



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

---

---

**TESIS DE LICENCIATURA**

**El papel de los receptores Fc (FcR) en las líneas de  
Carcinoma de Cérvix CALO e INBL**

**Presenta:**

**Díaz Cupa Alondra**

**Que para obtener el grado de**

**BIÓLOGO**

**Director de Tesis**

**M. en C. Rosalva Rangel Corona**

**Laboratorio de Oncología Celular**

**Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer L-4**



**México, D.F., 2014**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

**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 la alumna **DÍAZ CUPA ALONDRA**, con número de cuenta **306278118**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **6** del mes de **mayo** de 2014 a las **14:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

**PRESIDENTE** M. en C. ROSALVA RANGEL CORONA

**VOCAL** BIÓL. CARLOS MARTÍNEZ MONTOYA

**SECRETARIO** BIÓL. MARÍA CRISTINA ALVARADO DOMÍNGUEZ

**SUPLENTE** BIÓL. REYNALDA ROLDÁN PÉREZ

**SUPLENTE** BIÓL. ITZEN AGUIÑIGA SÁNCHEZ



El título de la tesis que presenta es: **El papel de los receptores Fc(FcR) en las líneas de Carcinoma de Cérvix CALO e INBL.**

Opción de titulación: Tesis.

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

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
México, D. F., a 10 de abril del 2014

**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**

**DIRECTOR**

**DIRECCION**

RECIBÍ  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

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

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE ONCOLOGÍA CELULAR L-4 P.B., DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER (UIDCC) DE LA UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL UMIEZ EN LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM. BAJO LA DIRECCIÓN DE LA M. EN C. ROSALVA RANGEL CORONA Y ASESORADO POR EL DR. BENNY WEISS STEIDER.

ASIMISMO, EL PROYECTO Y LA ALUMNA CONTARON CON EL APOYO FINANCIERO DEL PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN TECNOLÓGICA (PAPIIT) DE LA DGAPA, CLAVES DE PROYECTOS: IN228111 E IN214113.

- SOY DE LAS QUE PIENSAN QUE LA CIENCIA TIENE UNA GRAN BELLEZA. UN CIENTÍFICO EN SU LABORATORIO NO ES SÓLO UN TÉCNICO: ES TAMBIÉN UN NIÑO COLOCADO ANTE FENÓMENOS NATURALES QUE LE IMPRESIONAN COMO UN CUENTO DE HADAS - MARIE CURIE

## AGRADECIMIENTOS

A las Doctoras **Rosalva Rangel Corona** y **Ma. Teresa Corona Ortega** por todo el apoyo y confianza que me otorgaron durante mi estancia en el laboratorio.

Al **Dr. Benny Weiss Steider** por el apoyo y orientación que me brindó durante todo el proceso del trabajo experimental.

A mis sinodales **Biól. Carlos Martínez Montoya**, **Biól. Ma. Cristina Alvarado Domínguez**, **Biól. Reynalda Roldán Pérez** y **Biól. Itzen Aguiñiga Sánchez** por sus consejos y observaciones que complementaron mi trabajo.

Al **Dr. Arturo Valle Mendiola** por el apoyo, orientación y soporte que me dio para la realización de una parte importante de la tesis.

A mis amigos y compañeros de laboratorio que estuvieron desde el principio apoyando, soportando, acompañando y compartiendo: **Itzel, Tania, Leo, Rubí Massé, Miguel, Rubí, Nalle, Liber, Armando, Erika, Pablo, Saúl, Karla, Ana y Anahí**. Gracias a todos por ratos en el laboratorio. En especial a esas dos personas que nunca me dejaron sola **Daniel** y **Luis**, se han convertido en más que dos simples amigos, gracias por todo el apoyo y por las leyes de vida que me enseñaron.

A **Don José Chavarría** por todo el trabajo técnico que hace en el laboratorio y por mantener en orden todo el material.

## DEDICATORIAS

A mis papás que han estado siempre apoyando y soportando todo lo que he hecho. Por la paciencia que siempre me han tenido, simplemente por estar allí a cada paso que doy.

A mis hermanas, **Brenda** y **Ana Luz**, que me han enseñado el camino a seguir sin perder de vista el objetivo. Además de siempre estar molestándome, presionándome y respaldándome para hacer bien las cosas.

A mis amigas de infancia y vida, **Nayely** e **Indira**, que han estado mientras crecíamos y siempre aprendemos algo nuevo de cada una. 15 años y contando.

A mis amigos y cómplices, **Edson** y **Marisol**, por todas esos buenos (y malos) ratos que hemos pasado, por su apoyo y sobretodo la confianza que me han dado.

A toda mi familia que siempre ha estado atrás de mí apoyándome directa o indirectamente durante mi vida. Especialmente a mi amis **Ale**, por las berteces moradas que siempre me has hecho.

Por último, a mi **Viri**, por enseñarme que debemos vivir cada día como si fuera el último. Siempre serás mi amis y siempre estarás conmigo.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
MARCO TEÓRICO	
I. Carcinoma	3
II. Carcinoma de Cérvix	5
III. Sistema Inmune	7
i. Inmunidad Innata	8
i.i) Activación de la Inmunidad Innata	9
ii. Inmunidad Adaptativa	11
ii.i) Activación de la Inmunidad celular	12
ii.ii) Activación de la Inmunidad humoral	14
iii. Anticuerpos	15
iii.i) Clases de Anticuerpos	17
IV. Receptores Fc	20
i. Familias de Receptores Fc	21
ii. Mecanismos de señalización de los Receptores Fc	26
ii.i) Activación	26
ii.ii) Inhibición	27
V. Inmunoterapia	29
ANTECEDENTES	30
JUSTIFICACIÓN	31
HIPÓTESIS	32
OBJETIVOS	33

METODOLOGÍA	34
RESULTADOS	39
I. Efecto de los anticuerpos monoclonales $\alpha$ -IL2 y $\alpha$ -IRL-21 sobre la proliferación de células de CaCu CALO e INBL	39
II. Efecto de los anticuerpos monoclonales $\alpha$ -Caspasa 3 y $\alpha$ -Citoqueratina sobre la proliferación de células de CaCu CALO e INBL	42
III. Evaluación de la proliferación celular con el anticuerpo $\alpha$ -IgG en las líneas celulares de CaCu CALO e INBL	45
IV. Estandarización de condiciones para fragmentar anticuerpos	47
V. Prueba de proliferación con las fracciones Fab y Fc de los anticuerpos monoclonales $\alpha$ -IgG, $\alpha$ -IL2 y $\alpha$ -RIL-21 sobre las líneas celulares de CaCu CALO e INBL	49
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	52
CONCLUSIONES	60
PERSPECTIVAS	61
BIBLIOGRAFÍA	62
APÉNDICE I	66
APÉNDICE II	67



## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Representación gráfica de la activación Sistema Inmune.
2. Estructura general de un Anticuerpo.
3. Representación de Receptores Fc de leucocitos humanos.
4. Estructura tridimensional del FcγR.
5. Representación gráfica de las diferencias relativas en afinidad entre las subclases de IgG por los receptores Fcγ.
6. Características de las líneas celulares CALO e INBL.
7. Lugares de acción de las enzimas proteolíticas en una Inmunoglobulina.
8. Proliferación de células de la línea de Carcinoma de Cérvix CALO cultivada durante 48 horas en presencia de anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -IL-2 y  $\alpha$ -RIL-21.
9. Proliferación de células de la línea de Carcinoma de Cérvix INBL cultivada durante 48 horas en presencia de anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -IL-2 y  $\alpha$ -RIL-21.
10. Comparación de Evaluación de la Proliferación Celular mediante Cristal Violeta en las líneas de Carcinoma de Cérvix CALO e INBL durante 48 horas cultivadas en presencia de los anticuerpos  $\alpha$ -IL-2 y  $\alpha$ -RIL-21.
11. Micrografías ópticas (10X) de las líneas celulares de Carcinoma de Cérvix CALO e INBL, cultivadas durante 48 horas con  $\alpha$ -IL2 y  $\alpha$ -RIL-21.
12. Proliferación de células de la línea de Carcinoma de Cérvix CALO cultivada durante 48 horas en presencia de anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -Caspasa 3 y  $\alpha$ -Citoqueratina.
13. Proliferación de células de la línea de Carcinoma de Cérvix INBL cultivada durante 48 horas en presencia de anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -Caspasa 3 y  $\alpha$ -Citoqueratina.
14. Comparación de Evaluación de la Proliferación Celular mediante Cristal Violeta en las líneas de Carcinoma de Cérvix CALO e INBL durante 48 horas cultivadas en presencia de los anticuerpos  $\alpha$ -Citoqueratina y  $\alpha$ -Caspasa 3.
15. Micrografías ópticas (10X) de las líneas celulares de Carcinoma de Cérvix CALO e INBL.

16. Proliferación de células de las líneas de Carcinoma de Cérvix CALO e INBL cultivadas durante 48 horas en presencia deL anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -IgG.
17. Micrográficas ópticas (10X) de las líneas celulares de Carcinoma de Cérvix CALO e INBL.
- 18 a/b. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE, Inmunoglobulina (IgG) digerida durante 27 horas.
19. Prueba de las fracciones Fab y Fc de Inmunoglobulina (IgG) sobre las líneas de Carcinoma de Cérvix CALO e INBL a 24 horas.
20. Prueba de las fracciones Fab y Fc de los anticuerpos  $\alpha$ -IL-2 y  $\alpha$ -RIL-21 sobre las líneas de Carcinoma de Cérvix CALO e INBL a 24 horas.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- Φ AAT: Antígenos asociados a tumor.
- Φ ACS: American Cancer Society.
- Φ ADCC: Citotoxicidad mediada por anticuerpos.
- Φ α: Anti.
- Φ CaCu: Carcinoma de Cérvix.
- Φ CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad.
- Φ CPA: Célula presentadora de antígeno.
- Φ DAG: Diacilglicerol.
- Φ DNA: Ácido desoxirribonucleico.
- Φ DTT: Ditioteitol.
- Φ ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción ligado a enzimas.
- Φ Fab: Fracción variable.
- Φ FAS: CD95/APO-1. Miembro de la super-familia de receptores de muerte TNF.
- Φ FAS-L: Ligando del receptor de muerte Fas.
- Φ Fc: Fracción cristalizable o constante.
- Φ FcR: Receptor Fc.
- Φ FcRn: Receptor Neonatal Fc.
- Φ FcαR: Receptor Fc α.
- Φ FcεR: Receptor Fc ε.
- Φ FcγR: Receptor Fc γ.
- Φ FDC: Células dendríticas foliculares.
- Φ GM-CASF: Factor estimulante de colonias de Granulocitos y Macrófagos.
- Φ GPI: Glicosilfosfatidilinositol.
- Φ ICAM-1: Moléculas de adhesión intercelulares.
- Φ Ig: Inmunoglobulina.
- Φ IgA: Inmunoglobulina A.
- Φ IgD: Inmunoglobulina D.
- Φ IgE: Inmunoglobulina E.
- Φ IgG: Inmunoglobulina G.
- Φ IgM: Inmunoglobulina M.
- Φ IFN-γ: Interferón γ.
- Φ IL-1: Interleucina 1.
- Φ IL-2: Interleucina 2.
- Φ IL-4: Interleucina 4.
- Φ IL-6: Interleucina 6.
- Φ IL-10: Interleucina 10.
- Φ IL-12: Interleucina 12.
- Φ INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
- Φ IP<sub>3</sub>: Inosiltrifosfato.

