



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Unidad de Investigación Multidisciplinaria Zaragoza

(UMIEZ)

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer

Laboratorio de Oncología Celular

***Actividad del lípido (PI) y liposomas formulados (LIPI)
en la modificación de marcadores de membrana en la
línea celular Reh (Leucemia Linfoide Aguda) y linfocitos
de sangre periférica (LSP).***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO

PRESENTA

PARRA ACUÑA ANGEL

Directora de Tesis: C. a Dra. Rosalva Rangel Corona



Ciudad de México, Abril 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"
DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.

Comunico a usted que el alumno **PARRA ACUÑA ANGEL**, con número de cuenta **413093185**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **24 de abril de 2018** a las **11:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE** Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ
VOCAL M. en C. ROSALVA RANGEL CORONA
SECRETARIO M. en C. REYNALDA ROLDÁN PÉREZ
SUPLENTE M. en C. MARÍA DEL CARMEN LAGUNAS CRUZ
SUPLENTE M. en C. EDGAR IVÁN TORRES CORIORILES

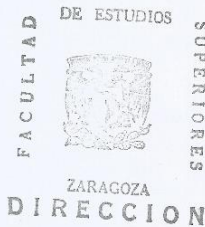
El título de la tesis que presenta es: **Actividad del lípido (PI) y liposomas formulados (LIPI) en la modificación de marcadores de membrana en la línea celular Reh (Leucemia Linfoide Aguda) y linfocitos de sangre periférica (LSP).**

Opción de titulación: Tesis.

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad de México, a 05 de marzo de 2018

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR



RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

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

Durante la realización del presente trabajo se contó con el apoyo financiero de la beca Egresados Extemporáneos, UNAM.



AGRADECIMIENTOS

A mi asesora y directora de tesis, la C. a Dra. Rosalva Rangel Corona por el tiempo dedicado, ayuda, apoyo y sugerencias para la elaboración de este proyecto y toda mi estancia en el laboratorio, es un gran ejemplo a seguir y le agradezco profundamente el abrirme las puertas a este gran mundo de la investigación científica. A los miembros del jurado: Dr. Hugo López Muñoz, M. en C. Reynalda Roldán Pérez, M. en C. Edgar Iván Torres Corioriles, M. en C. María del Carmen Lagunas Cruz por su tiempo y grandes contribuciones para la elaboración de este escrito. A la Dra. Teresa Corona por su valioso conocimiento y consejos dados.

A todos mis amigos y compañeros del laboratorio: Itzel, Sergio, Marco, Santa, Ana, Edgar, Adrian, Leo, Virginia, Zeid, Diana, Axel, Belinda, a algunos los conozco de mi tiempo como estudiante universitario, a otros al entrar al laboratorio, pero siempre formaron la mejor atmosfera que un laboratorio de investigación puede dar.

A todos mis amigos: Christian, Lalo, Zamu, Topo, Fany, Dany, Eli gracias por todos los momentos agradables desde que los conocí y por hacer la vida más amena y maravillosa

GRACIAS A TODOS por formar parte de mi vida profesional.



DEDICATORIAS

En primer lugar este trabajo es para mis padres, Dionisio Parra Roldan y Beatriz Acuña Peralta, quienes me han apoyado siempre a cumplir mis metas. Siempre estaré agradecido por la educación y el tiempo que invirtieron durante mi vida y hacer de mí una persona de bien, además del amor que solo ellos me han podido dar.

A mis hermanas Lili y Beto, a quienes aprecio de todo corazón, las quiero aunque ustedes a veces a mí no. A mi abuela Matilde Roldan y mi abuelo Martin Parra, que aunque ya no este sé que estaría orgulloso, así como a mi abuela Ofelia Peralta, a quien extraño desde que partió.

A mi amada esposa Edith Vega, quien siempre me motiva a sacar lo mejor de mí, este solo es el primer paso de una vida exitosa no solo para mí sino para ambos. A mis “hijos” Kuro y Tyron, por interponerse en la computadora cada vez que podían para llamar mi atención.



Índice

Abreviaturas	7
Resumen	9
1. Marco Teórico.....	11
1.1 Cáncer.....	11
1.2 Leucemia Linfoide Aguda (ALL)	12
1.3 Terapias	13
1.4 Liposomas	14
1.5 Lípidos membranales	15
1.7 Transporte Vesicular	18
1.8 Transporte vesicular regulado por Fosfoinosítidos.....	19
1.9.1 CD3.....	22
1.9.2 Complejo HLA-I	23
1.9.3 FcRn	25
2. Antecedentes Directos	28
3. Justificación	29
4. Hipótesis.....	30
5. Objetivos.....	31
5.1 Objetivo General	31
5.2 Objetivo Particular	31
6. Metodología.....	32
6.1 Material Biológico	32
6.1.1 Línea celular de LLA Reh.....	32
6.1.2 Obtención de Linfocitos de Sangre Periférica (LSP's) Humanos.....	32



6.2 Cultivo celular.....	33
6.3 Tratamiento celular con PI libre y liposomas formulados con PI (LIPI)	33
6.4 Marcaje con Anticuerpos y visualización por citometría de flujo.....	34
7. Resultados.....	35
7.1. Linfocitos de Sangre Periférica.....	35
7.2. Línea Celular Reh	42
8. Discusión de Resultados	49
9. Conclusiones	54
10. Perspectivas	54
10. Bibliografía.....	55



Abreviaturas

- ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- ALL:** Leucemia Linfoide Aguda
- APM:** Maquinaria de procesamiento de antígeno
- CaCu:** Cáncer Cérvico Uterino
- CD16:** Fc γ RIII
- DDT:** Diclorodifeniltricloroetano
- DGA:** Diacilglicerol
- FcR:** Receptores Fc
- FcRn:** Receptor neonatal Fc
- Fc ϵ RII:** receptor de tipo II para IgE
- HDACi:** Inhibidores de la histona deacetilasa
- IFN's:** Interferones
- IFN α :** Interferón alfa
- IFN β :** Interferón beta
- IFN γ :** Interferón gamma
- Ig:** Inmunoglobulina
- IL-2:** Interleucina 2
- IL-10:** Interleucina 10
- IMF:** Intensidad Media de Fluorescencia
- IP₃:** Inositol trifosfato
- IRS:** Receptor de insulina
- LIPI:** Liposomas formulados con PI
- LSP's:** Linfocitos de Sangre Periferica.
- pH:** Potencial de Hidrogeno
- PI:** Lípido
- PI2K:** Fosfatidilinositol-2-cinasa
- PI3K:** Fosfatidilinositol-3-cinasa



PIK: Fosfatidilinositol cinasa

PIP: Fosfatidilinositol-4-fosfato

PIP2: Fosfatidilinositol 3, 4-bifosfato

PIP3: Fosfatidilinositol 3-4-5 trifosfato

PMA: Miristato acetato

Pre-BCR: Receptor pre B

RE: Retículo endoplasmático

RTG: Red trans-Golgi

SCAMP2: Proteína de membrana 2 de secreción asociada a acarreador

SFB: Suero Fetal Bovino

siARN: ARN de interferencia corto

SNARE: Receptor de fijación soluble NSF

SOCS: Supresor de la señalización de citosina

SYNJ1: Sinaptojanina 1

SYNJ2: Sinaptojanina 2

TAP: Transportadores asociados con proceso de antígenos

TCR: Receptor de las células T

VAMP2: Proteína de membrana 2 asociado a vesículas

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

β 2m: β -2-microglobulina



Resumen

La Leucemia Linfocítica Aguda (ALL) es una de las enfermedades malignas más comunes entre los niños de 0-4 años de edad. Se caracteriza por la proliferación clonal, acumulación e invasión de tejido por células neoplásicas. Específicamente la ALL de origen no T, no B es una leucemia derivada de precursores linfocíticos tempranos. Según datos internacionales, México ocupa el sexto lugar a nivel mundial en incidencia, mientras que en la mortalidad ocupa el séptimo lugar.

Una estrategia terapéutica que actualmente se ha extendido y explorado contra el cáncer es el uso de liposomas como vehículos de fármacos antineoplásicos. Los liposomas son vesículas en las que un volumen acuoso, que generalmente contiene el compuesto activo, es rodeado por una membrana fosfolipídica cuya estructura, composición y proporciones son prácticamente iguales a las de la membrana celular.

En el Laboratorio de Oncología Celular de la UMIEZ de la FES Zaragoza se ha probado el uso de liposomas formulados con fosfatidilinositol (LIPI) y del fosfatidilinositol (PI) libre en la movilización de receptores de membrana en células linfocíticas y diferentes líneas celulares de Cáncer de cervix (CaCu) y de ALL.

En el presente trabajo se realizó la evaluación del efecto de LIPI y el PI libre, sobre la expresión de los receptores HLA-I, FcRn y CD3 en células hematopoyéticas. Cada uno de estos receptores cumple importantes funciones dentro de la respuesta inmune, pero también tiene relevancia clínica en células neoplásicas.

Se evaluó la expresión basal de estos receptores en Linfocitos de Sangre Periférica (LSP's) y en la línea celular Reh, comparada con la expresión en cultivos de ambos tipos celulares tanto en presencia de LIPI como de PI libre, observando el aumento de células positivas en los cultivos en presencia de LIPI, y solo el aumento para los receptores HLA-I y FcRn en los cultivos de células Reh en presencia de PI.

Los datos aquí descritos proporcionan información sobre el efecto que LIPI y PI tienen sobre la expresión de receptores HLA-I, FcRn y CD3, y el impacto que puede tener en la



movilización de receptores, de tal manera que en el futuro podemos proponer nuevas terapias, para el tratamiento de enfermedades como el cáncer.

1. Marco Teórico

1.1 Cáncer

El término cáncer se utiliza para describir enfermedades en las que los tejidos crecen y se diseminan de manera incontrolada por todo el organismo. El cáncer puede originarse en casi cualquier órgano; dependiendo del tipo celular implicado, se agrupan dependiendo de su origen celular en: carcinomas (células epiteliales), sarcomas (tejidos de soporte), linfomas y leucemias (células sanguíneas) (Becker *et al*, 2007).

Independientemente de su origen, se define por una combinación de ciertas características: proliferación de manera incontrolada, inmortalidad, inducción de invasión y metástasis, evasión de supresores de crecimiento, inducción de angiogénesis y resistencia a la muerte por apoptosis, entre otras (**Figura 1**) (Hanahan *et al.*, 2011; Becker *et al.*, 2007).



Figura 1. Conjunto de ventajas adquiridas por las células tumorales durante el desarrollo cancerígeno (Tomado de Aguilar 2016, Modificado de Hanahan & Weinberg, 2011).



El cáncer es un problema de salud a nivel mundial, ya que es la principal causa de muerte en países desarrollados y la segunda en países subdesarrollados. La incidencia de este padecimiento se va incrementando como resultado del envejecimiento, crecimiento de la población, así como por la adquisición de estilos de vida asociados con esta enfermedad, como el alcoholismo, tabaquismo y una mala alimentación (Jemal *et al.*, 2011).

Entre las enfermedades crónico-degenerativas, el cáncer ocupa el tercer lugar como causa de muerte en México, solo superado por enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus. Desde hace dos décadas México atraviesa por una transición epidemiológica relacionada con la disminución de las enfermedades infecciosas y el aumento en la frecuencia de enfermedades crónico-degenerativas. Contribuye a esta transición, la transformación de las zonas rurales en urbanas, cambios económicos, demográficos y ambientales (Stevens *et al.*, 2008). También, intervienen defectos genéticos, como alteraciones de genes reparadores del ADN, o por la desregulación de genes que promueven el crecimiento normal de la célula denominados protooncogenes, que suelen activarse por mutación puntual, transformándose en oncogenes que contribuyen en la progresión de crecimientos tumorales (Lodish *et al.*, 2011; Pierce 2010; Becker *et al.*, 2007).

Aunque de manera natural el sistema inmune combate a las células tumorales, algunas de esas células pueden 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 es bloqueado por las células tumorales, a través de mecanismo de escape inmunológico como la adaptación al microambiente o adquiriendo resistencia al ataque de células inmunológicas efectoras (Rangel-Corona, 2003).

1.2 Leucemia Linfoide Aguda (ALL)

La LLA es una de las enfermedades malignas más comunes entre los niños de 0-4 años de edad y casi el 72% de los cánceres en los niños de esa edad son de este tipo. Se caracteriza por la proliferación clonal, acumulación e invasión de tejido por células neoplásicas (Aziz *et al.*, 2015). La rápida acumulación de los precursores linfocíticos

usualmente ocurre en la médula ósea desplazando a la hematopoyesis normal y resultando en anemia, neutropenia, trombocitopenia y diseminación de las células leucémicas a la sangre periférica. Existen muchos factores que promueven el desarrollo de la enfermedad que incluyen radiación nuclear, electromagnética y cósmica, además de agentes químicos como los insecticidas, el diclorodifeniltricloroetano (DDT), y la vitamina K (Cooney *et al.*, 2015). Específicamente la ALL de origen no T, no B es una leucemia derivada de precursores linfoides tempranos (**Figura 2**) (Foon *et al.*, 1982). Aunque la sugerencia es que la mayoría de los antecesores son representativos de precursores inmaduros de células B (Korsmeyer *et al.*, 1981).

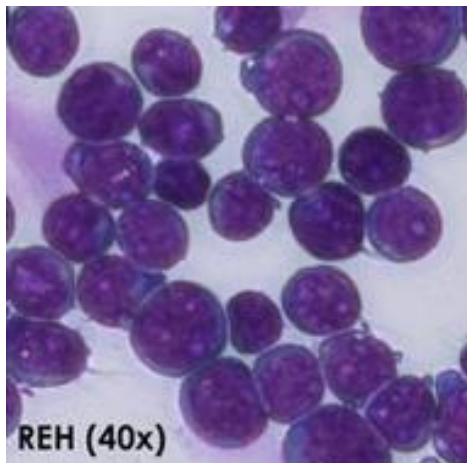


Figura 2. Morfología de la línea celular Reh, una ALL no T, no B. Modificada de Managò *et al.*, 2016.

Según datos internacionales, México ocupa el sexto lugar a nivel mundial en casos de incidencia, mientras que en la mortalidad ocupa el séptimo lugar (Fitzmaurice, 2017); por otro lado datos proporcionados por el Instituto Mexicano del Seguro Social entre 1996 y 2000, consideraban que la tasa de incidencia de ALL en México correspondían entre 55.4 y 58.4 por millón (Mejía-Aranguré *et al.*, 2005).

Actualmente, se diagnostican de 2600 a 3120 casos anuales de cáncer en menores de 18 años (Jiménez-Morales *et al.*, 2017), y el 25 % de estos casos se deben a ALL (Rivera-Luna *et al.*, 2012). Sin embargo, es difícil saber las tasas reales de incidencia de la ALL pues México al no contar con un registro poblacional, importa los datos epidemiológicos de la Organización Mundial de la Salud, o de reportes sobre la experiencia y lo observado por alguna institución (Santoyo-Sánchez *et al.*, 2017).

1.3 Terapias

Como resultado de esto se tiene que el tratamiento del cáncer como enfermedad ha ido aumentando en prioridad, comenzando con terapias convencionales como lo son la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia; pero su empleo tiene grandes limitaciones, principalmente la falta de especificidad y/o su ineficacia para el control de la enfermedad



residual. Para superar estas limitaciones se propone utilizar el potencial del sistema inmunológico y su capacidad de respuesta hacia las células tumorales. Esta estrategia se basa en el uso de anticuerpos monoclonales o sus derivados, el empleo de citocinas y el desarrollo de vacunas antineoplásicas. A estas estrategias se les llaman inmunoterapias (Subiza *et al.*, 1994).

En el caso de las citocinas, se ha estudiado ampliamente su efecto antitumoral para combatir células tumorales. Tal es el caso de la Interleucina 2 (IL-2) (Mulé *et al.*, 1985) o los interferones $INF\alpha$ (Seliger *et al.*, 2008) e $IFN\gamma$, sin embargo su alta toxicidad o la resistencia de los tumores hacia estas citocinas limita su uso en la inmunoterapia (Briesemeister *et al.*, 2011; Rangel-Corona *et al.*, 2014). Ante estos problemas surge la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para combatir el cáncer.

1.4 Liposomas

Actualmente se estudian modelos de transportadores para dirigir fármacos antitumorales a tejidos específicos disminuyendo los efectos secundarios que pueden tener los fármacos administrados vía sistémica aumentando la actividad antitumoral y favoreciendo su metabolismo y excreción rápida, garantizando la liberación específica y controlada de estos agentes antitumorales. El uso de un vehículo lipídico (liposoma) para administrar agentes antineoplásicos, ha sido estudiado como alternativa terapéutica contra el cáncer ya que pueden alcanzar tejidos específicos y mandar compuestos específicos para lograr los resultados clínicos deseados (Hu *et al.*, 2015). Los liposomas son vesículas con volumen acuoso, en el que se encapsula el compuesto activo. Son fabricados como una membrana fosfolipídica cuya estructura, composición y proporciones son prácticamente iguales a las de la membrana celular. Dichos liposomas se han utilizado desde la década de los 90's para la entrega de medicamentos. Estas vesículas pueden ser muy pequeñas, incluso más que los vasos vasculares de los tumores sólidos, por lo que son excelentes transportadores de agentes quimioterapéuticos a sitios blanco (Clavijo *et al.*, 2007).

La funcionalidad de los liposomas está dada por su composición ya que al estar formada por fosfolípidos, este vehículo es similar a la membrana celular que está compuesta por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, esfingomielinina y fosfatidilinositol

(Figura 3). La cara externa está constituida por fosfatidilcolina, esfingomieline y fosfatidiletanolamina, mientras que la interna la constituyen la fosfatidilserina, la fosfatidiletanolamina y el fosfatidilinositol que junto con la fosfatidilserina le confieren una carga negativa neta a la membrana (Kierszenbaum, 2008).

