmpC CD154 en la proteína JNK. Se encontró que la fosforilación de JNK ocurre al tratamiento con OmpC CD154 y CD40L.

Estos hallazgos permiten argumentar que la proteína quimérica OmpC CD154 es capaz de producir apoptosis mediada por caspasas mediante la activación de la vía extrínseca como intrínseca. Así como una disminución de la proliferación y viabilidad celular en la línea celular de Linfoma no-Hodgkin Raji

En el siguiente diagrama se realiza una esquematización del mecanismo propuesto con base en los hallazgos realizados

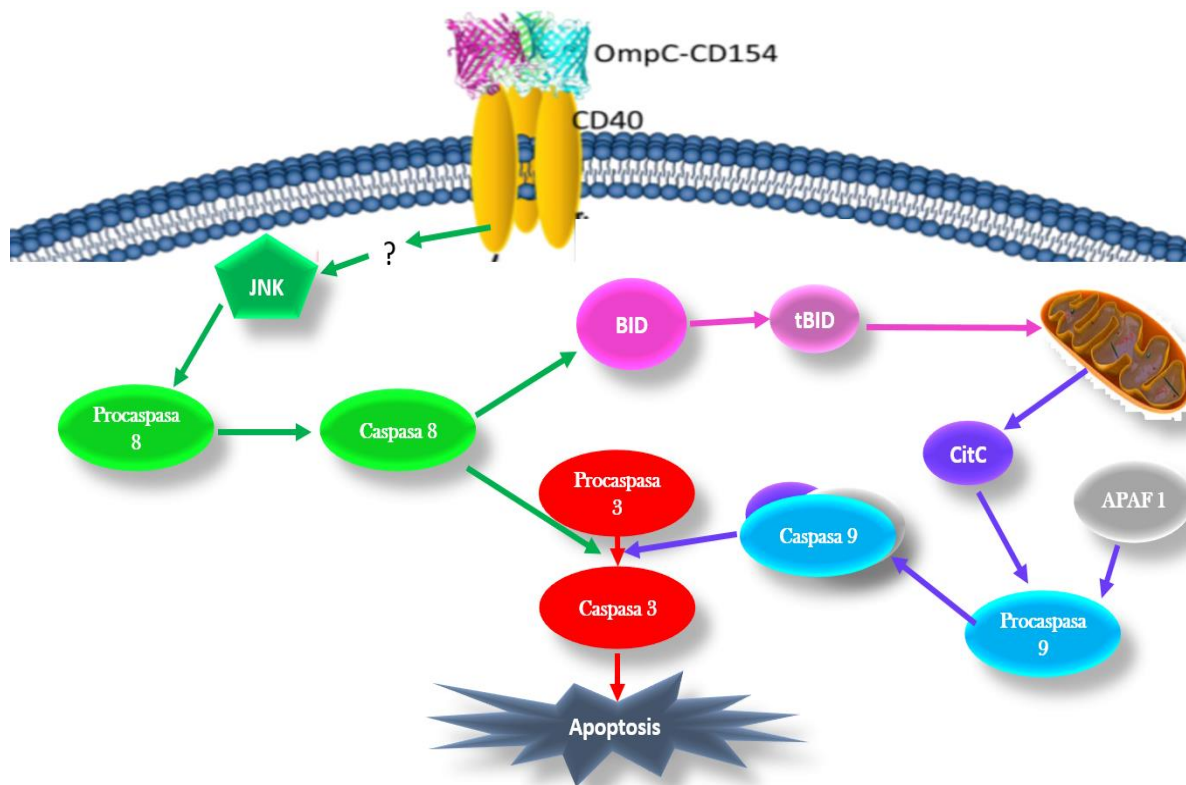


Figura 17. Esquema de la vía de apoptosis.

Conclusiones

Los hallazgos aquí presentados son un indicio de la capacidad de la proteína quimérica OmpC CD154 para disminuir la proliferación celular así como la viabilidad celular. Como una consecuencia de la inducción de apoptosis por la interacción directa con CD40 expresado en la membrana de la línea celular de LNH. Y esta apoptosis es mediada por la activación de caspasas involucrando ambas vías tanto extrínseca como intrínseca por la participación de BID.

Este estudio muestra indicios del valor potencial de OmpC CD154 como una viable alternativa terapéutica en el tratamiento del Linfoma no-Hodgkin.