- Φ ITAM: Motivo de activación del Inmunoreceptor basado en Tirosina.
- Φ ITIM: Motivo de inhibición del Inmunoreceptor basado en Tirosina.
- Φ kDa: Kilodaltones.
- Φ LFA 3: Antígeno asociado a la función linfocítica 3.
- Φ LPS: Lipopolisacárido.
- Φ LTC: Linfocito T citotóxico.
- Φ mAb: Anticuerpo monoclonal.
- Φ mL: Mililitros.
- Φ MRO: Metabolitos reactivos de oxígeno.
- Φ MWCO: Aislamiento de peso molecular (Molecular Weight Cut Off).
- Φ NCI: National Cancer Institute.
- Φ ng: Nanogramos.
- Φ nm: Nanómetros.
- Φ NK: Natural Killer.
- Φ OMS: Organización Mundial de la Salud.
- Φ PBS: Tampón salino fosfato.
- Φ PLC: Fosfolipasa  $\gamma$ .
- Φ PMN: Leucocitos neutrofilicos polimorfonucleares.
- Φ RIL-21: Receptor de Interleucina 21.
- Φ RNA: Ácido ribonucleico.
- Φ RPMI: Roswell Park Memorial Institute.
- Φ SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.
- Φ SFB: Suero Fetal Bovino.
- Φ sTn: Antígeno polivalente sialil-Tn.
- Φ TCR: Receptor de linfocitos T (T-cell Receptor).
- Φ TEMED: Tetrametiletilendiamina.
- Φ TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante beta.
- Φ TH: Linfocito T cooperador.
- Φ T<sub>H</sub>1: Linfocito T cooperador de clase 1.
- Φ T<sub>H</sub>2: Linfocito T cooperador de clase 2.
- Φ TLR: Receptores de tipo Toll (Toll-like Receptors).
- Φ TNF: Factor de Necrosis Tumoral.
- Φ TRIS: Tris(hidroximetil)aminometano.
- Φ VPH: Virus del Papiloma Humano.
- Φ ZIP: Proteína inhibidora asociada a la cadena  $\zeta$ .

**EL PAPEL DE LOS RECEPTORES Fc (FCR) EN LAS LÍNEAS DE CARCINOMA DE CÉRVIX  
CALO E INBL**

**DÍAZ CUPA ALONDRA**

**2014**

## RESUMEN

El Carcinoma de Cérvix (CaCu) es el segundo cáncer con mayor incidencia y mortalidad en la población femenina mundial, registrando 275 000 muertes al año, siendo los países en vías de desarrollo los más afectados, ya que es detectado en etapas avanzadas. Concretamente en México, el INEGI en 2013 reporta 10 muertes por cada 100 mil mujeres de 40 a 49 años; 30 de cada 100 mil de 65 a 74 años, y, 55 en las mujeres adultas mayores de 80 años y más.

Los tratamientos disponibles para esta enfermedad no son selectivos y causan severos efectos secundarios, afectando seriamente la condición general del paciente. Por lo que la tendencia en la investigación actual es el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas que sean selectivas, eliminen la masa tumoral y que además disminuyan los severos efectos secundarios de las terapias normalmente utilizadas.

La Inmunoterapia, en especial la terapia con anticuerpos monoclonales, ha tenido un gran desarrollo en los últimos años, debido a que es la aproximación terapéutica anticancerosa que modifica o potencia las defensas naturales y respuesta inmune del paciente frente al tumor. La Inmunoterapia puede ser efectiva para ciertos tipos de cáncer pero puede que no sea tan efectiva con otros cánceres.

Por esta razón, el trabajo presentado se enfocó a evaluar la proliferación celular de líneas de Carcinoma de Cérvix cuando son cultivadas en presencia de anticuerpos de isotipo IgG1, y de esta forma determinar si las células de CaCu presentan receptores para Inmunoglobulinas, llamados receptores Fc (FcR). Se cultivaron las líneas de CaCu, CALO e INBL, con los anticuerpos  $\alpha$ -IL-2,  $\alpha$ -RIL-21,  $\alpha$ -Caspasa 3 y  $\alpha$ -Citoqueratina a una concentración de 50 ng/mL, posteriormente la proliferación celular se evaluó a las 48 horas mediante la técnica de Cristal Violeta.

Los datos obtenidos para la línea de CaCu CALO muestran un aumento en la proliferación celular cuando es cultivada en presencia de los anticuerpos  $\alpha$ -Caspasa 3 y  $\alpha$ -Citoqueratina; mientras que, con los anticuerpos  $\alpha$ -IL-2 y  $\alpha$ -RIL-21, se observa una disminución en la

proliferación. En contraste, la línea INBL mostró un comportamiento inverso. Se obtuvo una disminución en la proliferación cuando es cultivada en presencia de los anticuerpos  $\alpha$ -Caspasa 3 y  $\alpha$ -Citoqueratina, entretanto, con los anticuerpos  $\alpha$ -IL-2 y  $\alpha$ -RIL-21 se muestra un aumento significativo en la proliferación. Asimismo, se realizó el cultivo celular en presencia de  $\alpha$ -IgG lo que resultó en una inhibición de la proliferación en ambas líneas celulares, además de un cambio morfológico.

Por otro lado, se establecieron las condiciones necesarias para la digestión de anticuerpos con la enzima proteolítica Papaína, la cual separa en sus dos fracciones a las moléculas de anticuerpos para su estudio. Al cultivar ambas líneas en presencia de las fracciones Fab y Fc de los anticuerpos  $\alpha$ -IL-2,  $\alpha$ -RIL-21 y  $\alpha$ -IgG se observa una clara inhibición de la proliferación, además de un cambio drástico en la morfología celular.

Con los resultados obtenidos se puede confirmar la presencia de los receptores Fc en las células de Carcinoma de Cérvix CALO e INBL, debido a que hay una respuesta diferencial en la proliferación celular cuando son cultivadas en presencia de anticuerpos de isotipo IgG1. Además se puede afirmar que, dependiendo del estadio, las células de CaCu van desarrollando diferentes vías de evasión al Sistema Inmune. Debido a que, en caso de INBL (estadio IVB metastásico), tiene una mejor respuesta de evasión, mostrando una mayor proliferación cuando se agregan anticuerpos monoclonales. Asimismo, tenemos un aumento en la proliferación celular con anticuerpos dirigidos contra antígenos encontrados en la membrana externa de la células, y por otra parte, tenemos una inhibición de la proliferación al hacer el cultivo con anticuerpos cuyos antígenos se encuentran en el citoplasma.

## MARCO TEÓRICO

### I. CARCINOMA

El carcinoma, también conocido como cáncer, es una enfermedad mundial que afecta a todos los seres humanos sin tener en cuenta la edad, el sexo, la raza ni el estado socioeconómico, cultural o geográfico (Soler-Gómez y col., 2007).

Cáncer es un término que se usa para enfermedades en las que células anormales se dividen sin control y pueden invadir otros tejidos. Las células cancerosas pueden diseminarse a otras partes del cuerpo por el sistema sanguíneo y por el sistema linfático, lo que da lugar a la aparición de metástasis (NCI, 2013). Esta característica es la que hace considerar el cáncer como una enfermedad sistémica, ya que la metástasis es la responsable de la mayoría de las muertes por cáncer. Por lo tanto, es el resultado de dos procesos sucesivos: el aumento de la proliferación de un grupo de células que darán lugar al tumor y la adquisición de una capacidad invasiva que les permite emigrar por el organismo (Soler-Gómez y col., 2007). Las células cancerosas presentan cuatro características esenciales (Cajaraville y col., 2008):

- ∞ Clonalidad: cada tumor maligno se origina en una única célula que prolifera y da lugar a un clon de células malignas.
- ∞ Autonomía: El crecimiento y desarrollo de la célula cancerosa no es regulado de forma correcta por los moduladores hormonales y bioquímicos normales.
- ∞ Anaplasia: las células tumorales tienen una pérdida de diferenciación celular. En líneas generales, cuanto mayor sea el grado de anaplasia de un tumor mayor será su potencial metastásico y más intensa su diseminación.
- ∞ Metástasis: la célula cancerosa tiene capacidad de difundir (invadir otros tejidos) a distancia de su lugar de origen.

Mundialmente, el cáncer es una de las principales causas de mortalidad, en 2012 causó 8.2 millones de defunciones (OMS, 2014). Este flagelo es resultado de la interacción de factores genéticos y externos (físicos, químicos y biológicos) que produce la degeneración de las células, con lo que se originan lesiones precancerosas y finalmente tumores malignos. Dichos tumores suelen estar localizados, pero eventualmente pueden



diseminarse a otros órganos (INEGI, 2013). El sistema inmune ayuda a eliminar las células potencialmente cancerosas, además de ser capaz de reconocer las proteínas anómalas que sintetizan las células tumorales e identificarlas como extrañas (Soler-Gómez y col., 2007). Las células tumorales reconocidas son eliminadas en el momento de generarse y solo 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, además de escapar a este proceso, se adapta al microambiente adquiriendo resistencia a las células inmunológicas efectoras (Rangel-Corona, 2003).

La incidencia del cáncer se relaciona directamente con la edad, ya que las personas están más tiempo expuestas a factores causales relacionados con esta enfermedad. Los tumores malignos representan aproximadamente 13% de las defunciones mundiales, 7.9 millones de muertes por año, de las cuales más del 72% se registran en países en vías de desarrollo (INEGI, 2013).

Se prevé que el cáncer se convertirá en una causa importante de morbilidad y mortalidad en las próximas décadas en todas las regiones del mundo. Los retos de abordar el cáncer son enormes y, cuando son combinados con el envejecimiento de la población, aumenta la posibilidad de que prevalezca, sin importar las acciones actuales o futuras. Los cambios previstos en la demografía de la población en las próximas dos décadas significa que incluso, si las actuales tasas globales de cáncer no han cambiado, la incidencia se elevará a 21.4 millones en 2030, con cerca de dos tercios de todos los diagnósticos de cáncer se produzcan en países de bajos y medianos ingresos (OMS, 2011).

Un control integral del cáncer se compone de prevención primaria, detección/proyección temprana, tratamiento y cuidados paliativos. Las estrategias específicas para el cáncer están orientadas hacia la prevención y/o control de las infecciones asociadas al cáncer. Una estrategia muy efectiva que se ha estado utilizando durante los últimos 50 años en países con altos ingresos económicos es el tamizaje, el cual usa la prueba para la identificación del Virus del Papiloma Humano (VPH), el examen visual usando ácido

acético y la vacuna contra el VPH. Se ha demostrado que un buen programa de tamizaje puede reducir la mortalidad causada por el cáncer (OMS, 2011).