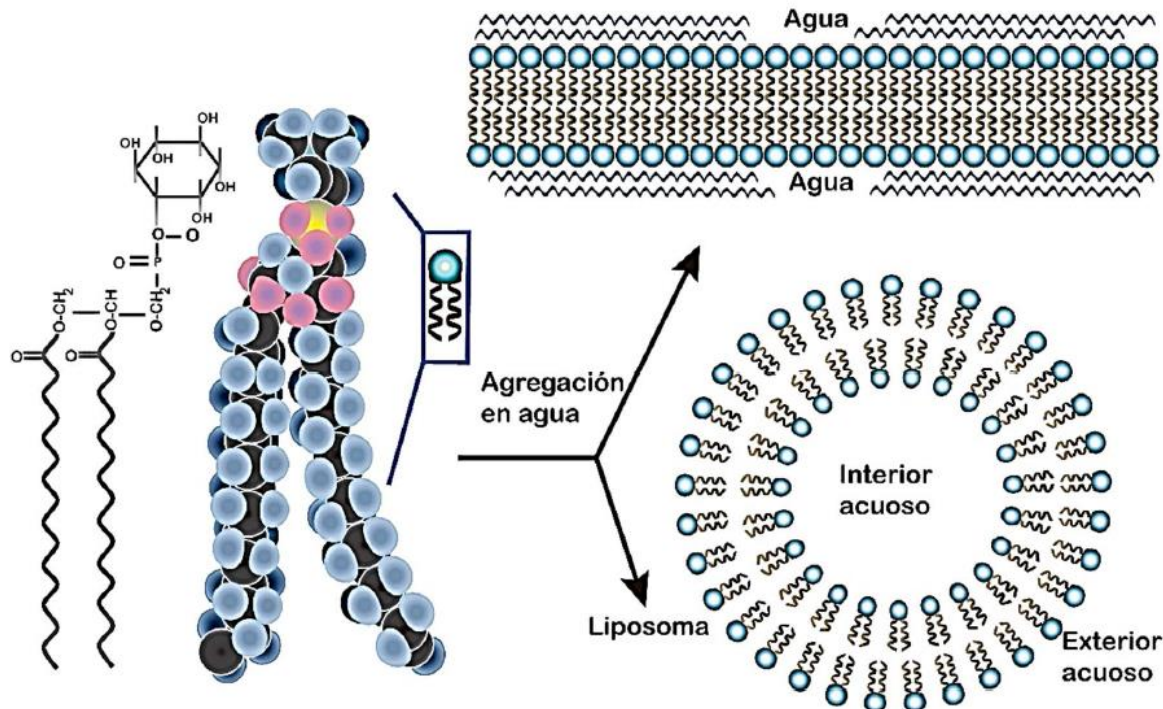


Figura 3. Estructura de un liposoma integrada por fosfolípidos. Tomada de Urias, 2016. Modificada de Alberts *et al.*, 2008.

Actualmente los liposomas han sido utilizados en la terapia génica para muchos propósitos como el introducir ADN exógeno a las células (transfección), introducir moléculas o acarrearlas o introducir siARNs. Además, su composición es variada ya que pueden ser neutros, poseer carga positiva o carga negativa, introduciendo una gran variedad para la terapia celular (Hosseinkhani *et al.*, 2014).

1.5 Lípidos membranales

La membrana plasmática de las células está compuesta por una bicapa lipídica, con grupos de cabeza polar hidrofílica que están expuestos hacia la superficie extracelular y hacia el interior de las células, así como colas hidrofóbicas que están contenidas en el

espacio entre las cabezas hidrofílicas. Los principales lípidos dentro de la membrana son los fosfolípidos, los glicolípidos y los esteroides. De estos los más abundantes dentro de la membrana son los fosfolípidos (Becker *et al.*, 2007; Pérez-Burgos *et al.*, 2010). Estos fosfolípidos contienen un esqueleto de glicerol, dos cadenas de ácidos grasos y un alcohol fosforilado (**Figura 4**). En las células los principales fosfolípidos son la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina, la fosfatidilcolina y el fosfatidilinositol (Berg *et al.*, 2008); de todos estos fosfolípidos, solo el que posee el grupo inositol no tiene un grupo amino que esta protonado, por lo que no está cargado al pH celular. La presencia de cargas yuxtapuestas de un fosfato cargado negativamente y un amino cargado positivamente, convierte a estos fosfolípidos en moléculas eléctricamente neutras, y con una cabeza altamente polar. La combinación de la cabeza polar y dos cadenas no polares confiere la característica anfipática y que es crítica para desempeñar su función en la estructura de la membrana celular (Becker *et al.*, 2007).

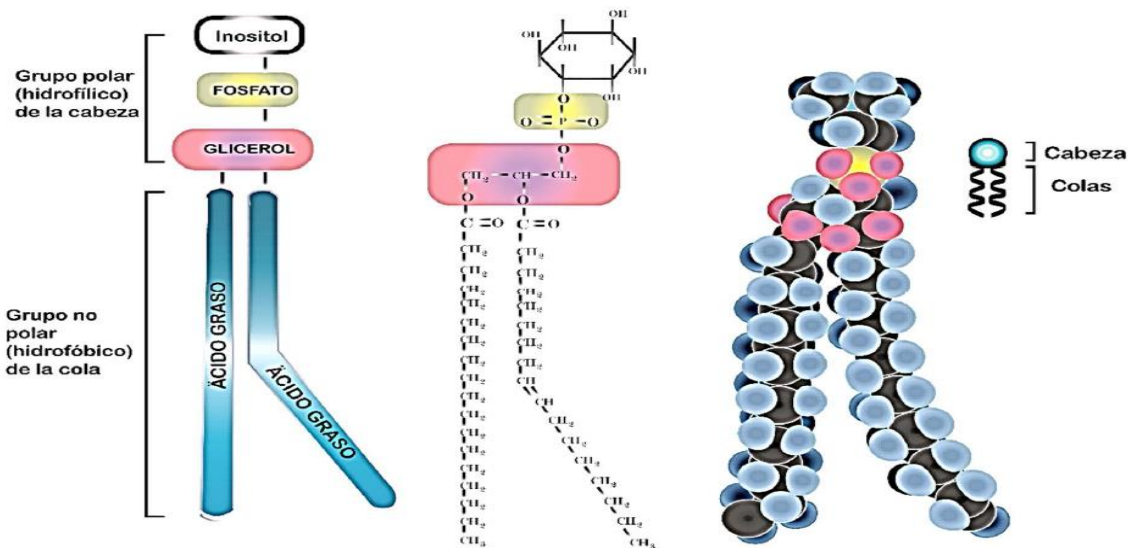


Figura 4. Estructura de un fosfolípido, fosfatidilinositol. Tomada de Urias. Modificada de Alberts *et al.*, 2008.



1.6 Fosfatidilinositol

El fosfatidilinositol cumple un importante rol dentro de la monocapa interna de la membrana, pues está implicado en una gran variedad de acontecimientos relacionados en la transmisión de varios tipos de señales desde la membrana plasmática hacia el interior de la célula (Becker *et al.*, 2007). La forma más común del fosfatidilinositol en la membrana plasmática se encuentra en forma de fosfatidilinositol 3-4-bifosfato (PIP₂) o de fosfatidilinositol-4-fosfato (PIP). Es de gran interés pues tiene distintas actividades como segundo mensajero. Una de ellas corresponde cuando existe una hidrólisis por parte de la fosfolipasa C que convierte al PIP₂ en inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DGA). El IP₃ es liberado al citoplasma donde interactúa con receptores localizados en los depósitos de Ca²⁺ del retículo endoplasmático y estimula la liberación del ion (Page *et al.*, 1998), este proceso regula importantes procesos celulares como la diferenciación y crecimiento celular, la apoptosis, el tráfico de vesículas, la activación de canales y transportadores iónicos, activación de insulina, y cambios en el citoesqueleto. (McLaughlin *et al.*, 2005; Eyster, 2007). En el caso del diacilglicerol (DGA), activa a proteínas de la familia de enzimas proteína cinasa C que puede fosforilar grupos específicos de serina y treonina en diversas proteínas diana y que estimulan el crecimiento celular, la regulación de canales iónicos, cambios en el citoesqueleto, incrementos del pH celular, y efectos en la secreción de proteínas y otras sustancias (Becker *et al.*, 2007). La vía activada por la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), está involucrada en el crecimiento y la supervivencia celular (Hiles *et al.*, 1992). Esta vía es estimulada como consecuencia de la activación de receptores de membrana tirosin-cinasa, los cuales autofosforilan y fosforilan el sustrato del receptor de insulina (IRS), quien fosforila la subunidad p85 de la PI3K activándola. La PI3K activa al PIP₂ y lo

convierte en fosfatidilinositol 3-4-5 trifosfato (PIP₃), el cual, corriente abajo, activara a la proteína Akt (**Figura 5**) (Pinzón *et al.*, 2009).

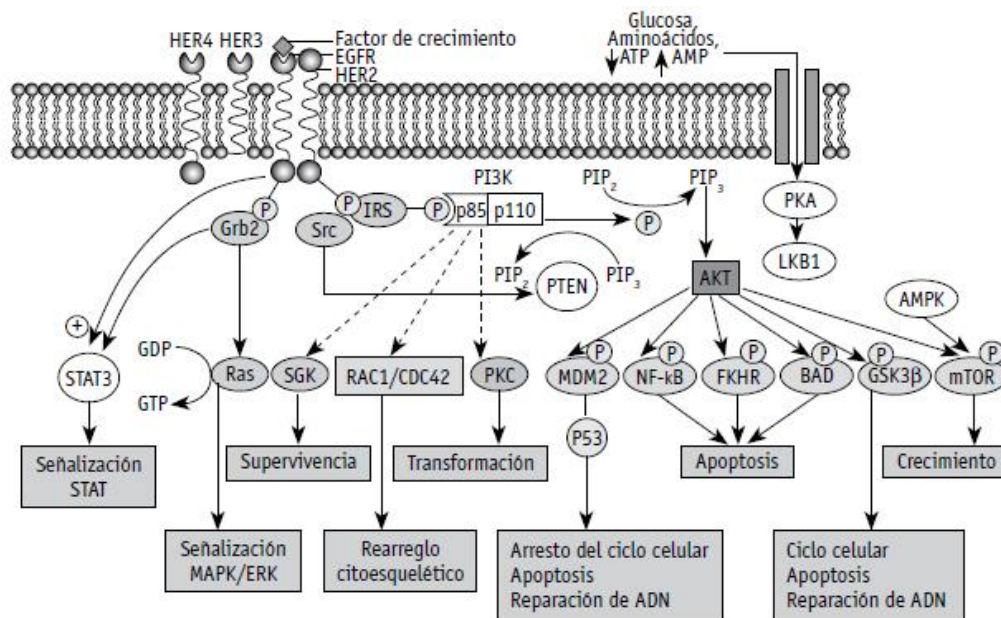


Figura 5. Vía de señalización de la PI3K/Akt. Puede observarse como la IRS es fosforilada por factores de crecimiento y otras moléculas. Cuando IRS es activada fosforila la región p85 de la PI3K quien fosforila a la PIP₂ para formar el PIP₃ que, posteriormente, activa a la proteína Akt (Tomada de Pinzón *et al.*, 2009. Modificada de Hennessy *et al.*, 2005).

La enzima PI3K también parece estar relacionada al transporte vesicular ya que la vía constitutiva parece estar regulada por cinasas relacionadas a PI3K como PI2K (fosfatidilinositol-2-cinasa), PIK (fosfatidilinositol cinasa) y la propia PI3K, pues la ausencia o bloqueo de estas cinasas afecta directamente el transporte vesicular constitutivo (Schu *et al.*, 1993).

1.7 Transporte Vesicular

La mayor parte de las células secretan proteínas, estas proteínas destinadas para la secreción son ensambladas y glicosiladas conforme pasan a través del retículo endoplasmático (RE) y las cisternas del aparato de Golgi. En el complejo morfológico de vesículas y tubos que forman la red trans-Golgi (RTG), las proteínas que serán secretadas son segregadas por enzimas lisosomales en las células animales. Estas enzimas tienen señales que determinan la localización intracelular. Cuando estas señales



no están o no se pueden leer, las enzimas son secretadas en vez de ser secuestradas intracelularmente (Kelly, 1985; Burgess *et al.*, 1987).

Existen dos maneras para esta secreción, que pueden ser a través de vesículas no reguladas (vesículas secretoras constitutivas) o vesículas reguladas. La primera consiste en una descarga continua de vesículas en la membrana plasmática, mientras que la segunda se caracteriza por la descarga rápida y controlada, generalmente en respuesta a una señal extracelular (Beker *et al.*, 2007; Lodish *et al.*, 2011).

1.8 Transporte vesicular regulado por Fosfoinosítidos

Ciertos derivados del fosfatidilinositol cumplen una importante función en el transporte vesicular en ciertos pasos, uno podría ser en la definición de la locación donde las vesículas deben formarse, y otro durante el transporte y salida de estas vesículas. En el primer caso, el fosfatidilinositol puede difundirse rápidamente desde el sitio donde se creó para formar un gradiente local de lípidos dentro de la bicapa, las proteínas que encuentren este gradiente podrían acarrear maquinaria para la formación de vesículas (Roth *et al.*, 1997).

Para el transporte y salida de las vesículas, éstas son transportadas por la proteína Myo2 del motor de miosina V a través de filamentos de actina hacia el sitio de exocitosis. Este proceso es regulado por el PIP. Cuando la vesícula llega a la membrana plasmática, los componentes adicionales del complejo exocítico son ensamblados para anclar la vesícula a la membrana en el sitio de expulsión; este sitio es determinado por una variedad de proteínas y lípidos, principalmente PIP₂, donde actúa como un lípido activador de proteínas en la membrana (Martin, 2012; Schink *et al.*, 2016).

Se han identificado ciertos complejos activados por el PIP₂ como el receptor de fijación soluble NSF (SNARE), la proteína de membrana 2 asociado a vesículas (VAMP2), la proteína de membrana 2 de secreción asociada a acarreador (SCAMP2), la sinaptotagmina, la sinaptojanina 1 y 2 (SYNJ1 y SYNJ2) entre otras (Takenawa *et al.*, 2001; Vicinanza *et al.*, 2008; Martin, 2012), que están involucradas en el tráfico vesicular

y que alteran su actividad en función de la concentración de PIP₂ en la membrana (**Figura 6**) (Suh *et al.*, 2005; Martin, 2012; Martin 2015).

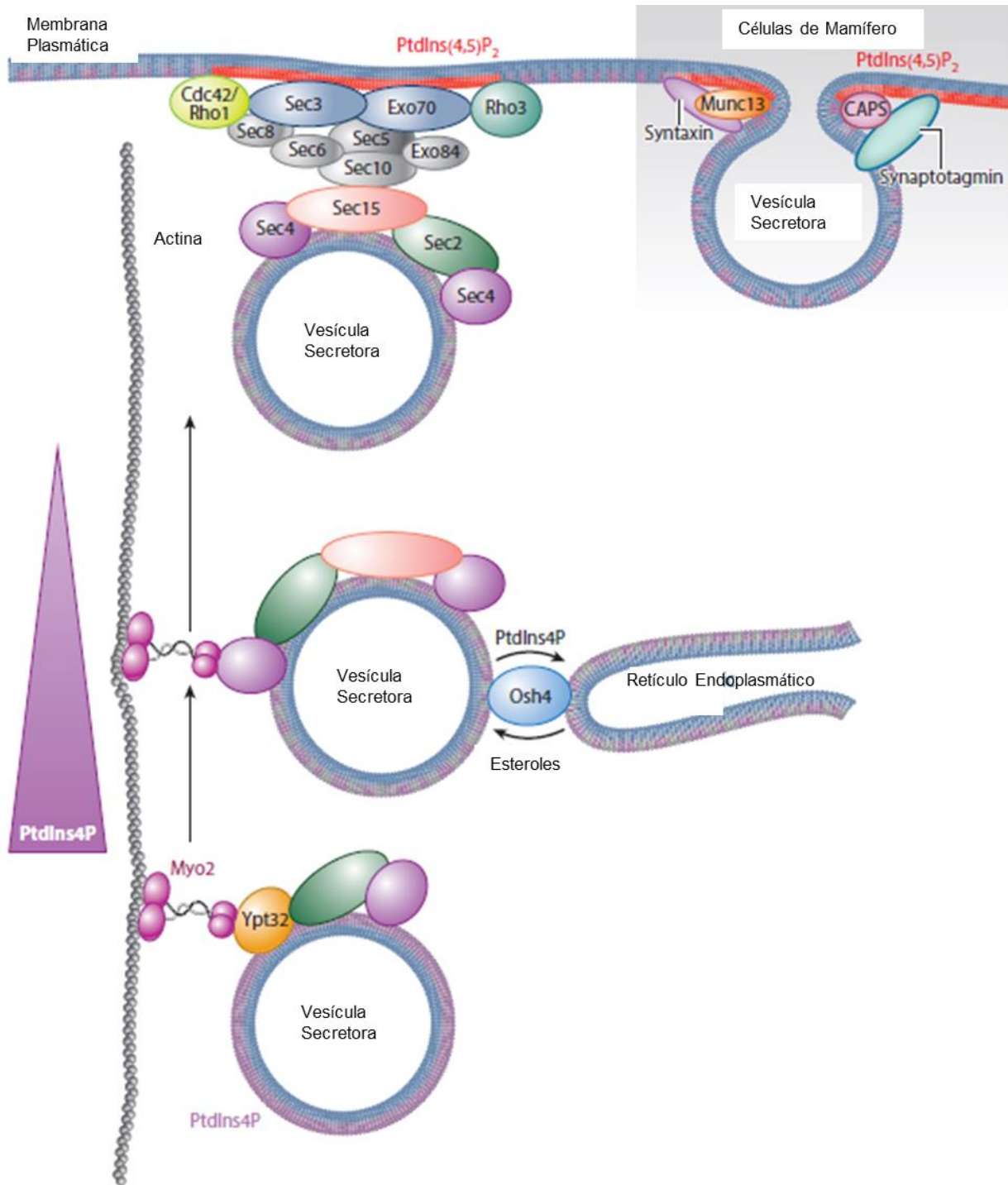


Figura 6. Exocitosis vesicular regulada por Fosfoinosítidos. Vía regulada principalmente por PIP y PIP₂ donde se muestra parte de la maquinaria necesaria para llevar a cabo el anclaje y la expulsión. Modificada de Schinko *et al.*, 2016.