BIBLIOGRAFÍA

1. INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. (2015). Disponible en línea <http://www.inegi.org.mx/inegi/default.aspx?c=274>, visto ultima vez 12 de agosto 2015
2. Institute, N. C. El Linfoma no Hodgkin. (2009). Disponible en línea: <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/linfoma> Visto ultima vez 12 de agosto de 2015
3. Jemal, A. *et al.* Global Cancer Statistics: 2011. *CA. Cancer J. Clin.* **61**, 69–90 (2011).
4. Coté, T. R. *et al.* Non-Hodgkin's lymphoma among people with AIDS: incidence, presentation and public health burden. AIDS/Cancer Study Group. *Int. J. Cancer* **73**, 645–650 (1997).
5. Algunas observaciones sobre la historia del linfoma de Hodgkin. *Rev. Hematol.* **11**, 208–212 (2010).
6. Weisenburger, D. D. *et al.* Pathological classification of non-Hodgkin's lymphoma for epidemiological studies. in *Cancer Research* **52**, (1992).
7. American-Cancer-Society. American Cancer Society. (2015). Disponible en línea en <http://www.cancer.org/espanol/cancer/linfomanohodgkin/guiadetallada/linfoma-no-hodgkin-what-is-what-is-non-hodgkin-lymphoma>, visto ultima vez en agosto 2015
8. Li, D. *et al.* Autocrine TNF-alpha-mediated NF-kappaB activation is a determinant for evasion of CD40-induced cytotoxicity in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **436**, 467–472 (2013).
9. Juan R. Labardini Méndez Carmen Corrales Alfaro, Micaela Balbuena Martínez, E. C. C., Arlette Araceli Barbosa Ibarra Omar Genaro López Navarro, Cristal Medina Pérez, Juan Ojeda Tovar, J. R. E. Z., Ana Florencia Ramírez Ibargüen Sergio Arturo Sánchez Guerrero, Marianela Siñani Cárdenas, S. R. V. & Nidia Paulina Zapata Canto Myrna Candelaria Hernández y Jorge Cortés-Franco, G. C.-M. OncoGuía Linfoma No Hodgkin. *Cancerología* **6**, (2011).
10. Siegel, R. American Cancer Society Datos y estadísticas sobre el cáncer entre los Hispanos/Latinos. 2012-2012. (2012).
11. Ariana Paola Canché-Arenas Catalina Romo-Hernandez, R. E. de L.-M. Linfoma MALT de Colon. Reporte de un caso. *Endoscopia* **24**, 79–84 (2012).
12. Johnson, P. *et al.* Clinical and biological effects of an agonist anti-CD40 antibody: a Cancer Research UK phase I study. *Clin Cancer Res* **21**, 1321–1328 (2015).
13. Ohno, H., Ueda, C. & Akasaka, T. The t(9;14)(p13;q32) translocation in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk. Lymphoma* **36**, 435–445 (2000).

14. Society, A. C. Cancer Facts & Figures 2015. (2015). Disponible en línea en: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@editorial/documents/document/acspc-044552.pdf> Visto por ultima vez en agosto 2015
15. Campo, E. *et al.* The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: Evolving concepts and practical applications. *Blood* **117**, 5019–5032 (2011).
16. Gustavsson, A., Osterman, B. & Cavallin-Stahl, E. A systematic overview of radiation therapy effects in Hodgkin's lymphoma. *Acta Oncol. (Madr)*. **42**, 589–604 (2003).
17. Schimmer, A. D. *et al.* Allogeneic or autologous bone marrow transplantation (BMT) for non-Hodgkin's lymphoma (NHL): results of a provincial strategy. Ontario BMT Network, Canada. *Bone Marrow Transplant*. **26**, 859–64 (2000).
18. Limat, S. *et al.* Early cardiotoxicity of the CHOP regimen in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Ann. Oncol.* **14**, 277–281 (2003).
19. Musolino, A. *et al.* Activity and safety of dose-adjusted infusional cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone chemotherapy with rituximab in very elderly patients with poor-prognostic untreated diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Cancer* **117**, 964–973 (2011).
20. Scott, A. M., Wolchok, J. D. & Old, L. J. Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* **12**, 278–287 (2012).
21. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer* **1**, (2011).
22. Vega, M. I., Huerta-Yepez, S., Jazirehi, A. R., Garban, H. & Bonavida, B. Rituximab (chimeric anti-CD20) sensitizes B-NHL cell lines to Fas-induced apoptosis. *Oncogene* **24**, 8114–8127 (2005).
23. Chao, M. P. Treatment challenges in the management of relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma - novel and emerging therapies. *Cancer Manag Res* **5**, 251–269 (2013).
24. Dixon, K. L. The radiation biology of radioimmunotherapy. *Nucl. Med. Commun.* **24**, 951–957 (2003).
25. Tomblyn, M. Radioimmunotherapy for B-cell non-hodgkin lymphomas. *Cancer Control* **19**, 196–203 (2012).
26. Tong, A. W. & Stone, M. J. Prospects for CD40-directed experimental therapy of human cancer. *Cancer Gene Ther.* **10**, 1–13 (2003).
27. Lewis, T. S. *et al.* Distinct apoptotic signaling characteristics of the anti-CD40 monoclonal antibody dacetuzumab and rituximab produce enhanced antitumor activity in non-Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res* **17**, 4672–4681 (2011).