El cáncer es un conjunto de múltiples enfermedades de las cuáles, el Carcinoma de Cérvix tiene una incidencia muy alta entre la población femenina.

## II. CARCINOMA DE CÉRVIX

El Carcinoma de Cérvix (CaCu) es una enfermedad neoplásica maligna que se origina en el cérvix uterino y cuya progresión natural lleva a la muerte. La historia natural del CaCu implica la progresión gradual por etapas intraepiteliales preinvasoras llamadas lesiones precursoras o pre-malignas, las cuales son estrictamente intraepiteliales es decir, se encuentran por encima de la membrana basal que separa el epitelio escamoso del estroma (D-zul-Rosado y col., 2004). El Carcinoma de Cérvix se origina generalmente en la unión escamocolumnar (zona de transformación), o bien en el canal endocervical. Comienza siendo una lesión local limitada al epitelio, cuando las células neoplásicas rompen la membrana basal se produce la invasión del estroma, estando en presencia del carcinoma invasor (Sáez-Bravo *et al.*, 2004). Los cambios displásicos están constituidos por la multiplicación de las células profundas inmaduras con escaso citoplasma y núcleo grande, que al proliferar pierden la polaridad, ya que han perdido la posibilidad de reproducirse indiscriminadamente; además habrán numerosas mitosis en estas áreas (Alonso de Ruiz y col., 2000).

El CaCu es el segundo cáncer con mayor incidencia en mujeres a nivel mundial, y el primero en muchos países en vías de desarrollo; en los cuales, es detectado en etapas avanzadas. Dicho cáncer provoca 275 000 muertes al año en todo el mundo (OMS, 2011). En México, se tienen reportadas 10 muertes por cada 100 mil mujeres de 40 a 49 años; 30 de cada 100 mil de 65 a 74 años, y, 55 en las mujeres adultas mayores de 80 años y más (INEGI, 2013).

Múltiples factores han sido implicados como riesgo para el Carcinoma de Cérvix, pero ninguno de ellos está tan fuertemente ligado como diferentes tipos específicos de un DNA virus tumoral transmitido por vía sexual, denominado Virus del Papiloma Humano (VPH)

(López-Saavedra y Lizano-Soberón, 2006). El Virus del Papiloma Humano pertenece al grupo *Papovaviridae*, cuya estructura es la de una doble hélice de DNA, cubierta por una cápside proteica icosaédrica (Alonso de Ruiz y col., 2000).

Un cúmulo de pruebas de todo el mundo confirma que ciertos tipos genéticos de VPH desempeñan una función causal necesaria en la carcinogénesis del cuello uterino, específicamente los tipos 16 y 18 (Lewis, 2004). Los HPV-16 y HPV-18 producen las proteínas E6 y E7 respectivamente: E6 se une a p53, mientras que E7 se une a pRb; inhibiendo su función. Tanto p53 como pRb son genes supresores tumorales, es decir, se expresan cuando se produce una lesión en el DNA celular, produciendo una detención del ciclo celular, durante la cual entran en marcha mecanismos de reparación del DNA (Sáez-Bravo *et al.*, 2004).

Además del VPH-16 y el VPH-18, los estudios internacionales recientes han ampliado la lista de los virus oncógenos para incluir los tipos 31, 33, 35, 45, 51, 52, 58 y 59. A nivel mundial, se ha registrado la prevalencia del VPH en 99.7% de los Carcinomas de Cérvix, y los tipos oncógenos 16 (50%) y 18 (12%) son los que se detectan con mayor frecuencia. Numerosos estudios han confirmado reiteradamente la presencia de VPH-16 y VPH-18 en carcinomas cervicouterinos de mujeres de América Latina y el Caribe (Lewis, 2004). Asimismo, se ha evidenciado que las células que contienen dicho genotipo presentan alteraciones en el número y características de los cromosomas, como aneuploidia y marcadas atipias nucleares, que es característico de lesiones de tipo displasia intensa y carcinoma *in situ*, es decir, lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (Alonso de Ruiz y col., 2000).

No obstante, el VPH no constituye una causa suficiente de esta enfermedad; son necesarios ciertos cofactores para que un porcentaje de infecciones persistentes por VPH logre, en algún momento, progresar y dar lugar al cáncer. Entre ellos están los factores del huésped, como los tipos de antígenos de histocompatibilidad y la respuesta Inmune (Alonso de Ruiz y col., 2000).

Actualmente se han desarrollado vacunas terapéuticas y profilácticas contra el VPH, las cuales pueden prevenir más del 70% de nuevos casos de este tipo de cáncer. Los mayores

retos de la introducción de dicha vacuna es el alto costo y tener objetivo principal a las adolescentes, para las cuáles no existe una eficiente plataforma de vacunación (OMS, 2011).

Una de las principales características del cáncer es su capacidad de evadir al Sistema Inmune.

### III. SISTEMA INMUNE

La función del Sistema Inmune es reconocer y eliminar los organismos invasores extraños. La respuesta inmune debe ser rápida, específica y dirigida contra moléculas extrañas o células portadoras de un agente infeccioso, pero nunca contra las células normales propias (Passarge, 2004).

Para proteger al individuo con eficacia contra enfermedades, el Sistema Inmune debe satisfacer cuatro tareas principales (Murphy *et al.*, 2008) (Figura 1):

1. Reconocimiento inmunitario. Necesario para detectar la presencia de una infección. Esta tarea es llevada a cabo tanto por los leucocitos del Sistema Inmune innato, que proporcionan una respuesta inmediata, como por los linfocitos del Sistema Inmune adaptativo.
2. Funciones efectoras inmunitarias. Contiene la infección y de ser posible la elimina por completo, poniendo en marcha funciones como del Sistema de proteínas sanguíneas del complemento, los anticuerpos y las capacidades destructivas de los linfocitos y de otros leucocitos. Al mismo tiempo, la respuesta inmunitaria debe mantenerse controlada de modo que no dañe por sí mismo al organismo.
3. Regulación inmunitaria. Capacidad del Sistema Inmune para autorregularse.
4. Memoria inmunitaria. Proteger al individuo contra enfermedades recurrentes debidas a los mismos agentes patógenos. Una característica principal del Sistema Inmune adaptativo es que tiene la capacidad de generar memoria inmunitaria, de tal modo, que una vez expuesta a un agente infeccioso, se monta una respuesta inmediata más fuerte contra cualquier exposición subsecuente al mismo.

La defensa frente a los microorganismos está mediada por las reacciones tempranas de la inmunidad innata y las respuestas tardías de la inmunidad adaptativa.

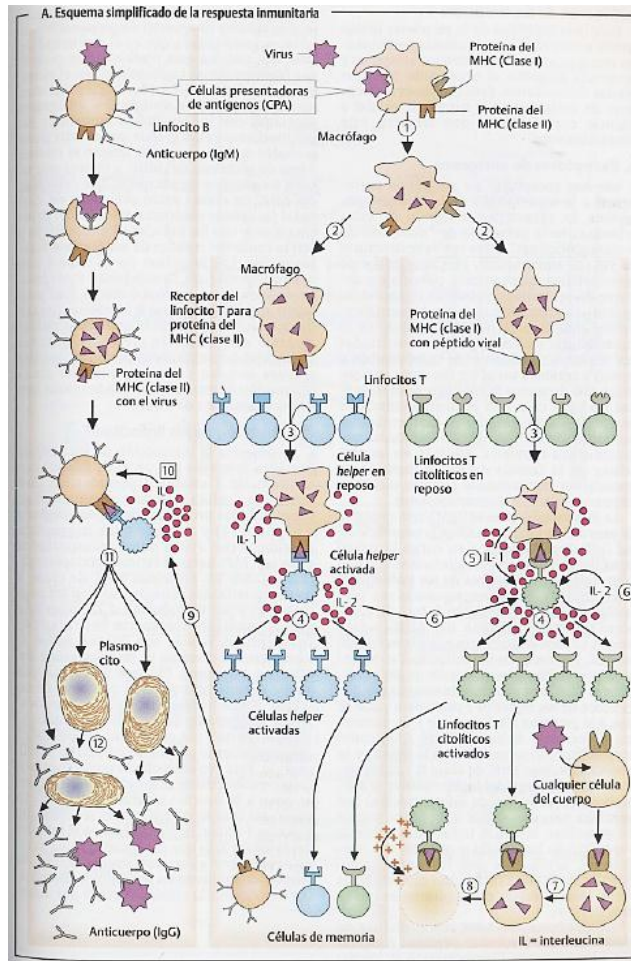


Figura 1. Representación gráfica de la activación Sistema Inmune (Koolman y Roehm, 2005).

### i. Inmunidad Innata

Comprende los mecanismos de defensa bioquímicos y celulares presentes incluso antes de que se produzca la infección y que están preparados para responder con rapidez ante ésta, responde solo frente a microorganismos (Abbas *et al.*, 2008). Este tipo de inmunidad siempre está presente y disponible para proporcionar respuestas rápidas que nos protejan contra la enfermedad (Tortora *et al.*, 2007). Otros se activan y amplifican en presencia de infección y una vez que termina la infección vuelven a cifras basales (Murphy *et al.*, 2008).

No tiene un componente memorial; es decir, no puede recordar un contacto anterior con una molécula extraña. Las respuestas inmunitarias innatas representan el sistema de advertencia temprano de la inmunidad y están destinadas a impedir que los microorganismos logren acceder al cuerpo y a ayudar a eliminar a los que lo logran (Tortora *et al.*, 2007).

Los principales componentes de este tipo de inmunidad según Abbas *et al.* (2008) son:

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

Este tipo de inmunidad depende de receptores codificados por línea germinal para reconocer características que son comunes en muchos microorganismos. De hecho, los mecanismos de la inmunidad innata discriminan con mucha eficacia entre las células del hospedero y patógenos, y esta capacidad para distinguir entre lo propio y lo extraño y para reconocer clases amplias de patógenos, contribuye a la inducción de una respuesta inmunitaria adaptativa apropiada (Murphy *et al.*, 2008).

#### i.i) Activación de la Inmunidad Innata

Si un microorganismo cruza la barrera epitelial y empieza a replicarse en los tejidos del hospedero; casi siempre es reconocido de inmediato por los fagocitos mononucleares, o macrófagos, que residen en estos tejidos. Los macrófagos maduran de modo continuo a partir de monocitos que abandonan la circulación y emigran hacia tejidos de todo el cuerpo. La segunda familia de fagocitos, los neutrófilos, o leucocitos neutrofilicos polimorfonucleares (PMN) son células de vida breve que abundan en la sangre, pero no están presentes en tejidos sanos normales. Estas dos células fagocíticas tienen una función clave en la Inmunidad Innata porque pueden reconocer, ingerir y destruir muchos patógenos sin la ayuda de la respuesta inmune adaptativa (Murphy *et al.*, 2008).