Se ha sugerido que los sitios en la membrana ricos en PIP₂ son favorables para la exocitosis vesicular, el cual podría contribuir a la fusión de la membrana por medio de diversos mecanismos (Martin, 2012; Martin, 2015). Algunos estudios han demostrado que la distribución en la membrana de este lípido es irregular y que este se encuentra en microdominios con concentración correspondiente de aproximadamente 6% molar, aunque no se ha demostrado a que se deba (James *et al.*, 2008).

1.9 Superfamilia de las Ig's

El concepto de Superfamilia de Inmunoglobulinas se propuso en 1982. Las moléculas de esta familia desempeñan un amplio espectro de funciones, destacando su control del comportamiento celular (Arnaiz-Villena *et al.*, 1995). Algunas de estas proteínas son conocidas por su capacidad de reconocer o adherirse específicamente a células (Huang *et al.*, 2009), mientras que algunos miembros están involucrados en la ubicación, reconocimiento y activación de antígeno por parte de la célula. Por tanto, es de esperar que sean proteínas de membrana, aunque pueden existir formas solubles (Arnaiz-Villena *et al.*, 1995).

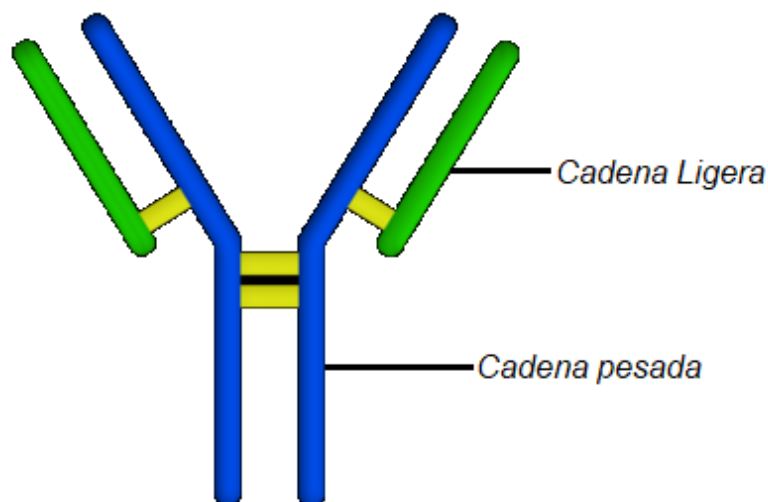


Figura 7. Estructura de una inmunoglobulina. Modificada de Kapur & Barbosa-Portela, 2012.

Las inmunoglobulinas están formadas por dos polipéptidos diferentes llamados cadenas pesadas y ligeras (**Figura 7**) (Parham, 2005). Aunque evolutivamente han evolucionado



a partir de un dominio inmunoglobulínico ancestral, que ha ido duplicándose y diversificándose. Este dominio se compone de 70 a 110 aminoácidos, organizados en dos laminas β paralelas y estabilizado por puentes disulfuro característicos. Mantiene una estructura terciaria muy conservada y se cree que es debido a su resistencia a proteasas y su posibilidad de supervivencia en un medio extracelular hostil (Arnaiz-Villena *et al.*, 1995).

Algunas de las moléculas más importantes son: el TCR, CD3, moléculas MHC clase I y II, CD4, CD8, ICAM-1, LFA-3, Thy-1, CTH, grande grupos de adhesinas, correceptores y VCAM-1 (Galaktionov, 2003; López-Martínez *et al.*, 2005).

1.9.1 CD3

El receptor CD3 comprende las subunidades CD3 γ , CD3 δ , y CD3 ϵ , que están presentes durante su transcripción en el interior de los timocitos. Estas subunidades se unen a las subunidades α y β del receptor de las células T (TCR, por sus siglas en ingles) en el retículo endoplasmático y posteriormente viajan a la membrana celular, si no existe esta relación el complejo TCR/CD3 es degradado en el interior del timocito. En la región extracelular se forman asociaciones CD3 $\gamma\epsilon$, $\delta\epsilon$, mientras que en la parte intracelular forman unidades de señalización $\zeta\zeta$; las formas CD3 $\gamma\epsilon$ y CD3 $\delta\epsilon$ forman complejos con el TCR $\alpha\beta$ y el TCR $\gamma\delta$ (**Figura 8**) (Brenner *et al.*, 1985; Samelson *et al.*, 1985; Alarcon *et al.*, 1988; Clevers *et al.*, 1988; Sussman *et al.*, 1988, Wegener *et al.*, 1995; Kuhns *et al.*, 2006).

Las proteínas del complejo TCR/CD3 se encargan de la señalización intracelular que resulta en la activación de las células T e inician la respuesta específica antígeno-célula T que responde a patógenos y vacunas, así como trasplantes, tumores y autoantígenos; además puede producir efectos como el incremento de Ca^{2+} intracelular, un estímulo del flujo de K^+ , incremento de los fosfoinosidos, activación de la proteína cinasa C, y el incremento del pH intracelular (Clevers *et al.*, 1988). Las células T no pueden reconocer antígenos si el complejo TCR/CD3 no está correctamente ensamblado, transportado y expresado eficientemente en la superficie celular (Lefranc *et al.*, 2001; Kuhns *et al.*, 2006).

El modelo por el cual el complejo TCR/CD3 se activa ha sido tema de discusión pues no se ha logrado dilucidar. Existen muchos modelos, aunque tienen diferencias, pero todos convergen en la idea de un cambio conformacional que cambia y activa al complejo (Kuhns *et al.*, 2006).

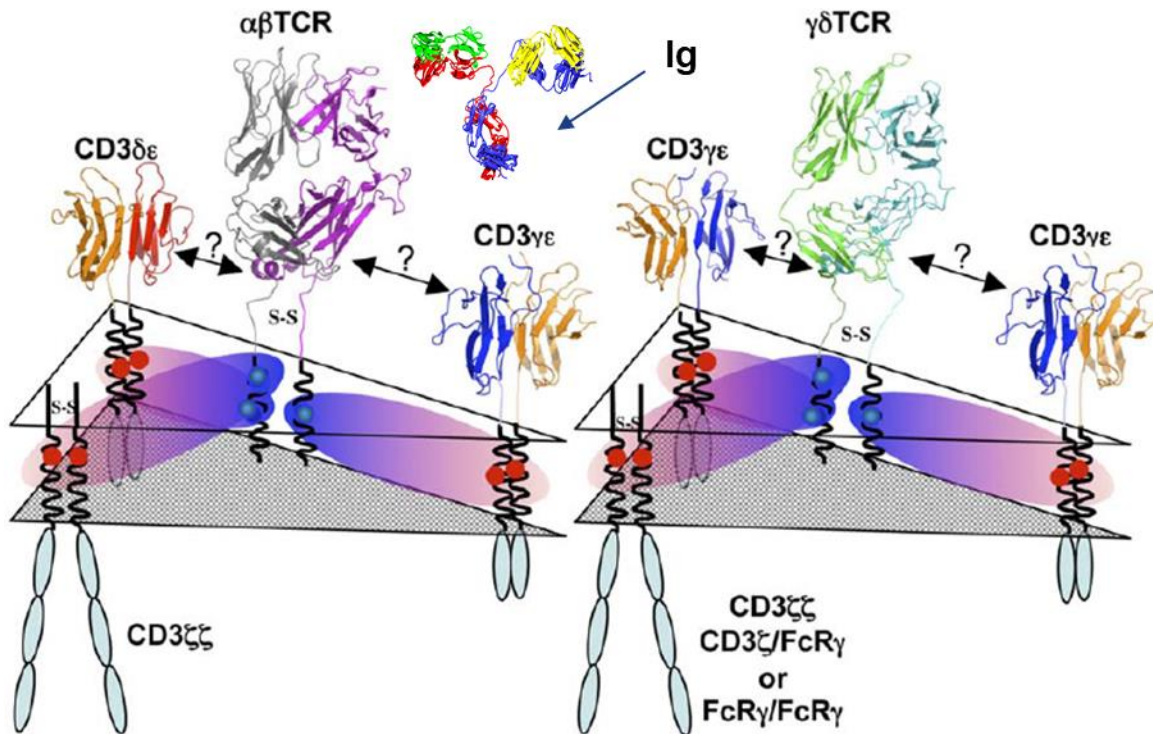


Figura 8. La anatomía del $\alpha\beta$ TCR/CD3 y del $\gamma\delta$ TCR/CD3. Se observan las diferentes variantes de los dímeros de CD3 presentes en la membrana celular y su conjugación con TCR. Además se muestra la comparación entre una inmunoglobulina humana (Ig) y el receptor CD3 Modificada de Kuhns *et al.*, 2006.

1.9.2 Complejo HLA-I

El complejo HLA-I comprende una serie de genes que codifican las proteínas HLA-A, HLA-B y HLA-C y son expresados en la mayoría de las células humanas. Las moléculas HLA-I son heterodímeros formados por una sola cadena de polipéptido transmembranal no covalente unido a una subunidad de β -2-microglobulina (β 2m) (**Figura 9**) (Pamer *et al.*, 1998; Vukmanovic *et al.*, 2001).

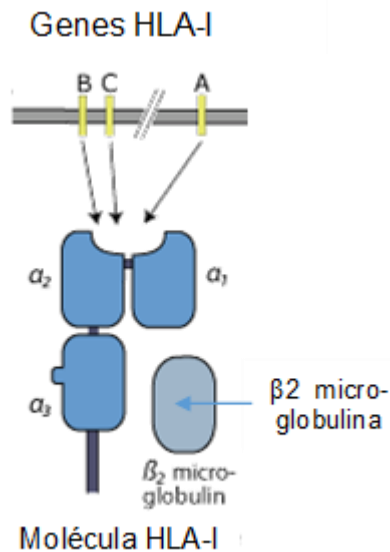


Figura 9. Estructura de los genes HLA-I. Modificada de http://medweb4.unige.ch/immunologie/home/HSC/transplantation_barriers/structures_recognized/major_histocompatibility_antigens/genetic.php

La función principal de estas moléculas es presentar péptidos para activar a las células T CD8⁺. (Janeway *et al.*, 2001; López-Martínez *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2011). Para lograr esto las moléculas de HLA-I de la célula presentadora interactúan con el complejo TCR/CD3 del linfocito CD8⁺, pero además de esto, la molécula de HLA-I también interactúa con el receptor CD8 lo que aumenta el reconocimiento de las moléculas de HLA-I por parte de los linfocitos CD8⁺ (Janeway, 1992; Garcia *et al.*, 1996). Para la presentación del péptido, los dímeros de la cadena pesada/ β 2m se unen a los péptidos generados en citosol vía degradación por proteínas del proteosoma. Estos péptidos son translocados hacia el lumen del RE por la ayuda de transportadores asociados con proceso de antígenos (TAP, por sus siglas en inglés), este transportador está conformado por dos subunidades, TAP1 y TAP2. Los péptidos son cargados en los dímeros nacientes cadena pesada/ β 2m. Esta unión permite a las moléculas HLA-I salir del RE por una vía secretora y alcanzan la superficie celular (Smith *et al.*, 2011).

Actualmente HLA-I es de relevancia clínica ya que se ha observado una mínima o completa pérdida de estas moléculas en una gran variedad de tumores sólidos y

hematopoyéticos humanos (Bukur *et al.*, 2012). Esta pérdida puede dividirse de dos maneras, reversible e irreversible. Los irreversibles son producto de defectos estructurales de HLA-I, la lámina $\beta 2$ y los genes APM (maquinaria de procesamiento de antígeno, por sus siglas en inglés) o la pérdida de TAP. Los reversibles son aquellos que se encuentran a nivel transcripcional como la represión del gen, que pueden ser operados por oncogenes activos, y/o está asociado a modificación en las histonas (Zhu *et al.*, 1999; Georgopoulos *et al.*, 2000; Fong *et al.*, 2008, Koopman *et al.*, 2000; Garrido *et al.*, 2010; Lampen *et al.*, 2011; Mimura *et al.*, 2011).

1.9.3 FcRn

Brambell (1958, 1966) teorizó que un receptor podía cumplir tres fenómenos relacionados, llamados, el catabolismo de las inmunoglobulinas circulantes, la transmisión pasiva de la inmunidad de la madre al feto, y la sensitización anafiláctica.



Figura 10. Representación esquemática de FcRn. Modificada de Boross *et al.*, 2008

Algunos años después se demostró que la unión de IgG en los intestinos de las ratas neonatales era altamente dependiente de pH, y que ocurrían a diferentes rangos en varias regiones (Rodewald, 1976; Rodewald, 1984). Así en 1985, Simister y cols., caracterizaron por primera vez un receptor Fc en el intestino de las ratas neonatales. Esta molécula la llamaron, FcRn.

FcRn se diferencia de los demás receptores Fc, tanto en estructura como en función y cumple un rol clave en las respuestas inmunitarias mediadas por anticuerpos, que se especializa en la unión con IgG (Aguilar, 2016). FcRn tiene una estructura parecida a las moléculas MHC-I pues posee una cadena pesada y una cadena ligera de $\beta 2m$ (**Figura 10**), y a diferencia de las moléculas MHC-I, FcRn no puede presentar péptido pues esta región está ocluida (Roopenian *et al.*, 2007).

La función más estudiada de FcRn es la transferencia de anticuerpos IgG de la madre hacia el feto a través de los sincitiotrofoblastos presentes en



la placenta. Esta unión de las IgG con el FcRn es dependiente de pH y solo se da en un ambiente ácido y no a pH fisiológico (Roopenian *et al.*, 2007; Boross *et al.*, 2008). Este receptor es expresado en células epiteliales, sincitiotrofoblastos de la placenta y células endoteliales (por ejemplo, hepatocitos), además de que en años recientes se ha observado su expresión en leucocitos (Blumberg *et al.*, 1995; Israel *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 2001; Chaudhury *et al.*, 2003; Roopenian *et al.*, 2003; Mi *et al.*, 2008), y también se ha observado su expresión en algunos cánceres (cáncer colorectal, el cáncer de mama y el cáncer cervicouterino) (Palma *et al.*, 2011; Aguilar, 2016). Aún se desconoce si esta es presente en células de ALL.

Otras funciones de FcRn es evitar el catabolismo de la IgG circundante y mediar la translocación de IgGs a través de las células epiteliales polarizadas en las superficies mucosas, además de jugar un rol crítico en el sistema inmune (Baker *et al.*, 2014). De todos los roles anteriores, FcRn es conocido ampliamente por el primero, sin embargo, se descubrió FcRn se encontraba en hepatocitos adultos de rata lo que indicaba que la función del FcRn no estaba limitado al sistema neonatal y fue corroborado al documentarse la expresión de FcRn en células de epitelio intestinal adulto humano (Blumberg *et al.*, 1995; Israel *et al.*, 1997). Dentro de los roles críticos en el sistema inmune se encuentran dos muy importantes que son la fagocitosis y la presentación de antígeno. En el caso de la fagocitosis se ha observado que FcRn se encuentra presente en granulos específicos en neutrófilos y que media la fagocitosis de bacterias opsonizadas con IgG, todo es dependiente de pH e independiente del reciclaje de IgG (Vidarsson *et al.*, 2006). En el caso de la presentación de antígeno FcRn juega un importante rol en las células dendríticas ya que se ha observado que puede mediar la presentación de antígeno a través de moléculas del MHC-I y MHC-II (Roopenian *et al.*, 2003, Qiao *et al.* 2008; Montoyo *et al.*, 2009). Se ha observado cómo estas células dendríticas activan linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en presencia de distintos patógenos como *Citrobacter rodentium* (Yoshida *et al.*, 2006), *Francisella tularensis* (Gosselin *et al.*, 2009; Iglesias *et al.*, 2013); y virus como el VIH, influenza y herpes simple (Bai *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2011), y no solo distintos patógenos sino que en el caso del cáncer



se ha observado que las células dendríticas median la respuesta inmune contra el tumor a través de la presentación de antígeno dependiente de FcRn (Baker *et al.*, 2013).



2. Antecedentes Directos

- DiSanto *et al.* (1989), observaron cómo afectaban los compuestos formol miristato acetato (PMA, por sus siglas en inglés), y la fitohemaglutinina en la modulación de la expresión de marcadores de membrana (CD4 y CD8) de Linfocitos T y células L de ratón.
- Sackstein (1993), midió los cambios de expresión de marcadores como LECAM-1, CD44, y LFA-1, tras un estímulo con Metilprednisolona (un corticosteroide) para dilucidar el porqué de la linfopenia inducida por esteroides.
- Zhang *et al.* (1994), observaron el efecto del PMA sobre marcadores como CD5, CD8, CD4, MHC I, y MHC II, en linfocitos equinos; solo CD4 parecía responder ante este estímulo.
- Haczku *et al.* (1996), compararon el efecto de las drogas Dexametosona y ciclosporina A, en la regulación de los marcadores de membrana CD3, CD4, CD8 y CD25 haciendo una correlación con la inhibición de la proliferación.
- Kabelitz *et al.* (1996), compararon el efecto de un antígeno de Fas, OKT3 y el PMA sobre la expresión de diversos marcadores como CD3, CD4, CD7, CD8, CD44, CD62L, CD69, CD70, LFA-1 α y LFA-1 β .
- Urias (2016), demostró que los liposomas formulados con un lípido cíclico tienen la capacidad de aumentar la expresión del receptor Fc γ RIII (CD16) en dos líneas celulares de cáncer de cérvix CALO e INBL.
- Aguilar (2016); demostró que la IL-2 puede aumentar significativamente la expresión del receptor FcRn, pero no de CD16 en dos líneas de Cáncer Cervicouterino.
- García (2017) demostró que LIPI, pero no el PI libre, puede inducir la movilización del receptor opioide δ (DOR) en LSP's, la línea celular HepG2 y la línea celular Reh.