28. French, R. R., Chan, H. T., Tutt, A. L. & Glennie, M. J. CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help. *Nat. Med.* **5**, 548–553 (1999).
29. Vonderheide, R. H. & Glennie, M. J. Agonistic CD40 antibodies and cancer therapy. *Clin Cancer Res* **19**, 1035–1043 (2013).
30. Schönbeck, U. & Libby, P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 4–43 (2001).
31. Dallman, C., Johnson, P. W. M. & Packham, G. Differential regulation of cell survival by CD40. *Apoptosis* **8**, 45–53 (2003).
32. Sun, H. *et al.* Critical role of CD40-mediated autocrine tumor necrosis factor-alpha in potentiation of cisplatin-induced cytotoxicity in cancer cells. *Cancer Sci* **103**, 197–202 (2012).
33. Armitage Fanslow, W. C., Strockbine, L., Sato, T. A., Clifford, K. N., Macduff, B. M., Anderson, D.M, Gimpel, S.D., Davis-Smith, T., Maliszewski, C.R., Clark, E.A., Smith, C.A., Grabstein, K.H., Cosman, D., & Spriggs, M. K., R. J. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* **357(6373)**, 80–82 (1992).
34. RUTH R. FRENCH ALISON L. TUTT & MARTIN J. GLENNIE, H. T. C. C. CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help. *Nat. Med.* **5**, (1999).
35. Fournel, S. *et al.* C3-symmetric peptide scaffolds are functional mimetics of trimeric CD40L. *Nat. Chem. Biol.* **1**, 377–382 (2005).
36. Banner, D. W. *et al.* Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF?? complex: Implications for TNF receptor activation. *Cell* **73**, 431–445 (1993).
37. Mazzei, G. J. *et al.* Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active. *J. Biol. Chem.* **270**, 7025–7028 (1995).
38. Bajorath, J. & Aruffo, A. Construction and analysis of a detailed three-dimensional model of the ligand binding domain of the human B cell receptor CD40. *Proteins* **27**, 59–70 (1997).
39. An, H. J. *et al.* Crystallographic and mutational analysis of the CD40-CD154 complex and its implications for receptor activation. *J Biol Chem* **286**, 11226–11235 (2011).
40. Mario I. Vega Sara Huerta-Yepez, Rosendo Luria Perez, Vianney Ortiz Navarrete, Armando Isibasi, Cesar R. Gonzáles-Bonilla, L. S.-A. A Salmonella typhi OmpC fusion proteina expresing the CD40 Trp140-Ser149 amino acid strands binds CD40 and activates a lymphoma B-cell line. *Immunology* **110**, 206–216 (2003).
41. Alberts, B. *et al.* *Molecular Biology of the Cell, Fourth Edition. Molecular Biology* (2002).

42. Bai, L. & Wang, S. Targeting apoptosis pathways for new cancer therapeutics. *Annu Rev Med* **65**, 139–155 (2014).
43. Yurchenko, M. & Sidorenko, S. P. Hodgkin's lymphoma: the role of cell surface receptors in regulation of tumor cell fate. *Exp. Oncol.* **32**, 214–23 (2010).