Los macrófagos y neutrófilos reconocen patógenos por medio de receptores de superficie celular que pueden distinguir entre las moléculas de superficie desplegadas por los

patógenos y las del hospedero (Murphy *et al.*, 2008). Dichos receptores, son receptores proteicos localizados en las membranas citoplasmáticas de las células defensivas y son denominados receptores de tipos toll (toll-like receptors, TLR). Los TLR se unen a varios componentes de los microbios como el lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa de las bacterias gramnegativas, la flagelina de los flagelos de las bacterias móviles, el ácido lipoteicoico de la pared celular de las bacterias grampositivas, el DNA de las bacterias y el DNA y RNA de los virus; también se unen a los componentes de los hongos y los parásitos. Cuando los TLR de estas células encuentran componentes de los microorganismos, como el LPS de las bacterias gramnegativas, inducen a las células defensivas que liberen sustancias químicas denominadas citocinas. Las citocinas son proteínas que regulan la intensidad y duración de las respuestas inmunitarias. Una de sus funciones es reclutar a otros macrófagos y células dendríticas, para aislar y destruir a los microorganismos como parte de la respuesta inflamatoria (Tortora *et al.*, 2007).

En muchos casos, la unión de un patógeno a estos receptores conduce a un proceso llamado fagocitosis, seguida de la destrucción del patógeno dentro de un fagocito. La fagocitosis es un proceso activo, en el cual el patógeno unido primero queda rodeado por una membrana, llamada lisosomas, que contienen enzimas, proteínas y péptidos que pueden atacar el microbio. El fagosoma se fusiona con uno o más lisosomas y genera un fagolisosoma en el cual se libera el contenido lisosómico para destruir al patógeno (Murphy *et al.*, 2008).

Al momento de la fagocitosis, los macrófagos y los neutrófilos producen una variedad de otros compuestos tóxicos que ayudan a destruir al microorganismo fagocitado. Los más importantes son los péptidos antimicrobianos y el óxido nítrico (NO), el anión superóxido ( $O_2^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que son directamente tóxicos para las bacterias (Murphy *et al.*, 2008). Los productos tóxicos del oxígeno se forman a través de un proceso conocido como estallido oxidativo. Después de la digestión enzimática del contenido del fagolisosoma contiene material no digerible y se denomina cuerpo residual. Este cuerpo

residual se desplaza hacia la superficie de la célula y descarga sus residuos fuera de ella (Tortora *et al.*, 2007).

Un efecto importante producido por la interacción entre patógenos y macrófagos hísticos es la activación de macrófagos para liberar citocinas y quimiocinas (citocinas quimioatrayentes) y otros mediadores químicos que establecen un estado de inflamación en el tejido y atraen neutrófilos y células plasmáticas hacia el sitio de la infección. Las citocinas inducen la expresión de las llamadas moléculas coestimuladoras sobre macrófagos y sobre las células dendríticas, lo que permite que estas células fagocíticas presentadoras de antígenos inicien una respuesta inmunitaria adaptativa (Murphy *et al.*, 2007).

## ii. Inmunidad Adaptativa

Por otro lado, la inmunidad adaptativa, es estimulada por la exposición a agentes infecciosos y que aumentan en magnitud y capacidad de defensa con cada exposición sucesiva a un microorganismo elevado (Abbas *et al.*, 2008). Se basa en una respuesta específica contra un microorganismo específico; se adapta o se ajusta para ocuparse de un microorganismo en particular (Tortora *et al.*, 2007).

Al contrario de la inmunidad innata, la inmunidad adaptativa es más lenta para responder, pero tiene un componente de memoria. Involucra a los linfocitos denominados linfocitos T y linfocitos B (Tortora *et al.*, 2007). Los linfocitos T (células T) son los responsables de la inmunidad celular, son llamados así por el timo, en dónde se lleva a cabo su diferenciación. Dependiendo de su función son divididos en linfocitos T citotóxicos y linfocitos T cooperadores (Koolman y Roehm, 2005). Los linfocitos T, como los B, responden a los antígenos por medio de receptores ubicados en su superficie, los receptores de linfocitos T (TCR, T-cell receptor). El contacto con un antígeno complementario de un TCR puede determinar que ciertos tipos de linfocitos T proliferen y segreguen citocinas en lugar de anticuerpos (Tortora *et al.*, 2007).



Al término de la respuesta inmunitaria, el Sistema Inmune recupera su estado basal en reposo, debido en gran parte a que la mayoría de la progenie de linfocitos estimulados por el antígeno muere por apoptosis (Abbas *et al.*, 2008).

#### ii.i) Activación de la Inmunidad Celular

Como se describió anteriormente la inmunidad celular está basado en los linfocitos T. Cada linfocito T es específico para un solo antígeno. En lugar de estar recubiertos por las Inmunoglobulinas que les confieren la especificidad a los linfocitos B, los linfocitos T poseen TCR (Tortora *et al.*, 2007).

Los precursores de linfocitos T migran desde la médula ósea y alcanzan la madurez en el timo. La mayor parte de los linfocitos T inmaduros son eliminados en el timo, lo que es análogo a la delección clonal de los linfocitos B. A continuación, los linfocitos T maduros migran desde el timo por vía hemática y linfática hacia diversos órganos linfoides en los que tienen más probabilidad de encontrar antígenos (Tortora *et al.*, 2007). Los linfocitos T maduros recirculantes que aún no han encontrado sus antígenos específicos se conocen como linfocitos T indiferenciados (Murphy *et al.*, 2007). Los linfocitos T indiferenciados, por lo general, son coestimuladas por células dendríticas activadas (Tortora y col., 2007).

Desde el final del desarrollo en el timo, los linfocitos T están divididos en dos clases principales, uno porta la glucoproteína de superficie celular llamada CD8 (T CD8<sup>+</sup>) y el otro porta una glucoproteína llamada CD4 (T CD4<sup>+</sup>). Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> están encargadas en neutralizar las células infectadas por un patógeno (Murphy *et al.*, 2007). No tienen la capacidad de atacar a ninguna célula diana pero son los precursores de los linfocitos T citotóxicos (LTC). Un LTC es una célula efectora que tiene la capacidad de identificar una célula diana que considere extraña; reconoce sobre la superficie de la célula diana los anticuerpos endógenos que están combinadas con una molécula del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) de clase I (Tortora *et al.*, 2007). Por otro lado, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son las moléculas de adhesión que se unen a las moléculas del CMH de clase II (Murphy *et al.*, 2007). Para que un linfocito active su TCR debe reconocer al antígeno que ha sido procesado y lo presenta como fragmentos que forman parte de un complejo de

proteínas del CMH clase II sobre la superficie de la Célula Presentadora de Antígenos (CPA). El linfocito  $T_H$  activado comienza a proliferar y a diferenciarse en poblaciones de linfocitos  $T_{H1}$  y  $T_{H2}$ , además de constituir una población de células de memoria. Los  $T_{H1}$  producen citocinas que activan sobre todo a células relacionadas con la inmunidad celular (macrófagos, linfocitos T  $CD8^+$ , células NK); mientras que los  $T_{H2}$  producen citocinas que se asocian con reacciones alérgicas o con respuestas contra ciertas infecciones parasitarias (Tortora *et al.*, 2007), además, ayudan a la activación de células B indiferenciadas para la producción de anticuerpos (Murphy *et al.*, 2007).

Para que un linfocito T reconozca a los antígenos es necesario que primero hayan sido procesados por células especializadas, las células presentadoras de antígenos (CPA): células dendríticas o macrófagos. Después de este procesamiento, un fragmento antigénico se presenta sobre la superficie de la CPA junto con una molécula del CMH (Tortora *et al.*, 2007).

La CPA aporta información al linfocito T a través de diversos tipos de señales. Las señales esenciales son 3: la primera señal es el reconocimiento del antígeno por parte del receptor de la célula T, cuando le es presentado en las moléculas del CMH de la CPA; la segunda señal, o señal de conformidad, la recibe el linfocito T a través del antígeno CD28, que interactúa con las moléculas de la célula presentadora B7.1 y B7.2 (CD80/CD86), y la tercera señal está mediada por citocinas y determina el tipo de respuesta que se efectuará y la intensidad de ésta (Serrano-Hernández, 2008). Por ejemplo, los macrófagos activos liberan IL-1, mientras que las células T estimulan su propia replicación y de otras células inmunológicas al liberar IL-2 (Koolman y Roehm, 2005).

Los linfocitos también pueden diferenciarse en células de memoria, las cuales exhiben respuesta amplificada en contactos posteriores al antígeno. Los linfocitos T de memoria son heterógenos en los patrones de expresión que siguen las moléculas de adhesión y los receptores de quimiocinas, así como en su propensión a emigrar hacia los diferentes tejidos. Estos subconjuntos de linfocitos nacen a partir de los mismos clones de linfocitos T que dan origen a los linfocitos efectores alojados en la piel (Abbas *et al.*, 2008).

## ii.ii) Activación de la Inmunidad Humoral

Muchas de las bacterias que causan las enfermedades infecciosas en los seres humanos se multiplican en los espacios extracelulares del cuerpo, y la mayoría de los agentes patógenos intracelulares se diseminan al moverse de una célula a otra a través de los líquidos extracelulares. Los espacios que hay entre las células están protegidos por la respuesta inmunitaria humoral, en la cual los anticuerpos producidos por las células B causan destrucción de microorganismos extracelulares y evitan la diseminación de infecciones intracelulares (Murphy *et al.*, 2007).

Antes de encontrar a su antígeno, un linfocito B maduro expresa la Inmunoglobulina (Ig) en una forma unida a la membrana que funciona como receptor de la célula B para el antígeno. El desarrollo de las células B comprende etapas en las que se ensamblan diferentes componentes del receptor de esas células. En este proceso cada célula queda restringida a expresar una sola forma del receptor pero esta forma varía de una célula a otra. Cuando el antígeno se une a este receptor, las células B son estimuladas para que proliferen y se diferencien en células plasmáticas, que entonces secretan anticuerpos de la misma especificidad que tenía la Ig unida a la membrana (Parham, 2005).

El antígeno que requiere de un linfocito T helper ( $T_H$ ) para la producción de anticuerpos se denomina antígeno timodependiente, de modo que debe de existir una interacción y activación entre los linfocitos B y T. El proceso comienza cuando un linfocito B entra en contacto con un antígeno. Dentro del linfocito se produce una reacción enzimática por la que sus fragmentos se combinan con las proteínas de la membrana denominadas Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH). Luego el complejo de los fragmentos antigénicos y el CMH quedan expuestos en la superficie del linfocito B para su identificación por los TCR (Tortora *et al.*, 2007). Los linfocitos T cooperadores estimulan a la célula B mediante la unión del ligando CD40 sobre la células T al receptor CD40 sobre la célula B, por medio de otros pares de ligando de la familia TNF-receptor de TNF, y mediante la liberación dirigida de citocinas (Murphy *et al.*, 2007).

Una vez activado el linfocito B prolifera hasta convertirse en un clon grande de células, algunas de las cuales se diferencian en plasmocitos productores de anticuerpos. Otros

clones de linfocitos B activados se convierten en células de larga vida con memoria que tienen a su cargo la respuesta secundaria aumentada frente a un antígeno, este fenómeno es conocido como selección clonal (Tortora *et al.*, 2007).