3. Justificación

La ALL es una de las enfermedades malignas más comunes entre los niños de 0-4 años de edad y casi el 72% de los cánceres en los niños de esa edad son de este tipo. Por esto se han estudiado terapias alternativas para combatir este tipo de leucemias sin los efectos secundarios recurrentes.

El empleo de liposomas como biotransportadores de sustancias antitumorales presenta diversas ventajas que han impulsado su utilidad en el campo de las terapias alternativas contra el cáncer.

En el Laboratorio de Oncología Celular de la UMIEZ en la FES Zaragoza ha probado el uso de liposomas formulados con PI (LIPI) y del PI libre en la movilización de receptores de membrana en células linfoides y de diferentes líneas celulares de Cáncer Cérvico Uterino (CaCu) y de ALL.

Por lo anterior, el presente estudio tiene como objetivo evaluar el efecto de estos liposomas y del lípido libre sobre la línea celular de Leucemia Linfóide Aguda Reh y su papel en la regulación de la expresión de los receptores de membrana HLA-I, FcRn y CD3. Los cuales cumplen importantes funciones dentro de la respuesta inmune, y tienen relevancia clínica en células tumorales.



4. Hipótesis

Se ha observado que los liposomas formulados (LIPI) y el PI libre tienen capacidad para movilizar marcadores de membrana presentes en las células de cáncer cérvico uterino, por lo tanto si usamos LIPI y el PI libre en células de la línea Reh, entonces observaremos cambios en la expresión de los receptores CD3, HLA-I y FcRn.



5. Objetivos

5.1 Objetivo General

- Observar el efecto del lípido libre (PI) y de los liposomas formulados (LIPI) sobre la expresión de los receptores HLA-I, FcRn y CD3 a través del análisis con anticuerpos y su evaluación por citometría de flujo en la línea celular Reh y Linfocitos de Sangre Periférica (LSP's).

5.2 Objetivo Particular

- Obtener cultivos celulares de la línea celular Reh y los LSP's.
- Analizar la expresión basal de los receptores CD3, HLA-I y FcRn en la línea celular Reh y en los LSP's
- Evaluar el efecto de PI y LIPI sobre la expresión de los receptores CD3, HLA-I y FcRn en la línea celular Reh y los LSP's.
- Analizar si existe alguna diferencia entre el PI y el LIPI.



6. Metodología

6.1 Material Biológico

6.1.1 Línea celular de LLA Reh

La línea celular Reh fue una de las primeras ALL no T, no B en ser aisladas y caracterizada; data de la década de los 70's por el grupo de Rosenfeld *et al.* (1977) y contiene el siguiente inmunofenotipo: CD3 A, B, C, CD4, CD10, HLA-DR, CD19, CD22, CD38, CD79a, CD135, y la parte $\lambda 5$ de la cadena subrogada ligera del receptor pre B (pre-BCR) (Matsuo, 1998; Tsuganezawa *et al.*, 1998; Managò *et al.*, 2016). No contiene el virus de Epstein-Barr. Ha sido utilizada para el estudio de fármacos para combatir este tipo de leucemias o su estudio en general (Mohammad *et al.*, 1991; Sun *et al.*, 2011).

6.1.2 Obtención de Linfocitos de Sangre Periférica (LSP's) Humanos.

Los LSP's fueron obtenidos a partir de una muestra de sangre periférica normal, obtenida por punción venosa, la cual fue heparinizada. La separación se realizó siguiendo el método de gradiente de Ficoll-Histopaque (Sigma Aldrich®).

En condiciones de esterilidad se obtuvieron 10-15mL de sangre periférica, utilizando el sistema vacutainer (BD Biosciences®), se utilizó el tubo vacutainer morado de 4 mL con 7.2 mg de K₂-EDTA. Una vez recolectadas las muestras se trasladaron al Laboratorio de Oncología Celular (L-4 PB) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria Experimental Zaragoza (UMIEZ). Se colocó la sangre en un tubo cónico de 15 mL (Corning) en proporción 1:1 con Ficoll-Histopaque-1077 (Sigma Aldrich), teniendo extremo cuidado en no mezclar las dos fases, y se centrifugó por 30 minutos a 400g. Transcurrido el tiempo de centrifugado, se observaron las tres fases de separación, situando a las células mononucleares en la interfase, entre el paquete de eritrocitos, Ficoll-Histopaque y el plasma. Se colectó el halo blanco de células y se transfirió a un tubo de vidrio de 15 mL con 2mL de RPMI-1640 (MICROLAB®) frío, para realizar un lavado, se obtuvo el botón celular y se resuspendió en RPMI al 20% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO®) y se pasaron a cajas Petri (Corning®) de 100x20 mm. Se esperó 3 horas a que los monocitos se pegaran, posteriormente se tomó solo el medio con las células en suspensión y se dejaron con medio RPMI-1640 al 20% de SFB. Los LSP's fueron mantenidos en



incubadora (Form Scientific, EUA) con una temperatura de 37° C, y pH 7.2 a 7.4; con una atmósfera húmeda saturante al 5% de CO₂ hasta su uso.

6.2 Cultivo celular

La línea celular Reh se cultivó con medio RPMI-1640 al 10% de SFB. La línea celular fue mantenida en incubadora (Form Scientific, EUA) con una temperatura de 37° C, y pH 7.2 a 7.4; con una atmósfera húmeda saturante al 5% de CO₂.

La línea celular Reh se cultivó en cajas de cultivo para células en suspensión de 25 cm² y 75 cm² (Ultra Cruz®). La resiembra se realizó cada 48 hrs con una densidad celular de 200,000 células por mL. A la hora de la resiembra se obtenía el medio con las células y se colocaba en un tubo cónico esteril de 15 mL (Corning®) y se centrifugaba por 5 minutos a 2000 rpm en una centrifuga clínica (Thermo Cientific®) para obtener un botón, el cual se resuspendía en 1mL de RPMI-1640, a continuación se evaluó la viabilidad celular por exclusión con azul de Tripano (Sigma ®), estableciendo como valor mínimo de viabilidad el 95%, posteriormente se calculó la densidad celular por conteo en la cámara de Neubauer (American Optical, EUA) para así obtener 1x10⁶ células para cada condición a evaluar por citometría de flujo.

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

6.3 Tratamiento celular con PI libre y liposomas formulados con PI (LIPI)

Se realizaron tres ensayos experimentales continuos, partiendo de 1x10⁶ células de la línea celular Reh y los LSP, estos fueron puestos en tubos de 1.5 mL (Eppendorf®) y fueron estimulados con la dosis A de LIPI o la dosis B de PI. Los tubos fueron dejados en la incubadora a 37°C, y pH 7.2 a 7.4; con una atmósfera húmeda saturante al 5% de CO₂ por 30 minutos.

El tiempo utilizado fue elegido de acuerdo a un trabajo previo donde por 30 minutos se evaluó el efecto del LIPI y PI sobre la vía de señalización PI3K/AKT y la expresión del



receptor FcγRIII (CD16), pasado los 30 minutos se observaba un aumento en la expresión de CD16 (Urias, 2016).

6.4 Marcaje con Anticuerpos y visualización por citometría de flujo

Posteriormente al tratamiento con LIPI o PI, se realizó un lavado con PBS y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos. Se decantó el PBS y el botón fue resuspendido en 50 µl de anti-HLA-I (Sigma Aldrich®) (1:10), se homogenizó suavemente la suspensión, se incubó a 4°C y en oscuridad por 45 minutos. Para la detección del FcRn, se utilizó un anticuerpo anti-FcRn (Santa Cruz Biotechnology®) (2.5:100) y un anticuerpo secundario donkey anti-goat IgG FITC (Santa Cruz Biotechnology®) (6:100). Para la detección de CD3, se utilizó un anticuerpo anti-human CD3 (DAKO®) (1:10) y un anticuerpo secundario mouse anti-human IgG FITC (Sigma Aldrich®) (1:64). Se siguió con el protocolo establecido por el proveedor. Cumplido el tiempo de incubación se colocó 1 mL de Perm Wash (BD Biosciences®) para HLA-I y FcRn, y 1mL de PBS-10% SFB para CD3, se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos, el pellet celular fue resuspendido en 500 µl de solución FACS para evaluar en el Citómetro de Flujo FACS ARIA II (BD Biosciences®). Los resultados fueron analizados con el software Flowing Software 2.5.1 y con el software FlowJo versión 10 (Free).



7. Resultados

Determinación de los receptores HLA-I, FcRn y CD3, en Linfocitos de Sangre Periférica (LSP's) y la línea celular Reh, por medio de citometría de flujo. Los datos obtenidos fueron analizados mediante el software Flowing Software 2.5.1 y el software FlowJo versión 10 (free).

7.1. Linfocitos de Sangre Periférica

Los resultados muestran que los experimentos en que los LSP's fueron cultivados en presencia de LIPI se observaron incrementos en los receptores para HLA-I, FcRn y CD3, a diferencia de los resultados obtenidos en los cultivos con PI libre, en donde se observó que la expresión de los receptores antes citados se mantiene, indicando que PI libre tiene una actividad baja.

- **Expresión de HLA-I en células cultivadas en ausencia y presencia de LIPI y PI**

Se analizó la expresión basal del receptor HLA-I en LSP's y el efecto de liposomas formulados con PI (LIPI) y de PI libre sobre dicha expresión. Se realizaron cultivos de LSP's en presencia y ausencia de LIPI y PI libre por 30 minutos. En el caso de los linfocitos cultivados con LIPI (azul) se observa el aumento tanto en el porcentaje de LSP's positivos a HLA-I como en la intensidad media de fluorescencia (IMF) de HLA-I (**Figura 11A**), mientras que para los linfocitos cultivados con PI (verde) el porcentaje de LSP's positivos a HLA-I disminuyó y la IMF de HLA-I se mantuvo (**Figura 11B**) en comparación del basal (rojo).

Respecto a la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF), para los cultivos en presencia de LIPI, se incrementó de 194 (basal) a 906, mientras que en los cultivos en presencia de PI la IMF pasó de 194 a 205. (**Grafica 1 y Tabla 1**). El porcentaje de LSP's positivos a HLA-I en los cultivos en presencia de LIPI aumento de 95.4% (basal) a 97.9%, mientras que para los cultivos con PI disminuyó de 95.4% a 94.6% de LSP's positivos a este receptor (**Tabla 1**).

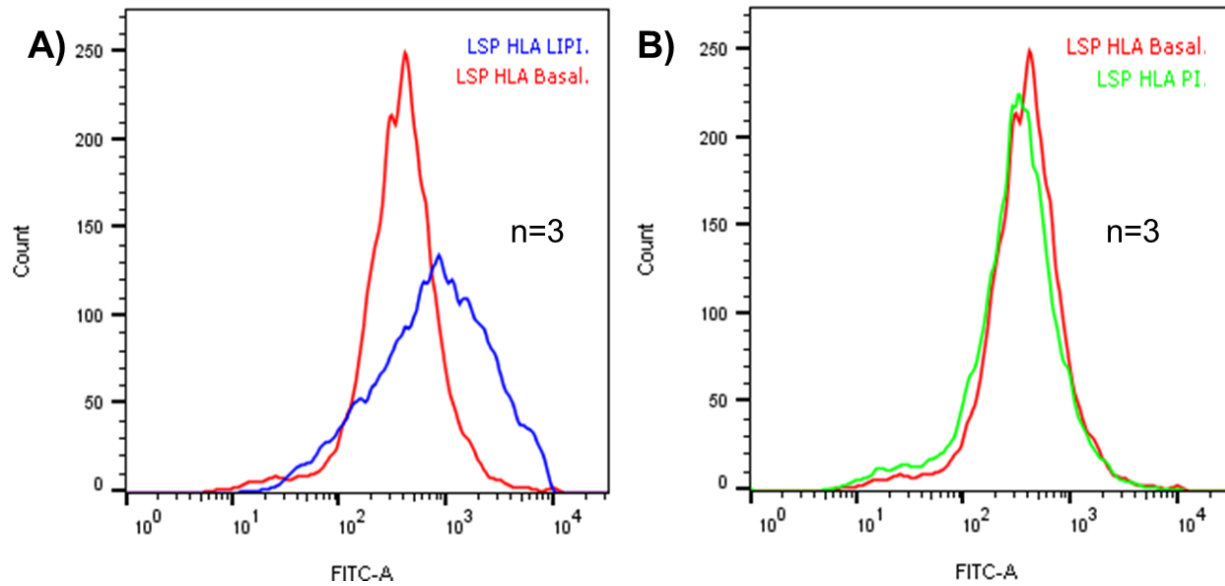
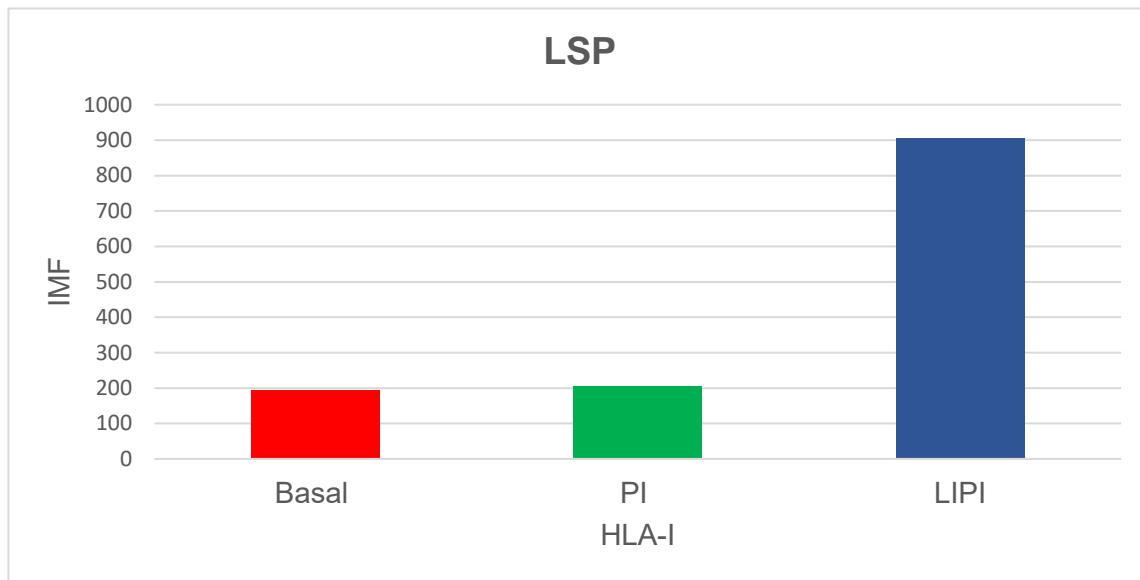


Figura 11. Expresión del receptor HLA-I en LSP's. Se observa que hay un aumento de LSP's positivos a HLA-I y en la Intensidad Media de Fluorescencia en los cultivos en presencia de LIPI (Azul), por su parte los LSP's cultivados en presencia de PI (verde) mantienen la expresión en comparación de la expresión basal (rojo). n= número de experimentos realizados.



Grafica 1. Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) del Receptor HLA-I en LSP's. Se observa el incremento de la IMF en los cultivos en presencia de LIPI (Azul), por su parte los LSP's cultivados en presencia de PI (Verde) mantienen la IMF en comparación de la IMF basal (Rojo).



	Basal	PI	LIPI
Porcentaje de Células positivas (%)	95.4	94.6 (-0.8)*	97.9 (+2.5)*
Intensidad Media de Fluorescencia (\bar{x})	194	205	906

Tabla 1. Porcentaje de LSP's positivos a HLA-I e Intensidad Media de Fluorescencia.

LSP's cultivados por 30 minutos en presencia de LIPI o PI. *Diferencia del % de LSP's positivos a HLA-I con respecto al basal.

- **Expresión de FcRn en células cultivadas en ausencia y presencia de LIPI y PI**

Se analizó la expresión basal del receptor FcRn en LSP's y el efecto de LIPI y de PI libre sobre dicha expresión. Se realizaron cultivos de LSP's en presencia y ausencia de LIPI y el PI libre por 30 minutos. En el caso de los linfocitos cultivados con LIPI (azul) tanto el porcentaje de LSP's positivos a FcRn como la IMF de FcRn aumentaron (**Figura 12A**), mientras que para los linfocitos cultivados con PI (verde) el porcentaje de LSP's positivos a FcRn disminuyó, y la IMF de FcRn se aumentó (**Figura 12B**) en comparación del basal (rojo).

Para la IMF, observamos que en los cultivos en presencia de LIPI la IMF aumentó de 163 (basal) a 443, mientras que los cultivos en presencia de PI la IMF pasó de 163 (basal) a 183. (**Grafica 2 y Tabla 2**). En el porcentaje de LSP's positivos a FcRn, los cultivos en presencia de LIPI aumentó de 98.3% (basal) a 98.6%, mientras que para los cultivos con PI el porcentaje de LSP's positivos disminuyó de 98.3% (basal) a 98.2% de LSP's positivos a este receptor (**Tabla 2**).