En presencia de antígenos el organismo produce proteínas denominadas anticuerpos que se unen a los antígenos y los inactivan o los destruyen. Sin embargo, algunos patógenos pueden alterar los antígenos de su superficie a través de un proceso denominado variación antigénica; en consecuencia, para el momento en que el organismo monta una respuesta inmunitaria contra un patógeno este ya ha alterado sus antígenos y no se ve afectado por los anticuerpos (Tortora *et al.*, 2007).

### III. Anticuerpos

Los anticuerpos son parte de la Superfamilia de las Inmunoglobulinas, las cuales son un grupo de glucoproteínas séricas de movilidad electroforética variable, aunque la mayoría se concentran en la fracción  $\gamma$  de las globulinas. Se caracterizan por su capacidad de unirse a un antígeno y son sintetizadas por células de B y secretadas al medio tras la diferenciación del linfocito B a célula plasmática (Álvarez-López y col., 2004). Contienen un motivo estructural globular llamado dominio Ig, o plegamiento de Ig (Abbas *et al.*, 2008) y circulan como uno de los componentes principales del plasma en la sangre y la linfa (Parham, 2005). Dentro de esta familia estructural figuran moléculas tan importantes como el receptor de linfocitos T, los antígenos linfocitarios codificados por la región CMH (clase I y II), los correceptores CD4 y CD8, moléculas de adhesión como CD2, LFA 3 e ICAM-1, receptores de factores de crecimiento celular, etc. Todas estas moléculas, ejercen funciones de reconocimiento o adhesión intercelular y son fundamentales para el mantenimiento de la homeostasis por el Sistema Inmune (Álvarez-López y col., 2004).

Los anticuerpos se unen a los antígenos de forma específica tanto en la fase de reconocimiento como en la fase efectora de la inmunidad adaptativa. Son producidos por los linfocitos B en una forma acoplada a la membrana y estas moléculas de membrana actúan como receptores de antígenos de los linfocitos B (Abbas *et al.*, 2008).

Ayudan al Sistema Inmune al: 1) unirse a los antígenos en la superficie de los patógenos y de esta forma prevenir que interactúen con las células del cuerpo (neutralización), 2) conformar a patógenos unicelulares en agregados, los cuales son más fáciles de eliminar por los fagocitos (aglutinación), 3) activar al sistema del complemento, promoviendo la defensa de la inmunidad innata (opsonización) y 4) al activar la citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC) (Álvarez-López y col., 2004; Koolman y Roehm, 2005). Las funciones y su efectividad varían según el tipo o subtipo de inmunoglobulina y su localización (Álvarez-López y col., 2004).

Todas las moléculas de anticuerpo comparten las mismas características estructurales básicas, pero muestran una variabilidad importante en las regiones que se unen a los antígenos. Esta variabilidad de las regiones que se unen a los antígenos nos explica la capacidad de los diferentes anticuerpos para unirse a un elevado número de antígenos estructuralmente diferentes (Abbas *et al.*, 2008).

La unidad básica de las inmunoglobulinas está constituida por dos cadenas polipeptídicas ligeras (L) idénticas y otras dos pesadas (H), también idénticas. Cada cadena ligera está unida covalentemente a una pesada, y las pesadas unidas entre sí por puentes disulfuro y fuerzas no covalentes (Figura 2) Las cadenas pesadas (H), son responsables de las características estructurales y funcionales de cada inmunoglobulina (Álvarez-López y col., 2004). Tanto las cadenas pesadas como las ligeras constan de regiones variables aminoterminales (V) que participan en el reconocimiento antigénico y regiones constantes carboxiterminales (C); las regiones C de las cadenas pesadas son las que median las funciones efectoras (Abbas *et al.*, 2008).

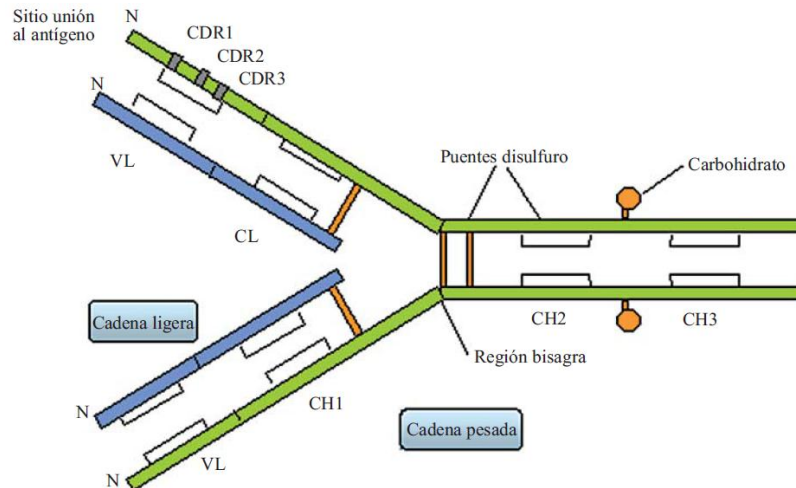


Figura 2. Estructura general de un Anticuerpo (Álvarez-López y col., 2004).

En las cadenas pesadas, la región V se compone de un dominio Ig y la región C de 3 o 4 dominios Ig. Cada cadena ligera está compuesta por un dominio Ig en la región B y un dominio Ig en la región C. Las regiones variables se denominan así porque contienen zonas de variabilidad en la secuencia de aminoácidos que distinguen a los anticuerpos elaborados por un clon de linfocitos B. La región V de una cadena pesada ( $V_H$ ) se encuentra yuxtapuesta con la región V de una cadena ligera ( $V_L$ ) para formar un punto de unión con el antígeno. Los dominios de la región C están separados del lugar de unión del antígeno y no participan en el reconocimiento antigénico. Dichas regiones interactúan con otras moléculas efectoras y células del Sistema Inmune y, por lo tanto, median la mayoría de las funciones biológicas de los anticuerpos. Además, los extremos carboxiterminales de las cadenas pesadas anclan a los anticuerpos unidos a las membranas plasmáticas de los linfocitos B (Abbas *et al.*, 2008).

### iii.i) Clases de Anticuerpos

Las moléculas de anticuerpos se pueden dividir en distintas clases y subclases atendiendo a las diferencias en la estructura de sus regiones C de la cadena pesada (Abbas *et al.*, 2008). Cumplen funciones distintas en la defensa inmunitaria y esto puede correlacionarse con diferencias en sus estructuras organizadas alrededor de la disposición tetrapeptídica

del dominio de inmunoglobulina (Roitt *et al.*, 2006). Las clases (o isotipos) de anticuerpos se designan como IgA, IgD, IgE, IgG e IgM (Abbas *et al.*, 2008), que se diferencian en la estructura molecular, en el tipo de cadena pesada ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ ) y en el contenido de hidratos de carbono (Álvarez-López y col., 2004).

- ∞ **IgA:** Es monomérica (peso molecular de entre 160-400 kDa) y se encuentra en cantidades pequeñas de la forma dimérica. Se encuentra en el suero donde puede contribuir a la unión de los patógenos con las células efectoras por medio de los receptores Fc específicos para IgA. Existe como dos subclases en los seres humanos (IgA1 e IgA2) (Roitt *et al.*, 2006). Tiene capacidad aglutinante y precipitante del antígeno; no activa el complemento pero es gran bactericida (Vidal-Gómez, 2006).
- ∞ **IgD:** Es monomérica (peso molecular 180 kDa) y tiene una región bisagra larga (Roitt *et al.*, 2006). Está fuertemente unida, por el fragmento Fc a la superficie de los basófilos y mastocitos; no activa el complemento (Vidal-Gómez, 2006). Es un anticuerpo encontrado sobre toda en la superficie de las células B como receptor antigénico junto con la IgM, donde es probable que actúe en el control de la activación y suspensión de los linfocitos (Álvarez-López y col., 2004).
- ∞ **IgE:** Anticuerpo monomérico (peso molecular 190 kDa) que se halla normalmente en concentraciones muy bajas en el suero. La unión del antígeno a la IgE establece entrecruzamientos de los receptores IgE y activa una reacción inflamatoria aguda que puede ayudar en la defensa inmunitaria (Roitt *et al.*, 2006). Son responsables de la generación de hipersensibilidad inmediata cuando son expresados sobre células efectoras portadoras en su superficie de los receptores de alta afinidad (Fc $\epsilon$ RI), tales como mastocitos o basófilos, reaccionan con los antígenos o alérgenos (Álvarez-López y col., 2004).
- ∞ **IgG:** Es monomérica, con un peso molecular de 146 kDa (Álvarez-López y col., 2004) y constituye el principal anticuerpo en el suero y en los tejidos no mucosos, donde inactiva a los patógenos de manera directa y a través de la interacción con moléculas que activan a los efectores como el complemento y los receptores Fc

(Roitt *et al.*, 2006), se encuentra distribuida tanto en espacios intra como extravasculares (Álvarez-López y col., 2004). Aparece después que la IgM ha inmunizado y es la única clase de anticuerpo que atraviesa la placenta; se une a los fagocitos mediante la fracción Fc (Vidal-Gómez, 2006). A su vez se dividen en subtipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (Abbas *et al.*, 2008).

Es la única Ig capaz de atravesar la placenta (con menor eficiencia en el caso de la IgG2) y, por tanto confiere inmunidad al recién nacido. También es capaz de fijar el complemento por la vía clásica, al unirse el C1q al dominio CH2 (más fácilmente en el caso de IgG1 e IgG3), o por la vía alternativa (Álvarez-López y col., 2004).

- ∞ **IgM:** Es pentamérica de unidades de cuatro cadenas y, al igual que la IgA, tiene la cadena J que facilita por medio de puentes disulfuro la unión de las distintas unidades (Álvarez-López y col., 2004). Se encuentra en el suero y es muy eficaz en la activación del complemento. Aparece antes que las otras clases de anticuerpos después de la inmunización, es la única clase de anticuerpo que produce el feto (Vidal-Gómez, 2006). La forma monomérica de IgM con una secuencia adherida a la membrana es el principal receptor de anticuerpo utilizado por los linfocitos B para reconocer el antígeno (Roitt *et al.*, 2006). Con la unión de tan solo una molécula de IgM a una superficie celular extraña, se provoca un cambio conformacional de la región Fc de la Ig que permite la interacción del C1q con el dominio CH3. Esta unión desencadena la cascada del complemento que tiene como resultado la lisis de la célula en cuestión (Álvarez-López y col., 2004).

Para IgG, IgA e IgD, el Fc se conecta con los brazos de Fab por medio de una región bisagra: para IgM e IgE un par adicional de dominios reemplaza la bisagra. IgA, IgM e IgD tienen apéndice en el C terminal de las cadenas pesadas (Roitt *et al.*, 2006).

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



#### IV. Receptores Fc

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

Durante la citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC), los anticuerpos unidos a las células tumorales reclutan a células efectoras del sistema inmune innato que expresan receptores celulares específicos (receptores Fc) para la región constante del anticuerpo, y de esta forma, activa la fagocitosis, liberando mediadores inflamatorios y sustancias citotóxicas (Nimmerjahn y Ravetch, 2007; Mora y Rosales, 2009).

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

Después del reconocimiento del anticuerpo los receptores Fc se agregan en la membrana de la célula iniciando con esta agregación las vías de señalamiento que llevan a la activación celular. La activación de los fagocitos es la función más común que se atribuye a los receptores Fc. Los neutrófilos y los macrófagos comienzan a ingerir y destruir a los agentes patógenos recubiertos de IgG a través del proceso de fagocitosis (Takai, 2002).

Los FcR se encuentran en (Nimmerjahn y Ravetch, 2008):

- ∞ Mastocitos y Basófilos: Liberación de sustancias vasoactivas y quimioatrayentes.
- ∞ Neutrófilos: Liberación de quimioatrayentes, sustancias citotóxicas y Fagocitosis.
- ∞ Macrófagos: Explosión oxidativa, Citotoxicidad, liberación de mediadores proinflamatorios.
- ∞ Células Plasmáticas: Apoptosis.

- ∞ Células B: Modulación de activación celular, formación de células B.
- ∞ Células Dendríticas: Modulación de activación celular, presentación de Antígenos (células T y células B), regulación de tolerancia periférica.

#### i. Familias de receptores Fc

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

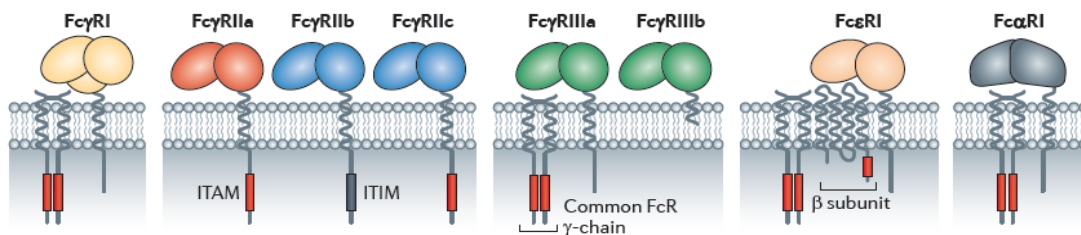


Figura 3. Representación de Receptores Fc de leucocitos humanos (Hogarth y Pietersz, 2012).

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

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

- ∞ FcγRI: Es un receptor de alta afinidad, a diferencia de los demás miembros de la familia, cuenta con un tercer dominio (Figura 4) haciéndolo más específico a la unión con la fracción Fc y los anticuerpos de tipo IgG1 e IgG3 (Hogarth y Pietersz, 2012). FcγRI presenta una cadena α, que une a los anticuerpos IgG, asociada a un dímero de cadenas gamma (también llamadas cadenas FcRγ), cada cadena γ contiene residuos de tirosina que son fosforilados al activarse el receptor (Mora y Rosales, 2009).

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

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

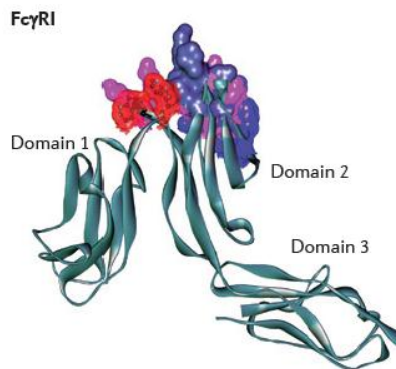


Figura 4. Estructura tridimensional del FcγRI (Hogarth y Pietersz, 2012).

- ∞ FcγRII: Es una molécula con una cadena que contiene al motivo de inhibición del inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplasmático (Takai, 2002). Las isoformas del FcγRII se distribuyen de forma diferente en varios

leucocitos. El Fc $\gamma$ RIIa se encuentra principalmente en células fagocíticas (neutrófilos, monocitos y macrófagos), mientras que el Fc $\gamma$ RIIb se expresa en muchos tipos de células incluyendo fagocitos, linfocitos, células cebadas y células dendríticas. La cadena  $\alpha$  del Fc $\gamma$ RIIa contiene un ITAM (motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina) en su porción citoplásmica, mientras que la cadena  $\alpha$  del Fc $\gamma$ RIIb tiene, en su parte citoplásmica, una secuencia diferente que también contiene tirosinas (ITIM), la cual inicia señales inhibitorias (Mora y Rosales, 2009), contrarrestando las señales positivas enviadas a los linfocitos B por el entrecruzamiento inducido por antígenos de las Ig de membrana. Por tanto, la agrupación de Fc $\gamma$ RIIb, inducida por la ocupación con IgG1 o IgG3 polivalentes, puede detener la activación del linfocito B (Abbas *et al.*, 2008).

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

- ∞ Fc $\gamma$ RIII: La porción extracelular de unión al ligando de Fc $\gamma$ RIII es similar a Fc $\gamma$ RII en estructura afinidad y especificidad por IgG (Abbas *et al.*, 2008). El Fc $\gamma$ RIII tiene dos isoformas: Fc $\gamma$ RIIIa y Fc $\gamma$ RIIIb (Mora y Rosales, 2009). El Fc $\gamma$ RIIIa es una proteína transmembranal expresada principalmente por linfocitos NK (Abbas *et al.*, 2008), está formado por una cadena  $\alpha$  que une IgG y por un homodímero de cadenas  $\gamma$  que contienen cada una un ITAM (Mora y Rosales, 2009). Fc $\gamma$ RIIIa, al igual que Fc $\gamma$ RI, no contiene a ITAM *per se* pero forma de manera independiente complejos de receptores multisubunitarios, a través de su asociación no covalente con un dímero disulfuro (la cadena- $\gamma$  “común” de los FcR), en donde se encuentra a ITAM dentro de la cola intracelular de cada cadena del dímero. Es asociado a homodímeros de la cadena gamma del FcR, homodímeros de la cadena  $\zeta$  de los TCR o heterodímeros compuestos por la cadena  $\gamma$  y  $\zeta$  del FcR (Abbas *et al.*, 2008; Mora y Rosales, 2009; Hogarth y Pietersz, 2012).

Fc $\gamma$ RIIIb es un receptor sin porción citoplásmica unido a la membrana por un enlace glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Mora y Rosales, 2009) es expresado

únicamente en los neutrófilos, no media la fagocitosis ni desencadena la activación de los neutrófilos (Abbas *et al.*, 2008).

Se ha reportado que IgG1, IgG3 e IgG4 tiene una alta afinidad, en el rango nanomolar, con los receptores de tipo FcγRI, y que la unión monomérica de los IgG con este receptor es fácilmente detectable mediante citometría de flujo. IgG1 e IgG3 se unen a todos los FcγR, sus afinidades están en el rango nanomolar para FcγRI y en el rango submicromolar para FcγRIIb (Figura 5) (Cassard *et al.*, 2006; Nimmerjahn y Ravetch, 2007; Hogarth y Pietersz, 2012).

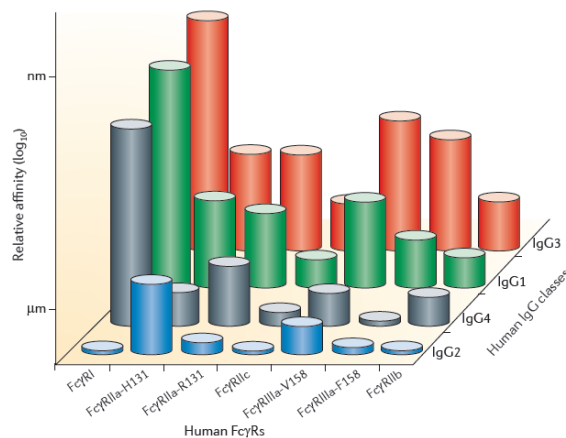


Figura 5. Representación gráfica de las diferencias relativas en afinidad entre las subclases de IgG por los receptores Fcγ (Hogarth y Pietersz, 2012).

**b) FcεR:** Dos tipos de receptores FcεR se han descrito: el receptor de alta afinidad FcεRI y el receptor baja afinidad FcεRII (CD23) (Mora y Rosales, 2009).

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

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

- ∞ FcεRII: El receptor de baja afinidad a IgE es una lectina tipo C que tiene múltiples funciones como receptor soluble o receptor unido a la membrana celular (Mora y Rosales, 2009). Se considera una proteína de membrana integral tipo II, debido a su segmento aminoterminal de localización intracitoplasmática, hecho que representa una característica diferencial con el resto de receptores Fc, cuyo extremo intracitoplasmático es C-terminal (Álvarez-López y col., 2004). Controla el crecimiento y la diferenciación de células B y bloquea la unión de IgE a los eosinófilos, los monocitos y los basófilos (Mora y Rosales, 2009). Existe en dos formas: FcεRIIa se expresa constitucionalmente en los linfocitos B y FcεRIIb que se induce por IL-4 en linfocitos T, células de Langerhans, monocitos, macrófagos y eosinófilos. Ambas median la endocitosis de las partículas recubiertas por IgE (Abbas *et al.*, 2008).

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

- ∞ Fcα/μR: Es una proteína transmembranal tipo I que tiene solamente una región tipo Ig en su parte extracelular y une débilmente IgA, pero se une a IgM con mayor afinidad (Mora y Rosales, 2009). Se ha propuesto que está involucrado en las etapas tempranas de la respuesta inmune hace microorganismos (Takai, 2002).
- ∞ FcαRI: Este receptor presenta una alta afinidad por IgA y tiene dos regiones tipo Ig en su parte extracelular, además se asocia con un dímero de cadenas γ. El FcαRI se encuentra en la superficie de neutrófilos, eosinófilos, monocitos,

algunos macrófagos (incluyendo células Kupffer) y algunas células dendríticas. El Fc $\alpha$ RI es responsable de activar respuestas celulares dependientes de IgA como el estallido respiratorio, la degranulación y la fagocitosis por granulocitos, monocitos y macrófagos. En células dendríticas, participa en la presentación de antígenos (Mora y Rosales, 2009).

## ii. Mecanismos de señalización de los Receptores Fc (FcR)

Como se mencionó anteriormente los receptores Fc tienen actividad activadora o inhibitoria dependiendo de la secuencia ITAM o ITIM que contengan en su región citoplasmática. Los receptores con actividad activadora son Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIIa; mientras que el único receptor inhibitor es Fc $\gamma$ RIIb (Gómez-Medellín y col., 2005; Mora y Rosales, 2009).

### ii.i Activación

La activación de los Fc $\gamma$ R lleva a cambios moleculares en el interior de las células, que involucran la activación de cinasas de la familia Src (Hck, Lyn y Fyr), seguida de la activación de cinasas de la familia Syk (Mora y Rosales, 2009) que se unen a ITAM fosforilado, como una especie de anclaje molecular (Gómez-Medellín y col., 2005).