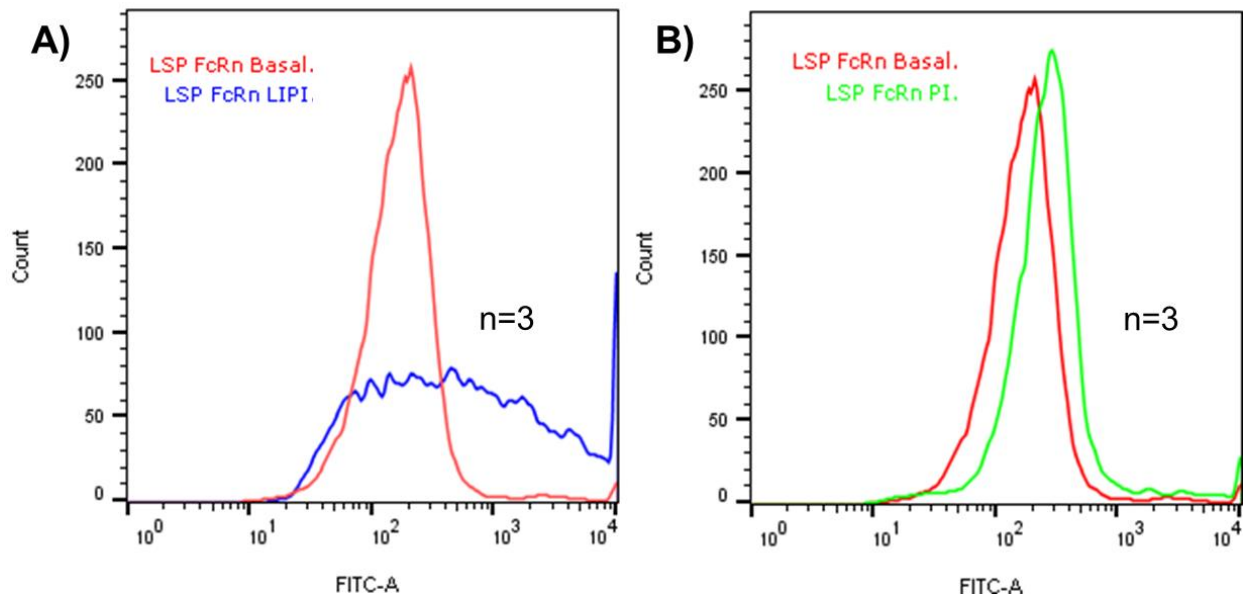
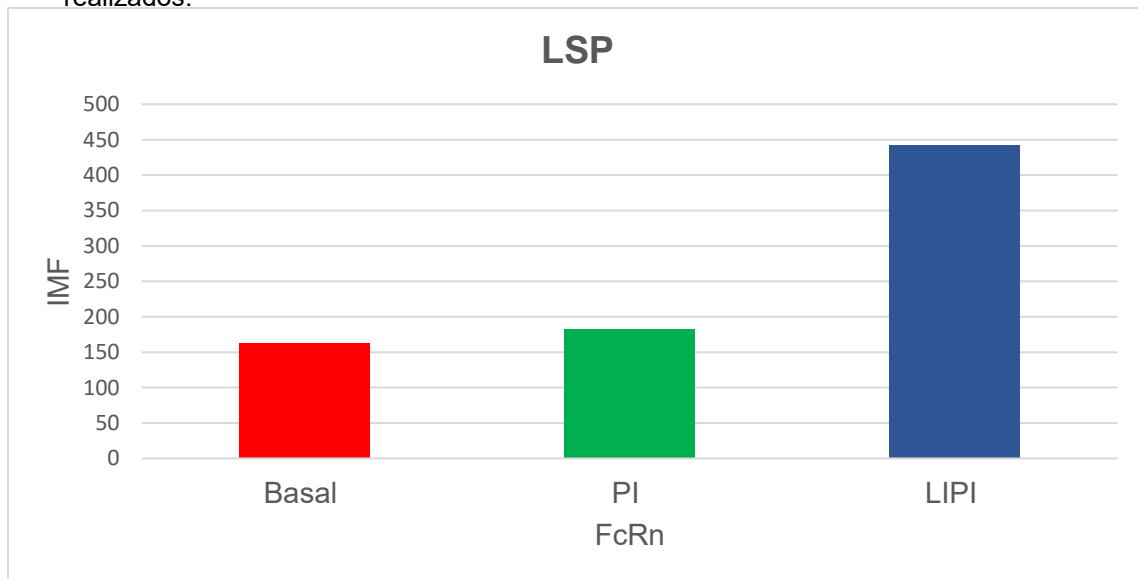


Figura 12. Expresión del receptor FcRn en LSP's. Se observa que hay un aumento de LSP's positivos a FcRn y en la Intensidad Media de Fluorescencia en los cultivos en presencia de LIPI (Azul), por su parte los LSP's cultivados en presencia de PI (verde) la expresión se ve afectada en comparación de la expresión basal (rojo). n= número de experimentos realizados.



Grafica 2. Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) del Receptor FcRn en LSP's. Se observa el incremento de la IMF en los cultivos en presencia de LIPI (Azul), por su parte los LSP's cultivados en presencia de PI (Verde) también aumenta la IMF en comparación de la IMF basal (Rojo).



	Basal	PI	LIPI
Porcentaje de Células Positivas (%)	98.3	98.2 (-0.1)*	98.6 (+0.3)*
Intensidad Media de Fluorescencia (\bar{x})	163	183	443

Tabla 2. Porcentaje de LSP's positivos a FcRn e Intensidad Media de Fluorescencia.

LSP's cultivados por 30 minutos en presencia de LIPI o PI. *Diferencia del % de LSP's positivos a FcRn con respecto al basal.

- **Expresión de CD3 en células cultivadas en ausencia y presencia de LIPI y PI**

Se analizó la expresión basal del receptor CD3 en LSP's y el efecto de LIPI y de PI libre sobre dicha expresión. Se realizaron cultivos de LSP's en presencia y ausencia de LIPI y PI libre por 30 minutos. En el caso de los linfocitos cultivados con LIPI (azul) se observa el aumento tanto en el porcentaje de LSP's a CD3 como en la IMF de CD3 (**Figura 13A**), mientras que para los linfocitos cultivados con PI (verde) tanto el porcentaje de LSP's positivos a CD3 como la IMF de CD3 se mantuvo (**Figura 13B**) en comparación al basal (rojo).

Con respecto a la IMF, en los cultivos en presencia de LIPI se incrementó de 21 a 1804 con respecto al basal, mientras que en los cultivos en presencia de PI libre se disminuyó la IMF de 21 a 20 con respecto al basal (**Grafica 3 y Tabla 3**). El porcentaje de LSP's positivos a CD3 en los cultivos en presencia de LIPI aumentó de 15.1% (basal) a 99%, mientras que para los cultivos con PI libre disminuyó de 15.1% (basal) a 14.7% de LSP's positivos a este receptor (**Tabla 3**).

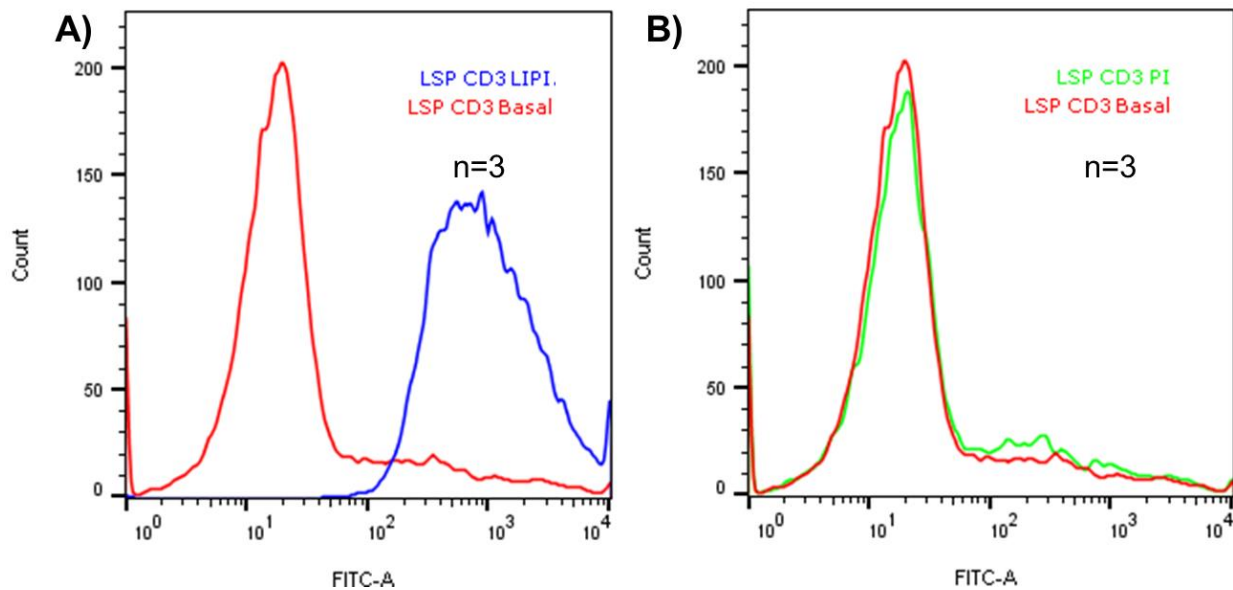
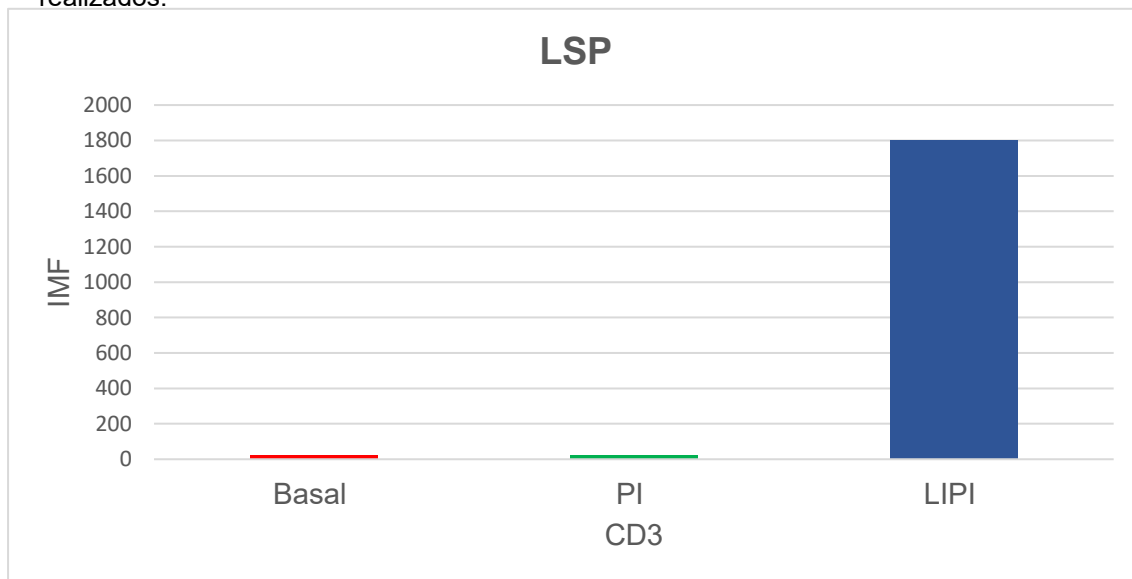


Figura 13. Expresión del receptor CD3 en LSP's. Se observa que hay un aumento de LSP's positivos a CD3 y en la Intensidad Media de Fluorescencia en los cultivos en presencia de LIPI (Azul), por su parte los LSP's cultivados en presencia de PI (verde) disminuyeron la expresión en comparación de la expresión basal (rojo). n= número de experimentos realizados.



Grafica 3. Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) del Receptor CD3 en LSP's. Se observa el incremento de la IMF en los cultivos en presencia de LIPI (Azul), por su parte los LSP's cultivados en presencia de PI (Verde) mantienen la IMF en comparación de la IMF basal (Rojo).



	Basal	PI	LIPI
Porcentaje de Células Positivas (%)	15.1	14.7 (-0.4)*	99 (+83.9)*
Intensidad Media de Fluorescencia (x̄)	21	20	1804

Tabla 3. Porcentaje de LSP's positivos a CD3 e Intensidad Media de Fluorescencia.

LSP's cultivados por 30 minutos en presencia de LIPI o PI. *Diferencia del % de LSP's positivos a CD3 con respecto al basal.



7.2. Línea Celular Reh

Los resultados muestran que los experimentos donde las células Reh fueron cultivadas en presencia de LIPI se observaron incrementos en los receptores de para HLA-I, FcRn y CD3, a diferencia de los resultados obtenidos en los cultivos con PI libre , en donde solo se observaron incrementos en los receptores HLA-I y FcRn solamente.

- **Expresión de HLA-I en células cultivadas en ausencia y presencia de LIPI y PI**

Se analizó la expresión basal del receptor HLA-I en la línea celular Reh y el efecto de LIPI y de PI solo sobre dicha expresión. Se realizaron cultivos de la línea celular Reh en presencia y ausencia de LIPI y el PI libre por 30 minutos. Tanto en las células Reh cultivadas en presencia de LIPI (azul), como en las células Reh cultivadas en presencia de PI (verde) se observa el aumento tanto en el porcentaje de células Reh positivas a HLA-I como en la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de HLA-I (**Figura 14A y Figura 14B**) con respecto al basal, aunque el efecto es mayor con las células en presencia de LIPI.

La IMF de HLA-I en los cultivos en presencia de LIPI aumentó de 65 a 224 con respecto al basal, mientras que en los cultivos en presencia de PI el aumento fue de 65 a 112 con respecto al basal (**Grafica 4 y Tabla 4**). Para el porcentaje de células Reh positivas a HLA-I encontramos que en los cultivos en presencia de LIPI aumentó de 54.6% a 74.5% con respecto al basal, mientras que para los cultivos con PI se muestra el aumento de 54.6% a 63.2% de células Reh positivas a HLA-I en comparación a la expresión basal (**Tabla 4**). Estos resultados demuestran que la línea celular Reh tiene disminuida la expresión de HLA-I, ya que mientras en los linfocitos la expresión basal fue de 90.897%, Reh tuvo una expresión de 54.0433%, casi 40% menos en relación a los linfocitos, entrado en el rango de 30-80% de expresión menor (Garrido *et al.*, 2010).

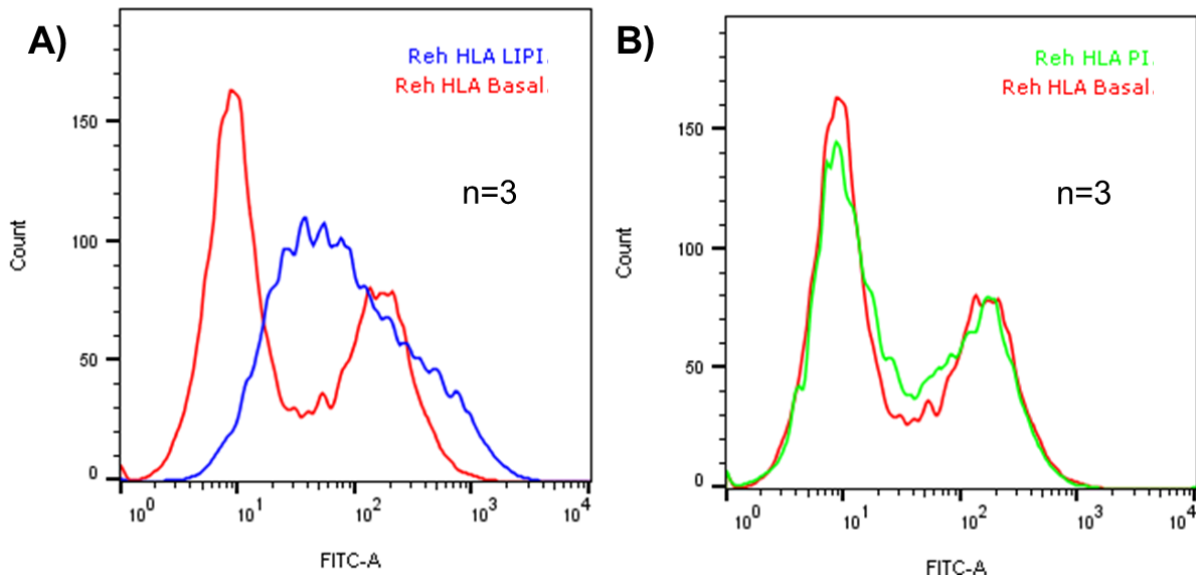
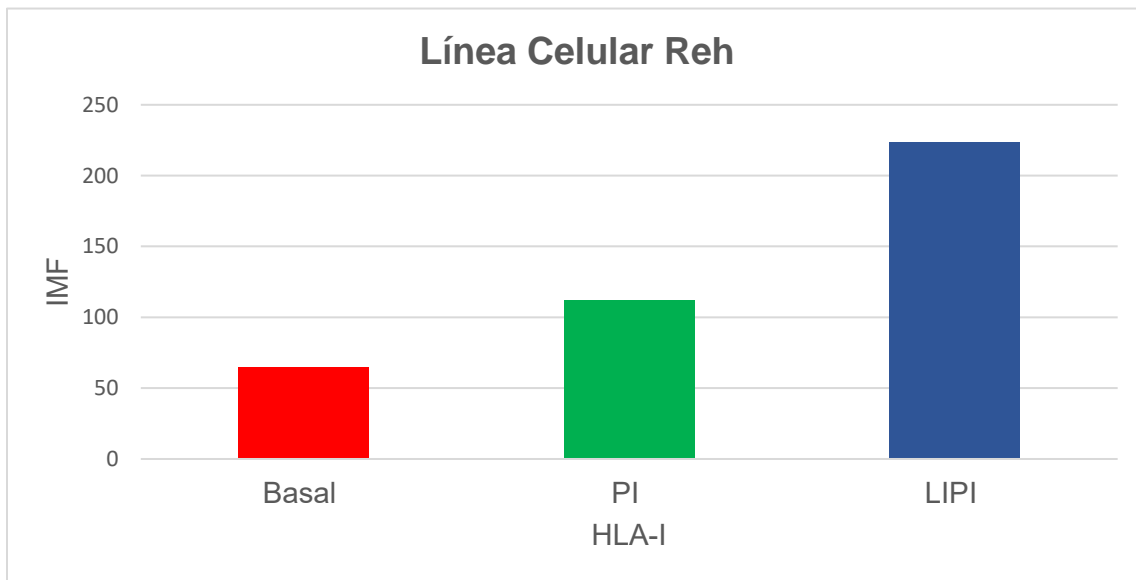


Figura 14. Expresión del receptor HLA-I en la línea celular Reh. Se observa que hay un aumento de las células Reh positivas a HLA-I y en la Intensidad Media de Fluorescencia en los cultivos en presencia de LIPI (Azul), por su parte las células Reh cultivadas en presencia de PI (verde) también incrementan la expresión en comparación de la expresión basal (rojo). n= número de experimentos realizados.