Las cinasas de Src se encuentran cerca de las porciones citoplásmicas de los receptores, gracias a sus modificaciones lipídicas que las mantienen en la parte interna de la membrana celular. Sin embargo, estas cinasas permanecen inactivas hasta que los Fc $\gamma$ R son agregados. El mecanismo exacto de cómo se activan estas cinasas no se conoce aun completamente aunque involucra, en parte, la ubicación de las cinasas de Src con el receptor en las balsas de lípidos. La colocalización de los receptores a las balsas de lípidos parece ser un paso regulador para iniciar la señalización. Al menos para el Fc $\gamma$ RIIa, se ha demostrado que su agregación induce la colocalización del receptor a las balsas de lípidos y que esta asociación correlaciona con un señalamiento eficiente del receptor. Entonces, una vez que el Fc $\gamma$ R se mueve a las balsas de lípidos, el receptor puede interactuar

fácilmente con las cinasas de la familia Src, las cuales, a su vez, fosforilan a las secuencias ITAM de las cadenas y asociadas al receptor Fc. La activación de Syk lleva a la fosforilación y activación del complejo molecular de señalamiento formado por SLP76 y LAT, las cuales interactúan entre sí por medio de la proteína adaptadora Gads. Otras proteínas son después reclutadas a este complejo, entre ellas la fosfolipasa (PLC)  $\gamma 1$ , que produce inosiltrifosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol (DAG). Estos segundos mensajeros causan la liberación de calcio intracelular y la activación de la proteína cinasa C (PKC), respectivamente. La PKC lleva a la activación de las cinasas ERK y p38. Vav, el factor intercambiador de nucleótidos de guanina, activa a las GTPasas de la familia Rho y Rac, las cuales están involucradas en la regulación del citoesqueleto de actina. Otras enzimas como la cinasa de tirosina de Bruton (Btk) y la cinasa de fosfatidilinositol 3 (PI 3-K) activan a la GTPasa Rac y a factores nucleares como NF- $\kappa\beta$  (Mora y Rosales, 2009).

Es importante señalar que dependiendo del tipo celular y la clase de receptor Fc usado, pueden estar involucradas diferentes clases de cinasas (Gómez-Medellín y col., 2005).

La señalización de activación vía ITAM lleva al estrés oxidativo, la liberación de cinasas, la fagocitosis por macrófagos, la citotoxicidad células dependiente de anticuerpos por células NK y la degranulación de mastocitos (Takai, 2005).

#### ii.ii Inhibición

El Fc $\gamma$ RIIb es el único receptor Fc en los linfocitos B, el mecanismo de las señales inhibitoras de este receptor se ha caracterizado en linfocitos B. Cuando el BCR (Complejo de células B) es co-agregado, por complejos inmunes, junto con el Fc $\gamma$ RIIb las respuestas de las células B son atenuadas (Mora y Rosales, 2009). El bloqueo de dicho receptor promueve la actividad inhibitoria que se lleva a cabo con el bloqueo en el flujo de calcio y por lo tanto reducción de la proliferación y diferenciación de células B, afectando la secreción de inmunoglobulinas (Gómez-Medellín y col., 2005).



La inhibición mediada por el FcγRIIb utiliza su secuencia ITIM, que consta de 13 aminoácidos en su región citoplásmica y cuando el ITIM es fosforilado se convierte en sitio de unión para la fosfatasa de tirosinas SHP-1 (Mora y Rosales, 2009).

La cascada de señalización se inicia con la unión del FcR con la inmunoglobulina, generando un cambio conformacional que activa una cinasa de la familia Src, llamada Lyn. Esta modificación desencadena el agrupamiento de fosfatasas que contiene dominios SH2 como SHP-1, SHP-2 y fosfatasas que contienen inositol llamadas SHIP (Gómez-Medellín y col., 2005). Estas fosfatasas impiden que el complejo molecular de señalamiento se ensamble, dando como resultado la inhibición celular, a través de dos mecanismos (Mora y Rosales, 2009).

1. La modificación que se realiza en el dominio SH2 (sitio de unión para la fosfatasa SHIP) impide la activación de ITAM por hidrólisis de PIP<sub>3</sub>, que es una molécula que participa en la cascada de activación. En ausencia de PIP<sub>3</sub>, las proteínas de unión a dominios PH como Btk y PLCγ, son liberados de la membrana y la señal de entrada de calcio a la célula es bloqueada (Gómez-Medellín y col., 2005). Inhibe las vías de señalamiento que involucran a las moléculas Btk, PLCγ, Akt y ERK (Mora y Rosales, 2009).
2. SHP-1 impide la fosforilación y activación de proteínas de señalamiento como los receptores que contienen secuencias ITAM, la cinasa Syk, y la PLCγ (Mora y Rosales, 2009).

El FcγRIIb regula el inicio de muchas funciones celulares al crear, junto con los FcR activadores, un umbral para la activación celular. Esto significa que una respuesta celular en particular puede o no ser iniciada dependiendo de la cantidad relativa de receptores Fc activadores e inhibidores en la membrana de la célula. Más aún, la cantidad de receptores que expresa una célula no es fija. La expresión del FcγRIIb puede ser regulada por varias citocinas; por ejemplo, IL-4, IL-10 y TGF-β aumentan la expresión de FcγRIIb, mientras que

el C5a y el IFN- $\gamma$  disminuyen la expresión de Fc $\gamma$ RIIb y aumentan la expresión de los FcRs activadores (Mora y Rosales, 2009).

## INMUNOTERAPIA

Se han desarrollado múltiples terapias para combatir el cáncer: Cirugía, Radioterapia, Quimioterapia y Radioquimioterapia; sin embargo todas ellas tienen efectos secundarios en el paciente. Por esta razón, en los últimos años se ha hecho énfasis en el desarrollo de la Inmunoterapia.

La inmunoterapia es la aproximación terapéutica anticancerosa que pretende modificar o potenciar las defensas naturales y respuesta inmune del paciente frente al tumor. La terapia biológica ha sido impulsada gracias al conocimiento de la biología tumoral y de las diferencias en el control de la proliferación y diferenciación de las células neoplásicas y las células normales (Cajaraville y col., 2008).

En el tratamiento se utilizan ciertas partes del Sistema Inmune para que combata a las diferentes enfermedades, entre ellas al cáncer. Se puede realizar de dos formas (ACS, 2013):

- Σ Estimular el propio Sistema Inmune para que actúe con más fuerza para atacar a las células cancerígenas.
- Σ Dar al paciente componentes del Sistema Inmune, como proteínas fabricadas del propio sistema.

Algunas terapias biológicas para el cáncer usan vacunas o bacterias para estimular el sistema inmunitario del cuerpo para que actúe contra las células cancerosas. Otras terapias biológicas, como los anticuerpos o segmentos de material genético (RNA o DNA), apuntan directamente a células cancerosas (NCI, 2013).

La Inmunoterapia puede ser efectiva para ciertos tipos de cáncer pero puede que no sea tan efectiva con otros cánceres. En algunos cánceres se utiliza solo este tipo de terapia, pero para la mayoría de los tipos de la enfermedad es más efectivo cuando se recurre a la combinación con otros tipos de tratamientos (ACS, 2013).

**ANTECEDENTES**

Estudios previos del Laboratorio de Oncología Celular demostraron, mediante Cinética de Proliferación, que al agregar anticuerpos del isotipo IgG1 a cultivos de líneas de Carcinoma de Cérvix (CaCu), CALO e INBL, existe un efecto proliferativo. Asimismo, Medrano-Ortiz (2011) comprobó que las líneas de CaCu cultivadas en presencia de anticuerpos  $\alpha$ -MIC-A,  $\alpha$ -MIC-B y  $\alpha$ -IL-2 incrementan su proliferación hasta cinco veces más que el control. Cabe destacar que este incremento en la proliferación es inversamente proporcional a la concentración de anticuerpo utilizada; es decir, a menor concentración de anticuerpo se obtiene una mayor proliferación. Lo que nos hace pensar que, las células de Carcinoma de Cérvix, expresan receptores para Inmunoglobulinas.

Al respecto Tapia-Orozco (2014), demostró la presencia del mensajero para el receptor neonatal Fc (FcRn) en células de las líneas de CaCu CALO e INBL. Este receptor es normalmente expresado en el sincitiotrofoblasto durante la etapa fetal, su principal función es transportar IgGs de la circulación sanguínea materna a los capilares fetales de las vellosidades placentarias. En los adultos, el FcRn prolonga la media vida de IgG presentes en el suero, ayudando a mantener altas concentraciones de esta clase de anticuerpos protectores en la circulación.

Otro receptor que en los organismos adultos participa en el procesamiento de anticuerpos de isotipo IgG, son los denominados receptores Fc (FcR). Entre sus funciones efectoras importantes se encuentra la fagocitosis, en donde el macrófago endocita al patógeno y es degradado por lisosomas para su posterior eliminación; la liberación de citocinas pro-inflamatorias, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, entre otras.

Sin embargo, se desconoce cuál es la función de los receptores FcR en células de Carcinoma de Cérvix. Por esta razón, es importante aclarar la interacción de los receptores Fc (FcR) con anticuerpos monoclonales (IgG) y esclarecer su participación en la regulación de la proliferación de células tumorales.

## JUSTIFICACIÓN

El Carcinoma de Cérvix representa un serio problema de salud dentro de la población femenina mexicana, por ello la investigación científica se ha enfocado en encontrar nuevas terapias para este tipo de cáncer. La terapia con anticuerpos monoclonales (mAb's) es una de estas alternativas terapéuticas recientemente utilizadas dada su alta especificidad para reconocer antígenos en las células tumorales y no lesiona a la mayoría de las células normales. El objetivo de esta terapia antitumoral consiste en incrementar las respuestas inmunitarias frente a tumores, al administrar efectores inmunitarios específicos de los tumores.

El Sistema Inmune tiene un gran papel en el desarrollo del cáncer, éste ayuda a eliminar a las células cancerígenas al utilizar los receptores Fc (FcR), los cuales promueven la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), recepción e inducción a presentación de antígenos, entre otros. Existen reportes que indican que los anticuerpos pueden inducir la proliferación de células cancerosas, entre las cuales se encuentra el Carcinoma de Cérvix (CaCu), de tal manera que se hablaría de la posible presencia de receptores para Inmunoglobulinas (FcR) en células tumorales, lo cual hasta el momento no ha sido reportado.

Por esta razón, en este trabajo se determinó la presencia de este receptor utilizando la fracción Fc de diferentes anticuerpos fraccionados en cultivos de células de CaCu. Esto nos permitirá esclarecer los mecanismos moleculares que utilizan las células de Carcinoma de Cérvix para promover su proliferación en presencia de anticuerpos no relacionados con antígenos de superficie.

**HIPÓTESIS**

Se ha reportado la presencia del receptor FcR (FcγRI) en células endoteliales; y dado que las líneas de Carcinoma de Cérvix, CALO e INBL, provienen de la misma capa embrionaria, entonces también expresarán este receptor.

**OBJETIVO GENERAL**

Identificar la presencia de receptores Fc (FcR), así como dilucidar el papel que estos juegan en la regulación de la proliferación en células de las líneas de Carcinoma de Cérvix CALO e INBL.

**OBJETIVOS PARTICULARES**

- ⊕ Evaluar la Proliferación Celular con anticuerpos de isotipo IgG1 a 48 horas.
- ⊕ Estandarizar y realizar la digestión de Anticuerpos con la enzima Papaína.
- ⊕ Evaluar la Proliferación Celular con las fracciones obtenidas de la digestión.