Grafica 4. Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) del Receptor HLA-I en la Línea Celular Reh. Se observa el incremento de la IMF en los cultivos en presencia de LIPI (Azul), por su parte los LSP's cultivados en presencia de PI (Verde) también incrementan la IMF en comparación de la IMF basal (Rojo).



	Basal	PI	LIPI
Porcentaje de Células Positivas (%)	54.6	63.2 (+8.6)*	74.5 (+19.9)*
Intensidad Media de Fluorescencia (\bar{x})	65	112	224

Tabla 4. Porcentaje de células Reh positivas a HLA-I. Células Reh cultivadas por 30 minutos en presencia de LIPI o PI. *Diferencia del % de células Reh positivas a HLA-I con respecto al basal.

- **Expresión de FcRn en células cultivadas en ausencia y presencia de LIPI y PI**

Se analizó la expresión basal del receptor FcRn en la línea celular Reh y el efecto de LIPI y de PI libre sobre dicha expresión. Se realizaron cultivos de la línea celular Reh en presencia y ausencia de LIPI y PI libre por 30 minutos. Tanto en las células Reh cultivadas con LIPI (azul), como en las células Reh cultivadas con PI (verde) se observa un aumento en el porcentaje de células Reh positivas así como de la IMF de FcRn (**Figura 15A y Figura 15B**) con respecto al basal, aunque el efecto es mayor con las células en presencia de PI.

Con respecto a la IMF de FcRn, en los cultivos en presencia de LIPI incrementó de 84 a 167 con respecto al basal, mientras que en los cultivos en presencia de PI libre la IMF incrementó de 84 a 95, observándose el aumento en ambos casos (**Grafica 5 y Tabla 5**). En contraparte, el porcentaje de células Reh positivas a FcRn en los cultivos en presencia de LIPI aumento de 87.4% a 88.2%, mientras que para los cultivos con PI se aumentó de 87.4% a 90.8% en comparación al basal (**Tabla 5**). Es importante resaltar que mientras PI induce una mayor cantidad de células positivas a FcRn, LIPI induce una mayor expresión del receptor en las células que previamente ya lo tenían. Además la expresión basal de este receptor es un dato completamente nuevo ya que este receptor no ha sido



caracterizado en esta línea celular y podría funcionar como un marcador en el diagnóstico de esta leucemia.

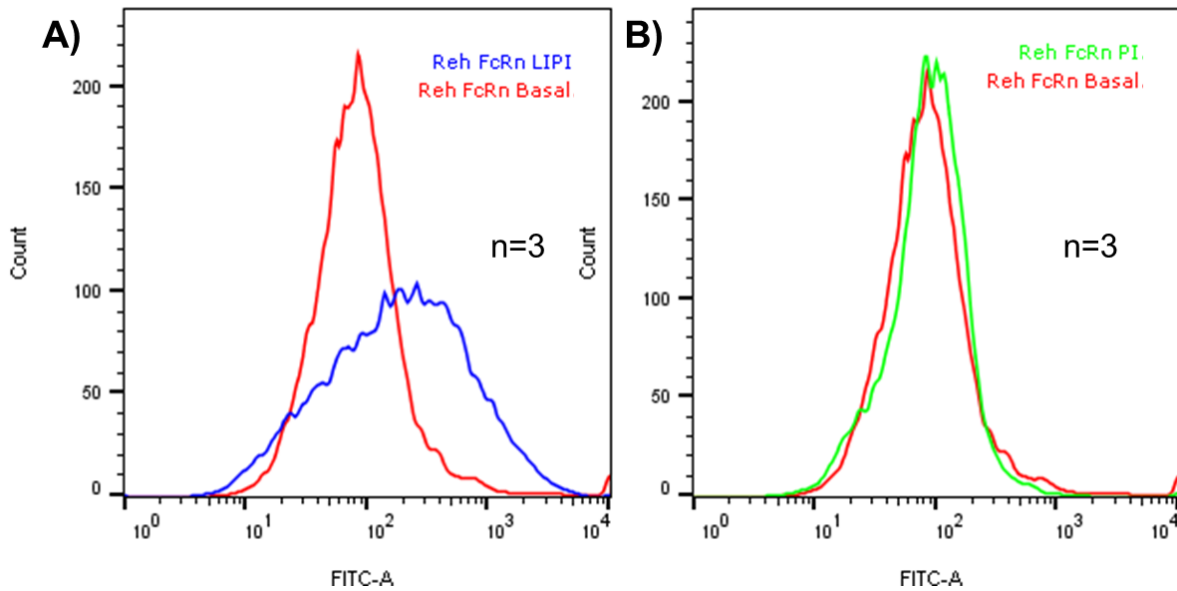
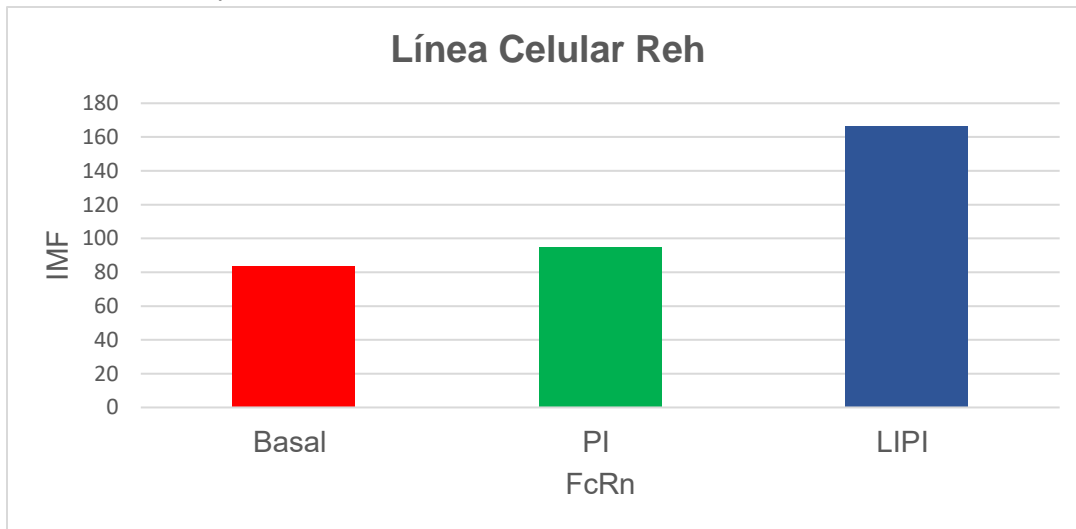


Figura 15. Expresión del receptor FcRn en la línea celular Reh. Se observa que hay un aumento de las células Reh positivas a FcRn y en la Intensidad Media de Fluorescencia en los cultivos en presencia de LIPI (Azul), por su parte las células Reh cultivadas en presencia de PI (verde) también aumentaron la expresión en comparación de la expresión basal (rojo). n= número de experimentos realizados.



Grafica 5. Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) del Receptor FcRn en la Línea Celular Reh. Se observa el incremento de la IMF en los cultivos en presencia de LIPI (Azul), por su parte los LSP's cultivados en presencia de PI (Verde) también incrementan la IMF en comparación de la IMF basal (Rojo).



	Basal	PI	LIPI
Porcentaje de Células Positivas (%)	87.4	90.8 (+3.4)*	88.2 (+0.9)*
Intensidad Media de Fluorescencia (x̄)	84	95	167

Tabla 5. Porcentaje de células Reh positivas a FcRn e Intensidad Media de Fluorescencia. Células Reh cultivadas por 30 minutos en presencia de LIPI o PI.

*Diferencia del % de células Reh positivas a FcRn con respecto al basal.

- **Expresión de CD3 en células cultivadas en ausencia y presencia de LIPI y PI**

Se analizó la expresión basal del receptor CD3 en la línea celular Reh y el efecto de LIPI y de PI libre sobre dicha expresión. Se realizaron cultivos de la línea celular Reh en presencia y ausencia de LIPI y PI libre por 30 minutos. En el caso de las células Reh cultivadas con LIPI (azul) se observa el aumento en el porcentaje de células Reh positivas a CD3 así como de la IMF de CD3 (**Figura 16A**), mientras que para las células Reh cultivadas con PI (verde) el porcentaje de células Reh positivas a CD3 disminuyó pero no así la IMF que aumenta (**Figura 16B**) en comparación de la expresión basal (rojo).

La IMF en los cultivos en presencia de LIPI aumentó de 61 a 354 con respecto al basal, mientras que en los cultivos en presencia de PI aumentó de 61 a 72. Para el porcentaje de células Reh positivas a CD3, en los cultivos en presencia de LIPI aumento de 3.4% a 76.7%, mientras que para los cultivos con PI se disminuyó de 3.4% a 3.2% de células Reh positivas a este receptor en comparación a la expresión basal (**Tabla 6**).

Estos datos muestran que PI puede inducir una mayor expresión CD3 en células Reh, pero disminuye el porcentaje de células positivas a CD3, mientras que LIPI favorece en ambos casos al receptor CD3.

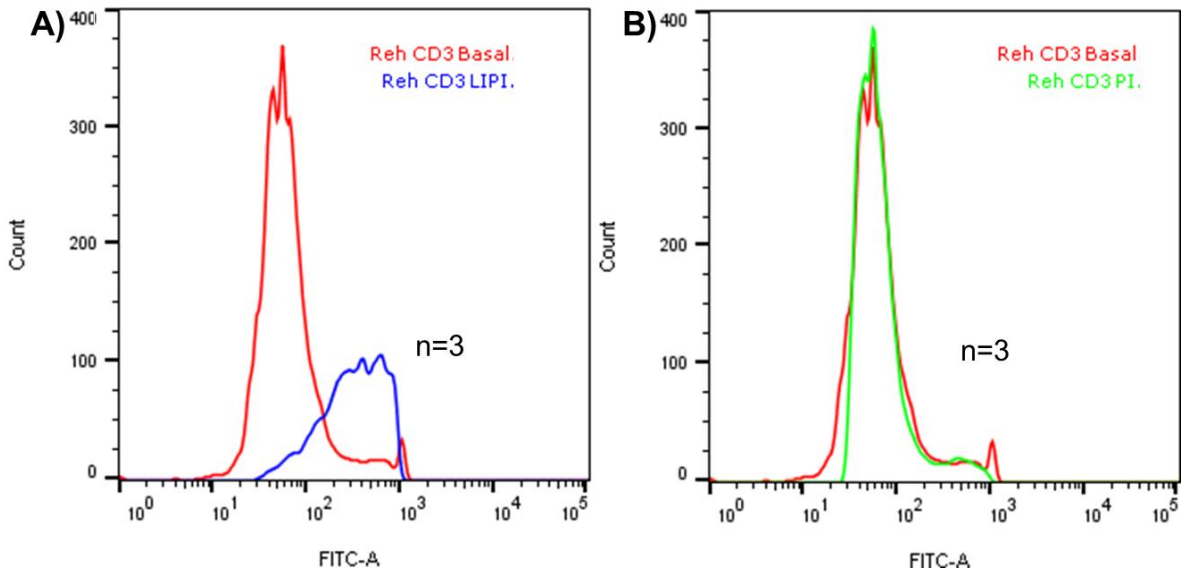
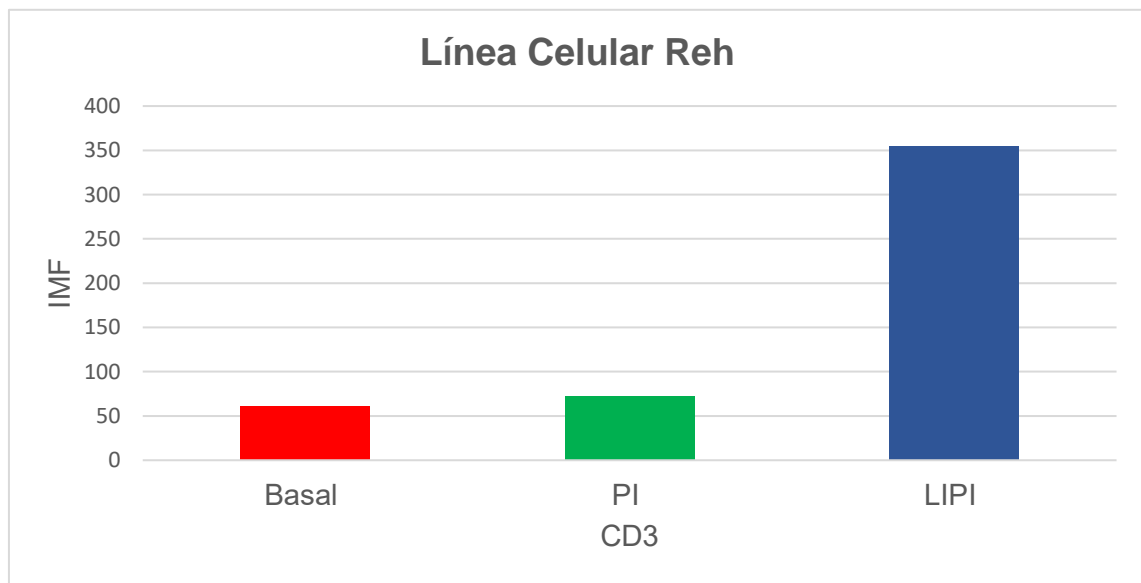


Figura 16. Expresión del receptor CD3 en la línea celular Reh. Se observa que hay un aumento de las células Reh positivas a CD3 y la Intensidad Media de Fluorescencia en los cultivos en presencia de LIPI (Azul), por su parte las células Reh cultivadas en presencia de PI (verde) mantuvieron la expresión en comparación de la expresión basal (rojo). n= número de experimentos realizados.



Grafica 6. Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) del Receptor CD3 en la Línea Celular Reh. Se observa el incremento de la IMF en los cultivos en presencia de LIPI (Azul), por su parte los LSP's cultivados en presencia de PI (Verde) también incrementan la IMF en comparación de la IMF basal (Rojo).



	Basal	PI	LIPI
Porcentaje de Células Positivas (%)	3.4	3.2 (-0.2*)	76.7 (+73.3)*
Intensidad Media de Fluorescencia (\bar{x})	61	72	354

Tabla 6. Porcentaje de células Reh positivas a CD3 e Intensidad Media de Fluorescencia.

Células Reh cultivadas por 30 minutos en presencia de LIPI o PI. *Diferencia del % de células Reh positivas a CD3 con respecto al basal.



8. Discusión de Resultados

Se sabe que los receptores HLA-I tienen como función principal presentar péptidos para activar a las células T CD8⁺. (Janeway *et al.*, 2001; López-Martínez *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2011). En condiciones fisiológicas las moléculas HLA-I son expresadas en todos los tejidos y células nucleadas adultas, con la excepción de órganos inmunes privilegiados. Esta expresión puede ser regulada por diferentes citocinas como los interferones (IFN's) e IL-10. Además se ha descrito que PI juega un importante rol en el transporte vesicular (De Camilli *et al.*, 1996; Siddhanta *et al.*, 1998; Huijbregts *et al.*, 2000). Por lo que pensamos que son muy importantes nuestros resultados donde se demuestra que los LSP's cultivados con liposomas formulados con PI (LIPI), regulan de manera positiva la expresión de receptores HLA-I. En un efecto comparable con el inducido por los IFN's, potentes estimuladores de la expresión de estas moléculas. (Evans *et al.*, 2006).

El saber que LIPI puede aumentar la expresión de moléculas HLA-I genera una gran expectativa por su posible uso en las enfermedades en las que hay una baja expresión de estas moléculas. Por ejemplo se sabe que los receptores HLA-I juegan un papel fundamental en la progresión del cáncer ya que se reporta una baja expresión o completa pérdida de estas moléculas en una gran variedad de tumores sólidos y hematopoyéticos humanos (Bukur *et al.*, 2012). Esta deficiencia en la expresión de HLA-I es de importancia clínica, ya que está asociada al grado, estado y progresión del tumor así como a la supervivencia del paciente, donde a menor expresión de HLA-I se le asocia una menor supervivencia (Carretero *et al.*, 2008; Kasajima *et al.*, 2010; Reinis, 2010; Garrido *et al.*, 2011; Lampen *et al.*, 2011).

Por lo tanto, el encontrar que existe una inducción en la expresión del receptor HLA-I, al usar LIPI es de gran relevancia ya que podemos regular la sobre expresión de estos receptores en células tumorales para que sean reconocidas de manera más eficiente por el sistema inmunológico y de esta manera eliminarlas, con lo que podemos aumentar la supervivencia de pacientes que padecen cáncer.

En este sentido se puede destacar el resultado obtenido en las células de la línea Reh, las cuales después de haber sido cultivadas en presencia de los LIPI, incrementaron



notablemente la expresión de receptores HLA-I, lo que indica que no existen defectos irreversibles en estas células. El haber logrado la inducción de la expresión de receptores de HLA-I en esta célula, nos hace pensar que las células Reh, no tienen dañado el proceso de síntesis de proteínas sino el mecanismo de transporte hacia la membrana, es decir cuando estas células se transforman existe un elemento que impide que las moléculas HLA-I sean movilizadas adecuadamente a la superficie celular. Efecto que demostramos que puede ser revertido al utilizar la composición liposomal LIPI.

También, debemos mencionar que ya se ha reportado que la terapia génica, con la introducción de vectores virales que codifican y restauran el transportador TAP o la lámina $\beta 2$ (del Campo *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009 ; o que la modulación epigenética con la modulación de las histonas a través de algunas sustancias que modifican su conformación como el ácido valproico, Tricostatina A, ambos son HDACi (inhibidores de la histona deacetilasa por sus siglas en inglés), y regulan positivamente la expresión de HLA-I (Khan *et al.*, 2008); y que el uso de los interferones tipo I (IFN α y IFN β) y tipo II (IFN γ) tienen un estímulo potencial en la presentación de antígeno mediada por HLA-I por la vía de activación transcripcional (Lampen *et al.*, 2011) y pueden, en el caso del cáncer, los IFN α (Seliger *et al.*, 2008) e IFN γ (aunque este último tiene sus limitantes debido a sus efectos adversos) (Briesemeister *et al.*, 2011) favorecer la expresión de HLA-I en células cancerígenas. Sin embargo, los cánceres pueden producir resistencia a los interferones (Xi *et al.*, 2006; Komyod *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2007). Es por ello que el contar con un liposoma especialmente formulado con un efecto parecido al del interferón es importante porque podemos usar una molécula con composición semejante a la de las membranas biológicas de tal manera que se pueden reducir los efectos adversos que presentan los interferones. Después de lo antes expuesto podemos decir que el LIPI puede ser una posible terapia para inducir la expresión del receptor HLA-I en células donde existe una baja expresión del mismo.

Por otra parte, el FcRn es un receptor que juega un papel importante en la transferencia de IgG materna hacia el feto a través de la placenta (Roopenian *et al.*, 2007), evita el catabolismo de la IgG circundante y media la transición de IgGs a través de las células



epiteliales polarizadas en las superficies mucosas, además de ser importante en la regulación del sistema inmune (Baker *et al.*, 2014). Actualmente, se tiene documentado que el FcRn se expresa en células de intestino, sinsitiotrofblastos, hepatocitos, células endoteliales, células B, macrófagos, y células dendríticas (Zhu *et al.*, 2001; Chaudhury *et al.*, 2003; Roopenian *et al.*, 2003; Mi *et al.*, 2008). Existe una alta expresión en células B, la cual se puede comparar con la expresión, de este receptor, en LSP's cuando son cultivados en presencia de LIPI (**Tabla 2**). Estos datos son de interés científico ya que, actualmente, no existe una técnica para aumentar la expresión de receptores FcRn en células B, de tal forma que contaríamos con un novedoso método para regular el tránsito de anticuerpos a través del citoplasma para modular la respuesta inmune, así como regular la expresión de FcRn en células dendríticas o macrófagos, que también pertenecen al linaje hematopoyético y son presentadores de antígeno.

En las células dendríticas el receptor FcRn media la presentación de antígeno a través de moléculas del MHC-I y MHC-II (Roopenian *et al.*, 2003, Qiao *et al.* 2008; Montoyo *et al.*, 2009) y la sobreexpresión del mismo puede combatir múltiples enfermedades parasitarias (Yoshida *et al.*, 2006; Gosselin *et al.*, 2009; Iglesias *et al.*, 2013; Bai *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2011), o el cáncer colorectal (Baker *et al.*, 2013). Al respecto se sabe que el incremento en la expresión de FcRn favorece la respuesta inmune humoral y aumenta la actividad de las células presentadoras de antígeno (Cervenak *et al.*, 2011; Végh *et al.*, 2012). Además el receptor FcRn se ha observado en cáncer colorectal, cáncer de mama (Palma *et al.*, 2011) y en cáncer cérvico uterino (CaCu). Si bien es posible que los tejidos de origen de dichos tumores ya tengan la expresión de este marcador, como en el caso del CaCu (Aguilar, 2016), su presencia en las etapas preliminares puede afectar el tráfico subcelular de IgG, el metabolismo y la disposición general del tumor (Palma *et al.*, 2011) lo que favorecía la evasión del sistema inmune y la progresión del tumor. Por esto la relevancia de este receptor en las células Reh, pues a pesar de ser células de origen linfóide, por sus propias características (no B, no T) no se esperaría la expresión del receptor FcRn, lo cual indica que este receptor está jugando un papel vital en el proceso y avance de este tipo de leucemias.



En el caso del receptor CD3, este se encarga de la señalización intracelular para la activación de las células T e iniciar la respuesta específica antígeno-célula T que responde a patógenos y vacunas, así como trasplantes, tumores y autoantígenos. Las células T no pueden reconocer antígenos si el complejo TCR/CD3 no está correctamente ensamblado, lo cual le permite ser transportado y expresado eficientemente en la superficie celular (Lefranc *et al.*, 2001; Kuhns *et al.*, 2006). Por lo tanto, el detectar que los LSP's en presencia de LIPI aumentan significativamente la expresión de CD3 nos hace pensar que contamos con una vía externa para inducir la formación del complejo TCR/CD3 para un mejor reconocimiento del antígeno. Alarcon y cols. (1988) han reportado que cuando se unen CD3 y TCR se forma un complejo estable que evita su degradación permitiendo que las células T reconozcan antígenos específicos. Dado que nuestros resultados muestran un aumento de CD3, al usar el LIPI, pensamos que el liposoma usado favorece el transporte de este receptor hacia la membrana celular, colaborando en la formación del complejo TCR/CD3 que evita su degradación. Lo que significaría que los LSP's puedan reconocer de mejor manera antígenos para optimizar la respuesta inmunológica. Es decir que el liposoma formulado con PI puede proponerse como vehículo farmacéutico para aumentar la expresión del receptor CD3 que puede servir como una alternativa de diagnóstico o terapia en enfermedades hematológicas.

En este sentido en el presente trabajo evaluamos el efecto de LIPI sobre la expresión de CD3 en la línea leucémica Reh no T, no B. Con una baja expresión del receptor CD3 (Rosenfeld *et al.*, 1977), que se atribuye a una deficiencia en el transporte de este receptor hacia la membrana como se ha reportado para la Leucemia Linfocítica Aguda (ALL) que nos hace pensar que la baja expresión de CD3 es un mecanismo molecular que permite el avance y progreso de las células leucémicas. (Link *et al.*, 1985; Campana *et al.*, 1987). Existen reportes que indican que CD3 se expresa a nivel citoplasmático pero no a nivel de membrana en las células de ALL tipo T (Link *et al.*, 1985). Por lo tanto, el que nosotros hayamos demostrado que el LIPI puede aumentar la expresión de CD3 en la membrana de las células de la línea Reh, significa que podemos favorecer el transporte de este receptor hacia la membrana. Además es sustancial señalar que el anticuerpo



anti-CD3 utilizado fue específico para la subunidad ϵ lo que nos indica que se expresan las diferentes variantes del receptor CD3, pues en la membrana celular el receptor CD3 con su dimeros $\gamma\epsilon$ y $\delta\epsilon$ interaccionan con los heterodimeros $\alpha\beta$ del TCR, mientras que los dimeros $\gamma\epsilon$ de CD3 interaccionan solamente con heterodimeros $\gamma\delta$ del TCR (Brenner *et al.*, 1985; Samelson *et al.*, 1985; Sussman *et al.*, 1988; Alarcon *et al.*, 1988; Wegener *et al.*, 1995). Como puede observarse la subunidad ϵ es común en todas las variantes, por lo cual sería prudente corroborar si existe expresión del TCR en estas células leucémicas.

Actualmente no existen reportes de la función que LIPI y PI tienen sobre la expresión de los receptores HLA-I, FcRn y CD3, por lo que nuestros resultados pueden tener implicaciones notables en tratamientos pre-existentes o creando nuevas terapias contra diferentes enfermedades como el cáncer.



9. Conclusiones

- Se observó el efecto del PI y del LIPI sobre la línea celular Reh y Linfocitos de Sangre Periférica (LPS´s) a través del análisis con anticuerpos y su visualización por citometría de flujo.
- La línea celular Reh expresa de manera basal HLA-I, FcRn y CD3.
- Se encontró que en todos los casos los cultivos en presencia de LIPI aumentan la expresión de los receptores evaluados.
- Se encontró PI aumenta únicamente a los receptores FcRn y HLA-I en la línea celular Reh.
- Los resultados sugieren que LIPI es mejor que PI para aumentar la expresión de los receptores evaluados.

10. Perspectivas

- Evaluar la presencia del TCR en la línea celular Reh, para corroborar la formación del complejo TCR/CD3.
- Evaluar el efecto del LIPI sobre la expresión de FcRn en cultivos de células dendríticas.
- Evaluar el efecto de LIPI sobre la expresión de HLA-I en diferentes líneas celulares de LLA o cualquier otro cáncer.
- Dilucidar el papel que juegan los receptores FcRn y CD3 en las funciones de la línea celular Reh.



10. Bibliografía

- Aguilar LAL. 2016. Identificación de receptores de membrana en las líneas celulares de cáncer de cérvix CALO e INBL mediante citometría de flujo. Tesis (Biólogo). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
- Alarcon B, Berkhout B, Breitmeyer J, Terhorst C. 1988. Assembly of the human T cell receptor-CD3 complex takes place in the endoplasmic reticulum and involves intermediary complexes between the CD3-(γ , δ , ϵ) core and single T cell receptor α or β chains. *J Biol Chem.* 263 (6): 2953-2961.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2008. *Biología molecular de la célula*. 5ta edición. Omega. España.
- Arnaiz-Villena A, Regueiro JR, López LC. 1995. *Inmunología*. Editorial Complutense. Madrid.
- Aziz SA, Sharma SK, Sabah I, Jan MA. 2015. Prognostic significance of cell phenotype in acute lymphoblastic leukemia. *South Asian J Cancer.* 4 (2): 91-94.
- Bai Y, Ye L, Tesar DB, Song H, Zhao D, Bjorkman PJ. 2011. Intracellular neutralization of viral infection in polarized epithelial cells mediated by neonatal Fc receptor (FcRn)-mediated IgG transport. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108 (45): 18406-18411.
- Baker K, Rath T, Flak MB, Janelle AC, Chen Z, Glickman JN, Zlobec I, Karamitopoulou E, Stachler MD, Odze RD, Lencer WI, Jobin C, Blumberg RS. 2013. Neonatal Fc Receptor expression in dendritic cells mediates protective immunity against colorectal cancer. *Immunity.* 39 (6): 1095-1107.
- Baker K, Rath T, Pyzik M, Blumberg RS. 2014. The role of FcRn in antigen presentation. *Frontiers in immunology.* 5 (408): 1-12
- Becker WM, Kleainsmith LJ, Hardin J. 2007. *El mundo de la célula*. 6ta edición. Pearson educación. España
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. 2008. *Bioquímica*. 6ta edición. Editorial Reverté. España.



- Blumberg RS, Koss T, Story CM, Barisani D, Polischuk J, Lipin A. 1995. A major histocompatibility complex class I-related Fc receptor for IgG on rat hepatocytes. *J Clin Invest.* 95 (5): 2397-2402.
- Boross P, van de Poel K, Van de Winkel JGJ, Leusen JHW. 2008. Fc Receptors. In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons. Inglaterra.
- Brambell FW, Halliday R, Morris IG. 1958. Interference by human and bovine serum and serum protein fractions with the absorption of antibodies by suckling rats and mice. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 149 (934): 1-11
- Brambell FW. 1966. The transmission of immunity from mother to young and the catabolism of immunoglobulins. *Lancet.* 2(7473): 1087-1093.
- Brenner, M.B., Trowbridge, I.S., and Strominger, J.L. (1985). Crosslinking of human T cell receptor proteins: association between the T cell idiotype beta subunit and the T3 glycoprotein heavy subunit. *Cell* 40 (1): 183–190.
- Briesemeister D, Sommermeyer D, Loddenkemper C, Loew R, Uckert W, Blankenstein T, Kammertoens T. 2011. Tumor rejection by local interferon gamma induction in established tumors is associated with blood vessel destruction and necrosis. *Int J Cancer.* 128 (2): 371-378.
- Bukur J, Jasinski S, Seliger B. 2012. The role of classical and non-classical HLA class I antigens in human tumors. *Seminars in Cancer Biology.* 22 (4): 350-358.
- Burgess TL, Kelly RB. 1987. Constitutive and regulated secretion of proteins. *Ann Rev Cell Biol.* 3 (1):243-293.
- Campana D, Thompson JS, Amlot P, Brown S, Janosy G. 1987. The cytoplasmic expression of CD3 antigens in normal and malignant cells of the T lymphoid lineage. *J Immunol.* 138 (2): 648-655.
- Carretero R, Romero JM, Ruiz-Cabello F, Maleno I, Rodriguez F, Camacho FM. 2008. Analysis of HLA class I expression in progressing and regressing metastatic melanoma lesions after immunotherapy. *Immunogenetics.* 60 (8): 439-447.



- Cervenak J, Bender B, Schneider Z, Magna M, Carstea BV, Liliom K, Erdei A, Bosze Z, Kacs Kovics I. 2011. Neonatal FcR overexpression boosts humoral immune response in transgenic mice. *J Immunol.* 186 (2): 959-968.
- Chaudhury C, Mehnaz S, Robinson JM, Hayton WL, Pearl DK, Roopenian DC. 2003. The major histocompatibility complex-related Fc receptor for IgG (FcRn) binds albumin and prolongs its lifespan. *J Exp Med.* 197(3): 315-322.
- Clavijo GD, García MG, Mejía MO, Ruiz A, Gracia CA, Casadiego TC, Vittorino MM. 2007. La frontera entre la Biología molecular y la Nanotecnología: impacto en la Medicina. *Iatreia.* 20 (3): 297-307
- Clevers H, Alarcon B, Wileman T, Terhorst C. 1988. The T cell receptor/CD3 complex: A dynamic protein ensemble. *Ann Rev Immunol.* 6 (1): 629-662.
- Cooney AK, Hayes GT, Pritchett MM, Todd FR, Worden FP. 2015. Tumor Board Review: Guideline and Case Reviews in Oncology. Segunda Edición. Demos Medical Publishing. USA.
- De Camilli P, Emer SD, McPherson PS, Novick P. 1996. Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. *Science.* 271 (5255): 1533-1539.
- del Campo AB, Aptsiauri N, Mendez R, Zinchenko S, Vales A, Paschen A, Ward S, Ruiz-Cabello F, Gonzalez-Asequinolaza G, Garrido F. 2009. Efficient recovery of HLA class I expression in human tumor cells after beta2-microglobulin gene transfer using adenoviral vector: implications for cancer immunotherapy. *Scand J Immunol.* 70 (2): 125-135.
- DiSanto JP, Klein JS, Flomenberg N. 1989. Phosphorylation and down-regulation of CD4 and CD8 in human CTLs and mouse L cells. *Immunogenetics.* 30 (6): 494-501.
- Evans C, Dalglish AG, Kumar D. 2006. Review article: Immune suppression and colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther.* 24 (8): 1163-1177
- Eyster KM. 2007. The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. *Adv Physiol Educ.* 31 (1): 5-16



- Fitzmaurice C. 2017. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncol.* 3 (4): 524-548.
- Fong L, Small EJ. 2008. Anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 antibody: the first in an emerging class of immunomodulatory antibodies for cancer treatment. *J Clin Oncol.* 26 (32): 5275-5283.
- Foon KA, Schroff RW, Gale RP. 1982. Surface markers on leukemia and lymphoma cells: recent advances. *Blood.* 60 (1): 1-19
- Galaktionov VG. 2003. Evolutionary development of the immunoglobulins super family. *Izvestiia Akademii nauk. Serii biologicheskaja/Rossiiskaia akademiia nauk.* 1 (2): 133-145.
- García CA. 2017. Evaluación de la exposición del receptor opioide δ (DOR) en la membrana plasmática de linfocitos estimulados con liposomas que contienen PIP₂. Tesis (Químico Farmacéutico Biólogo). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
- Garcia KC, Scott CA, Brunmark A, Carbone FR, Peterson PA, Wilson IA, Teyton L. 1996. CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecules complexes. *Nature.* 384 (6609): 577-581.
- Garrido C, Romero I, Berruguilla E, Cancela B, Algarra I, Collado A. 2011. Immunotherapy eradicates metastases with reversible defects in MHC class I expression. *Cancer Immunol Immunother.* 60 (9): 1257-1268.
- Garrido F, Cabrera T, Aptsiauri N. 2010. "Hard" and "soft" lesions underlying the HLA class I alterations in cancer cells: implications for immunotherapy. *Int J Cancer.* 127 (2):249-256.
- Georgopoulos NT, Proffitt JL, Blair GE. 2000. Transcriptional regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain. TAP1 and LMP2 genes by the human papillomavirus (HPV) type 6b, 16 and 18 E7 oncoproteins. *Oncogene.* 19 (42): 4930-4935.



- Gosselin EJ, Bitsaktsis C, Li Y, Iglesias BV. 2009. Fc receptor-targeted mucosal vaccination as a novel strategy for the generation of enhanced immunity against mucosal and non-mucosal pathogens. *Arch Immunol Ther Exp.* 57 (5): 311-323.
- Haczku AF, Kay AB, Corrigan CJ. 1996. Inhibition of re-expression of Surface CD4, but not CD8, on activated human T-lymphocytes by the immunosuppressive drugs dexamethasone and cyclosporine A: correlation with inhibition of proliferation. *Int. J. Immunopharmac.* 18 (1): 45-52.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144 (5): 646-674.
- Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. 2005. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nature reviews Drug discovery,* 4(12), 988-1004.
- Hiles ID, Otsu M, Volinia S, Fry MJ, Gout I, Dhand R. 1992. Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell.* 70 (3): 419-429.
- Hosseinkhani H, Abedini F, Ou KL, Domb JA. 2014. Polymers in gene therapy technology. *Polym. Adv. Technol.* 26(2), 198-211.
- Hu D, Tang S, Peng H, Wang Q. 2015. The bright future of liposome mediated drug delivery. *Biochem. Physiol.* 4 (1): e133 pag 1-2
- Huang L, Cheng T, Xu P, Duan J, Fang, Xia Q. 2009. Immunoglobulin superfamily is conserved but evolved rapidly and is active in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology.* 18 (4): 517-530
- Huijbregts R, Topalof L, Bankaitis VA. 2000. Lipid Metabolism and regulation of membrane trafficking. *Traffic.* 1 (3): 195-202.
- Iglesias BV, Bitsaktsis C, Pham G, Drake JR, Hazlett KR, Porter K. 2013. Multiple mechanisms mediate enhanced immunity generated by mAb-inactivated *F. tularensis* immunogen. *Immunol Cell Biol.* 91 (2): 139-148.



- Israel EJ, Taylor S, Wu Z, Mizoguchi E, Blumberg RS, Bhan A. 1997. Expression of the neonatal Fc receptor, FcRn, on human intestinal epithelial cells. *Immunology*. 92(1): 69–74.
- James DJ, Khodthong C, Kowalchuk JA, Martin TFJ. 2008. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates SNARE-dependent membrane fusion. *J Cell Biol*. 182 (2): 355-366.
- Janeway CA Jr, Travers P, Walport M. 2001. *Immunobiology: The immune System in Health and Disease*. 5ta edición. Garland Science. Estados Unidos.
- Janeway CA. 1992. The cell receptor as a multicomponent signaling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol*. 10 (1): 645-674.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. 2011. Global cancer statistics. *Cancer Journal for clinicians*. 61 (2): 69-90.
- Jiménez-Morales S, Hidalgo-Miranda A, Ramírez-Bello J. 2017. Leucemia linfoblástica aguda infantil: una aproximación genómica. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. 74 (1): 13-26.
- Kabelitz D, Marx S, Robertson MJ, Janssen O. 1996. Rapid Modulation of T lymphocyte Surface Antigens Induced by Fas (CD95, APO-1) Ligation. *Cellular Immunology*. 173 (1): 108-115.
- Kapur S, Barbosa-Portela M. 2012. *Immunsuppression: Role in Health and diseases*. InTech. India
- Kasajima A, Sers C, Sasano H, Johrens K, Stenzinger A, Noske A, Buckendahl AC, Darb-Esfahani S, Müller BM, Budczies J, Lehman A, Dietel M, Denkert C, Weichert W. 2010. Down-regulation of the antigen processing machinery is linked to a loss of inflammatory response in colorectal cancer. *Hum Pathol*. 41 (12): 1758-1769.
- Kelly RB. 1985. Pathways of protein secretion in eukaryotes. *Science*. 230 (4721): 25-32.



- Khan AN, Gregorie CJ, Tomasi TB. 2008. Histone deacetylase inhibitors induce TAP, LMP, Tapasin genes and MHC class I antigen presentation by melanoma cells. *Cancer Immunol Immunother.* 57 (5): 647-654.
- Kierszenbaum LA. 2008. *Histología y Biología Celular.* Elsevier. España.
- Komyod W, Bohm M, Metze D, Heinrich PC, Behrmann I. 2007. Constitutive suppressor of cytokine signaling 3 expression confers a growth advantage to a human melanoma cell line. *Mol Cancer Res.* 5 (3): 271-281.
- Koopman LA, Corver WE, van der Slik AR, Giphart MJ, Fleuren GJ. 2000. Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer. *J Exp Med.* 191 (6): 961-976.
- Korsmeyer SJ, Hieter PA, Ravetch JV, Poplack DG, Waldmann TA, Leder P. 1981. Developmental hierarchy of immunoglobulin gene rearrangements in human leukemia pre-B-cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78 (11): 7096-7100.
- Kuhns MS, Davis MM, Garcia KC. 2006. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. *Immunity.* 24 (2). 133-139.
- Lampen MH, van Hall T. 2011. Strategies to counteract MHC-I defects in tumors. *Curr Opin Immunol.* 23 (2): 293-298.
- Lefranc M, Lefranc G. 2001. *The T cell Receptor FactsBook.* Academic Press. Gran Bretaña.
- Li XL, Zhang D, Knight D, Odaka Y, Glass J, Mathis JM, Zhang QJ. 2009. Priming of immune responses against transporter associated with antigen processing (TAP)-deficient tumours: tumour direct priming. *Immunology.* 128 (3): 420-428.
- Li Z, Palaniyandi S, Zeng R, Tuo W, Roopenian DC, Zhu X. 2011. Transfer of IgG in the female genital tract by MHC class I-related neonatal Fc receptor (FcRn) confers protective immunity to vaginal infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108 (11): 4388-4393
- Link MP, Stewart SJ, Warnke RA, Levy R. 1985. Discordance between surface and cytoplasmic expression of the Leu-4 (T3) antigen in thymocytes and in blast cells from childhood T lymphoblastic malignancies. *J. Clin Invest.* 76 (1): 248-253.



- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J. 2011. *Biología celular y molecular*. 5ta edición. Editorial medica panamericana. China.
- López-Martínez A, Chávez-Muñoz C, Granados J. 2005. Función Biológica del Complejo Principal de Histocompatibilidad. *Revista de Investigación Clínica*. 57 (2): 132-141
- Lu L, Palaniyandi S, Zeng R, Bai Y, Liu X, Wang Y. 2011. An FcRn-targeted mucosal vaccine strategy effectively induces HIV-1 antigen-specific immunity to genital infection. *J Virol*. 85 (20): 10542-10553.
- Managò S, Valente C, Mirabelli P, Circolo D, Basile F, Corda D, De Luca AC. 2016. A reliable Raman-spectroscopy-based approach for diagnosis, classification and follow-up of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Scientific Reports* 6 (24821): 1-13
- Martin TFJ. 2012. Role of PI (4, 5) P₂ in vesicle exocytosis and membrane fusion. *Subcell Biochem*. 59 (1): 111-130.
- Martin TFJ. 2015. PI (4, 5)P₂-binding effector proteins for vesicle exocytosis. *Biochim Biophys Acta*. 1851 (6): 785-793.
- Matsuo Y, Drexler HG. 1998. Establishment and characterization of human B cell precursor-leukemia cell lines. *Leukemia Research*. 22 (7): 567-579.
- McLaughlin S, Murray D. 2005. Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature*. 438 (7068): 605-611.
- Mejía-Aranguré JM, Bonilla M, Lorenzana R, Juárez-Ocaña S, de Reyes G, Pérez-Saldivar ML, González-Miranda G, Bernáldez-Ríos R, Ortiz-Fernández A, Ortega-Alvarez M, Martínez-García M del C, Fajardo-Gutiérrez A. 2005. Incidence of leukemias in children from El Salvador and Mexico City between 1996 and 2000: population-based data. *BMC Cancer*. 5 (1): 1-19.
- Mi W, Wanjie S, Lo ST, Gan Z, Pickl-Herk B, Ober RJ. 2008. Targeting the neonatal fc receptor for antigen delivery using engineered fc fragments. *J Immunol*. 181 (11): 7550-7561.



- Mimura K, Ando T, Poschke I, Mougiakakos D, Johansson CC, Ichikawa J, Okita R, Nishimura MI, Handke D, Krug N. 2011. T cell recognition of HLA-A2 restricted tumor antigens is impaired by the oncogene HER2. *Int J Cancer*. 128 (2): 390-401.
- Mohammad, R. M., Clark, C. R., Maloney, T. M., Chen, B. D. M., & Al-katib, A. (1991). Expression of a new cellular protein by monocytoid B-lymphocytes differentiated from the acute lymphoblastic leukemia cell line (Reh). *Leukemia & Lymphoma*, 4(4), 277-284.
- Montoyo HP, Vaccaro C, Hafner M, Ober RJ, Mueller W, Ward ES. 2009. Conditional deletion of the MHC class-I related receptor FcRn reveals the sites of IgG homeostasis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106 (8). 2788-2793.
- Mulé JJ, Shu S, Rosenberg SA. 1985. The anti-tumor efficacy of lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin 2 *in vivo*. *J Immunol*. 135 (1): 646-652.
- Page PC, Curtis MJ, Sutter CM, Walker JM, Hoffman BB. 1998. *Farmacología Integrada*. Ediciones Harcourt. España.
- Palma E, Randlev B, Wen P, Ulufatu S, Howell K, Boswell CA, Khawli L, Koeppen H, Meng M, Scales S, Tibbitts J. 2011. Evaluation of neonatal Fc receptor (FcRn) expression and function in tumor cell lines and their potential effect on IgG disposition in solid tumors (Abstract). In: *Proceedings of the AACR-NCI-EORTC International Conference: Molecular Targets and Cancer Therapeutics*; 2011 Nov 12-16; San Francisco, CA. Philadelphia (PA): AACR; *Mol Cancer Ther*; 10(11 Suppl):Abstract number A138.
- Pamer E, Cresswell P. 1998. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol*. 16 (1): 323-358
- Parham P. 2005. *Inmunología*. 2° edición. Editorial Medica Panamericana. Argentina.
- Pérez-Burgos A, Alamilla J. 2010. El fosfatidilinositol-4,5-bifosfato y sus acciones sobre los canales iónicos. *Rev Biomed*. 21 (2): 97-107.



- Pierce BA. 2010. *Genética: un enfoque conceptual*. 3ra edición. Editorial medica panamericana. España.
- Pinzón CE, Serrano ML, Sanabria MC. 2009. Papel de la vía fosfatidil inositol 3 kinasa (PI3K/ Akt) en humanos. *Rev. Cienc. Salud*. 7 (2): 47-66.
- Qiao SW, Kobayashi K, Johansen FE, Sollid LM, Andersen JT, Milford E. 2008. Dependence of antibody-mediated presentation of antigen on FcRn. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105 (27): 9337-9342.
- Rangel-Corona R, Soto-Vázquez R, Weiss-Steider B, Gil-Alegre E, Corona-Ortega MT. 2014. Propuesta biotecnológica para el tratamiento del cáncer de cérvix uterino, empleando liposomas. *An Real Acad Farm*. 80 (1): 179-191
- Rangel-Corona R. 2003. Inmunoterapia del cáncer. *Vertientes: Revista especializada en ciencias de la salud*. 6 (1): 58-62
- Reinis M. 2010. Immunotherapy of MHC class I-deficient tumors. *Future Oncol*. 6 (10):1577-1589.
- Rivera-Luna R, Correa-González C, Altamirano-Alvarez E, Sánchez-Zubieta F, Cárdenas-Cardós R, Escamilla-Asian G, Olaya-Vargas A, Bautista-Marquez A, Aguilar-Romo M. 2012. Incidence of childhood cáncer among Mexican children registered under a public medical insurance program. *International Journal of Cancer*. 132(7): 1646-1650.
- Rodewald R, Kraehenbuhl JP. 1984. Receptor-mediated transport of IgG. *J Cell Biol*. 99 (1): 159-164.
- Rodewald R. 1976. pH-dependent binding of immunoglobulins to intestinal cells of the neonatal rat. *J Cell Biol*. 71 (2): 666-669.
- Rodriguez T, Mendez R, del CA, Jimenez P, Aptsiauri N, Garrido F, Ruiz-Cabello F. 2007. Distinct mechanisms of loss of IFN-gamma mediated HLA class I inducibility in two melanoma cell lines. *BMC Cancer*. 7 (1): 1-11.
- Roopenian DC, Akilesh S. 2007. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol*. 7 (9): 715–725.



- Roopenian DC, Christianson GJ, Sproule TJ, Brown AC, Akilesh S, Jung N. 2003. The MHC class I-like IgG receptor controls perinatal IgG transport, IgG homeostasis, and fate of IgG-Fc-coupled drugs. *J Immunol.* 170 (7): 3528-3533.
- Rosenfeld, C., Goutner, A., Choquet, C., Venuat, A. M., Kayibanda, B., Pico, J. L., & Greaves, M. F. 1977. Phenotypic characterisation of a unique non-T, non-B acute lymphoblastic leukaemia cell line. *Nature*, 267(5614), 841-843
- Roth MG, Sternweis PC. 1997. The role of lipid signaling in constitutive membrane traffic. *Current opinion in cell biology.* 9 (4): 519-526.
- Sackstein R. 1993. Effects of Methylprednisolone Administration on lymphocyte LECAM-1, CD44, and LFA-1 expression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 696 (1): 417-419
- Samelson, L.E., Harford, J.B., and Klausner, R.D. (1985). Identification of the components of the murine T cell antigen receptor complex. *Cell* 43 (1): 223–231.
- Santoyo-Sánchez A, Ramos-Peñafiel CO, Saavedra-González A, González-Almanza L, Martínez-Tovar A, Olarte-Carrillo I, Collazo-Jaloma J. 2017. Frecuencias de edad y género de pacientes con leucemia en dos centros de referenciadel Valle de México. *Gaceta Médica de México.* 153 (1): 44-48.
- Schink KO, Tan KW, Stenmark H. 2016. Phosphoinositides in Control of Membrane Dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 32 (1): 143-171
- Schu PV, Takegawa K, Fry MJ, Stack JH, Waterfield MD, Emr SD. 1993. Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science.* 260 (5104): 88-91.
- Seliger B, Ruiz-Cabello F, Garrido F. 2008. IFN inducibility of major histocompatibility antigens in tumors. *Adv Cancer Res.* 101 (1): 249-276.
- Siddhanta A, Shields D. 1998. Secretory vesicle budding from the trans-Golgi Network is mediated by phosphatidic acid levels. *Journal of Biological Chemistry.* 273 (29): 17995-17998.
- Siegel R, Jiemin M, Zou Z, Jemal A. 2014. Cancer Statistics. *CA CancerJ Clin* 64 (1): 9–29.



- Simister NE, Rees AR. 1985. Isolation and characterization of an Fc receptor from neonatal rat small intestine. *Eur J Immunol.* 15 (7): 733-738.
- Smith C, Santi M, Rushing EJ, Cornelison R, MacDonald TJ, Vukmanovic S. 2011. Characterization of signaling function and expression of HLA class I molecules in Medulloblastoma. *J Neurooncol.* 103: (2): 197-206
- Stevens G, Dias RH, Thomas KJ, Rivera JA, Carvalho N, Barquera S, Hill K, Ezzati. 2008. Characterizing the Epidemiological transition in Mexico: national and subnational burden of diseases, injuries, and risk factors. *PLOS Med.* 5 (6): e125.
- Subiza JL, Gil J, Medina MT. 1994. Inmunoterapia del cáncer: nuevas estrategias experimentales. *Inmunología.* 13 (1): 5-21
- Suh BC, Hille B. 2005. Regulation of ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Current Opinion in Neurobiology.* 15 (3): 370-378.
- Sun, L., Wang, Q., Liu, X., Brons, N. H., Wang, N., Steinmetz, A., Zheng, H. (2011). Anti-cancer effects of 20 (S)-protopanaxadiol on human acute lymphoblastic leukemia cell lines Reh and RS4; 11. *Medical Oncology*, 28(3), 813-821.
- Sussman, J.J., Bonifacino, J.S., Lippincott-Schwartz, J., Weissman, A.M., Saito, T., Klausner, R.D., and Ashwell, J.D. (1988). Failure to synthesize the T cell CD3-zeta chain: structure and function of a partial T cell receptor complex. *Cell* 52 (1): 85–95.
- Takenawa T, Itoh T. 2001. Phosphoinositides, key molecules for regulation of actin cytoskeletal organization and membrane traffic from the plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1533 (3): 190-206
- Tsuganezawa K, Kiyokawa N, Matsuo Y, Kitamura F, Tomaya-Sorimachi N, Kuida K, Fujimoto J, Karasuyama H. 1998. Flow cytometric diagnosis of the cell lineage and developmental stage of acute lymphoblastic leukemia by novel monoclonal antibodies specific to human pre-B-cell receptor. *Blood*, 92(11): 4317-4324.
- Urias CSF. 2016. Efecto de liposomas formulados, en la vía de señalización PI3K/AKT y la expresión de receptores FcγRIII (CD16) en células tumorales. Tesis (Biólogo). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza



- Végh A, Farkas A, Kövesdi D, Papp K, Cervenak J, Schneider Z, Bender B, Hiripi L, László G, Prechl J, Matkó J, Kacs Kovics I. 2012. FcRn overexpression in transgenic mice results in augmented APC activity and robust immune response with increased diversity of induced antibodies. *PLoS One*. 7 (4): 1-11
- Vicinanza M, D'Angelo G, Di Campli A, De Matteis MA. 2008. Function and dysfunction of the PI system in membrane trafficking. *The EMBO journal*. 27 (19): 2457-2470.
- Vidarsson G, Stermerding AM, Stapleton NM, Spliethoff SE, Janssen H, Rebers FE, de Haas M, van de Winkel JG. 2006. FcRn: an IgG receptor on phagocytes with a novel role in phagocytosis. *Blood*. 108 (10): 3573-3579.
- Vukmanovic S, Lilic M, Santori FR, Demaria S, Kulig K. 2001. Peptide loading of nascent MHC class I molecules. *Arch Immunol Therap Exp*. 49 (3): 195-201.
- Wegener, A.M., Hou, X., Dietrich, J., and Geisler, C. (1995). Distinct domains of the CD3-gamma chain are involved in surface expression and function of the T cell antigen receptor. *J. Biol. Chem*. 270 (9): 4675–4680.
- Xi S, Dyer KF, Kimak M, Zhang Q, Gooding WE, Chaillet JR, Chai RL, Ferrell RE, Zamboni B, Hunt J, Grandis JR. 2006. Decreased STAT1 expression by promoter methylation in squamous cell carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 98 (3): 181-189.
- Yoshida M, Kobayashi K, Kuo TT, Bry L, Glickman JN, Claypool SM. 2006. Neonatal Fc receptor for IgG regulates mucosal immune responses to luminal bacteria. *J Clin Invest*. 116 (8): 2142:2151.
- Zhang CH, Grünig G, Davis W, Antczak DF. 1994. Down-regulation followed by re-expression of equine CD4 molecules in response to phorbol myristate acetate. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 42 (1): 71-82.
- Zhu K, Wang J, Zhu J, Jiang J, Shou J, Chen X. 1999. p53 induces TAP1 and enhances the transport of MHC class I peptides. *Oncogene*. 18 (54): 7740-7747.
- Zhu X, Meng G, Dickinson BL, Li X, Mizoguchi E, Miao L. 2001. MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG is functionally expressed in monocytes, intestinal macrophages, and dendritic cells. *J Immunol*. 166(5): 3266-3276.