## Metodología

### LÍNEAS CELULARES

Se obtuvieron las líneas celulares CALO e INBL (Figura 6) del material criopreservado de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, Laboratorio de Oncología Celular (L-4) de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Línea Celular	Estadio clínico	VPH	Características
CALO	IIB	18	Carcinoma de origen Epidermoide de células grandes no queratinizadas. No metastásico.
INBL	IVB	18	Carcinoma de origen Epidermoide de células grandes no queratinizadas. Metastásico.

Figura 6. Características de las líneas celulares CALO e INBL.

### CULTIVO CELULAR

Ambas líneas se cultivaron en cajas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> con medio RPMI-1640<sup>(MICROLAB)</sup> al 10% de Suero Fetal Bovino (SFB)<sup>(GIBCO)</sup>. Los cultivos fueron mantenidos en incubadora<sup>(FORM SCIENTIFIC, EUA)</sup> con temperatura de 37°C, pH 7.2; con una atmósfera húmeda saturante al 5% de CO<sub>2</sub>. En el momento de que las células se encontraron en fase exponencial, se separaron del sustrato de cultivo con ayuda de Verseno para de esta forma centrifugar y obtener un botón celular. Se procedió a realizar el conteo celular con ayuda de una Cámara de Neubauer<sup>(AMERICAN OPTICAL, EUA)</sup>, la viabilidad celular se realizó mediante la exclusión de Azul de Tripano<sup>(SIGMA)</sup>.

### EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Para la evaluación de la proliferación celular durante 48 horas, se cultivaron las células en placas de 96 pozos<sup>(COSTAR, USA)</sup>. En cada pozo a utilizar se colocaron 3x10<sup>3</sup> de células, se agregó el tratamiento con los anticuerpos monoclonales α-IL-2, α-RIL-21, α-Citoqueratina, α-Caspasa 3 y α-IgG a concentración 50 ng/mL. Cabe señalar que se adicionó un control, es decir, células sin anticuerpo. La placa se dejó durante 24 horas, los pozos se observaron

con ayuda del Microscopio invertido<sup>(Leica, Alemania)</sup> y se tomaron fotografías electrónicas con la Cámara Leica DC100<sup>(Alemania)</sup> para registrar los cambios ocurridos. Transcurridas otras 24 horas, se realizó el proceso antes mencionado.

Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se procedió a fijar los pozos con 100 µL Glutaraldehído al 1.1%. Se incubo durante 20 minutos, cumplido dicho tiempo se retiró el reactivo y a cada pozo se le hizo 3 lavados con PBS para después secarlas a temperatura ambiente. A continuación las células se tiñeron con 100 µL de Cristal Violeta al 0.1%<sup>(SIGMA, EUA)</sup> durante 20 minutos y agitación mecánica<sup>(The Orbit™ LS, EUA)</sup>. El Cristal Violeta se removió mediante vacío y se realizaron 3 lavados con PBS para eliminar el exceso del mismo. Las placas se dejaron secar y se le agregaron 100 µL de ácido acético al 10%<sup>(SIGMA, EUA)</sup>, se colocaron en agitación mecánica durante 20 minutos para su posterior lectura a 570 nm de absorbancia en el lector de ELISA<sup>(Biotek, Instruments, Inc., EUA)</sup>. Se realizó un análisis estadístico para así establecer las diferencias entre tratamientos.

#### DIGESTIÓN DE ANTICUERPOS

Las digestiones proteolíticas revelan información importante para determinar la estructura y función de una molécula de anticuerpo. Los anticuerpos pueden ser divididos en sus fracciones y cada una de estas fracciones tienen una actividad distinta (Ertürk *et al.*, 2011).

Clásicamente, la fragmentación de la fracción monovalente Fab es realizada mediante la digestión con Papaína, la cual escinde en los enlaces de cisteína en la Inmunoglobulina, teniendo como resultado a dos fracciones: Fab y Fc (Figura 7). Por otra parte, la fracción bivalente F(ab')<sub>2</sub> es obtenida por la digestión con pepsina (Andrew y Titus, 1997).

La papaína es una proteasa sulfhidrónica, una proteína globular de 212 aminoácidos, aislada del látex de la papaya (*Carica papaya*), cataliza la hidrólisis de muchas clases de enlaces péptidos. En su estado nativo la papaína presenta muy baja actividad; por lo que todos los ensayos sobre su actividad son realizados en presencia de activadores, comprendiendo cisteína (0.005M) (Martínez-Hernández, 2004).



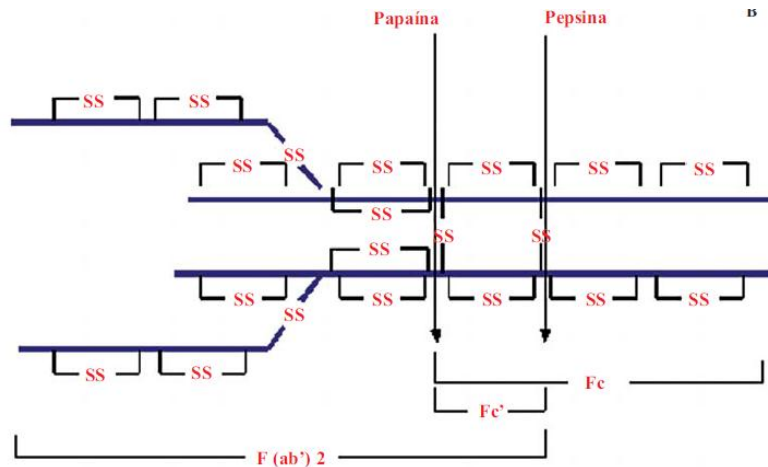


Figura 7. Lugares de acción de las enzimas proteolíticas en una Inmunoglobulina (Álvarez-López y col., 2004).

Se utilizó como base el protocolo publicado por Andrew y Titus (1997) en "Current Protocols in Immunology". Se empleó papaína extraída de papaya látex<sup>(Sigma)</sup>, dicha enzima se liofilizó para la obtención de una solución stock de 10 mg/mL. Los anticuerpos a digerir se prepararon a una concentración 2 mg/mL disueltos en PBS. Se agregó la misma cantidad de anticuerpo, buffer de digestión y papaína para de esta forma iniciar la digestión y no perder las molaridades requeridas. Las digestiones se dejaron en incubación a 37°C durante 27 horas, transcurrido dicho tiempo se detuvo la digestión con 200  $\mu$ L de Yodoacetamida 0.3 M<sup>(MILLIPORE, USA)</sup>. Las fracciones se separaron con filtros para centrifuga Amicon® Ultra-15<sup>(MILLIPORE, USA)</sup> de 30 000 MWCO para la obtención de la fracción Fab y de 10 000 MWCO para la fracción Fc.

#### GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE

Para comprobar si las muestras fueron digeridas se corrieron en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12.5%. Los gels de poliacrilamida son el resultado de la polimerización química de una mezcla entre acrilamida y bisacrilamida. El tamaño de los poros que forma la red de la red de la red depende de la concentración de acrilamida y bisacrilamida en la preparación del gel.

Los fragmentos Fab se deberán observar en un peso de 50 kDa, los fragmentos Fc se observarán en 27 kDa, mientras que los anticuerpos no digeridos aparecerán en 150 kDa.

Se podrán visualizar otras dos bandas, en 25 y 15 kDa, los cuales constituyen a productos de digestión sin relevancia (Andrew y Titus, 1997).

Se tomaron 20  $\mu$ L de muestra, se añadió 5  $\mu$ L de Buffer de Laemli 5X y 5  $\mu$ L de DTT (ditioteitol), esta mezcla se puso en agua hirviendo durante 5 minutos. A continuación se prepararon el gel separador y el gel concentrador. El primero se preparó con los siguientes reactivos:

- ∞ 4.2 mL de acrilamida.
- ∞ 1.25 mL TRIS 3 M pH 8.8.
- ∞ 100  $\mu$ L SDS 10%.
- ∞ 500  $\mu$ L Persulfato de Amonio 1.5%.
- ∞ 3.98 mL Agua destilada.
- ∞ 15  $\mu$ L TEMED.

Siempre se debe agregar el TEMED al final, es decir, cuando los demás reactivos ya estén mezclados. Se agitó bien la mezcla y se colocó en la cámara de electroforesis. Se cubrió con agua destilada y se dejó polimerizar aproximadamente 10 minutos. Mientras tanto se preparo el gel concentrador:

- ∞ 625  $\mu$ L acrilamida.
- ∞ 1.25 mL TRIS 1 M pH 6.8.
- ∞ 50  $\mu$ L SDS 10%
- ∞ 250  $\mu$ L Persulfato de amonio 1.5%
- ∞ 2.8 Agua destilada.
- ∞ 7.5  $\mu$ L TEMED.

Una vez polimerizado el gel separador se retiró el agua destilada y se agregó la mezcla del gel concentrador, se colocó el peine con 12 pozos y se dejó polimerizar.

A continuación se agregó el Buffer de carga 1X, cuidando no dejar burbujas y se cargaron las muestras en los pozos junto con la escalera proteica. Primero se corrió a 85 V durante

aproximadamente 30 minutos, o hasta que las muestras hayan pasado al gel separador, posteriormente se subió el voltaje a 120 y se corrió durante aproximadamente 1 hora.

Para la visualización de las bandas obtenidas, el gel se tiñó durante 24 horas con Azul de Coomassie 10% (solución teñidora). A continuación el gel se colocó en la solución desteñidora y se puso en agitación mecánica hasta que las bandas fueron visibles. El gel se colocó en papel filtro y se seco con un secador de geles durante una hora a 60°C para su análisis y conservación.

#### PRUEBA DE LAS FRACCIONES EN CULTIVOS DE CÉLULAS TUMORALES

Se realizaron los cultivos celulares en presencia de las fracciones obtenidas a una concentración de 20 ng/mL. Posteriormente se evaluó la proliferación celular a las 24 horas, esto para ver la respuesta que tienen las líneas celulares cuando están en presencia de las fracciones.

## RESULTADOS

Medrano-Ortiz (2011) demostró que al cultivar células de Carcinoma de Cérvix (CaCu) en presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra receptores funcionales inducen a la proliferación. De igual modo se ha identificado la presencia de los receptores funcionales para IL-2 (Rangel-Corona y col., 2010) e IL-21 (Pablo-Arcos, sin publicar) en las líneas de CaCu, CALO e INBL. Asimismo, se ha reportado la presencia de los receptores Fc (FcR) en diferentes tipos de cáncer (colorectal, mama, linfomas).

Por lo antes descrito, se realizaron pruebas *in vitro* para evaluar la respuesta proliferativa de células tumorales a anticuerpos cuyos antígenos se encuentran en la membrana externa de la célula ( $\alpha$ -IL-2,  $\alpha$ -RIL-21) y de antígenos localizados al interior de la misma ( $\alpha$ -Caspasa 3,  $\alpha$ -Citoqueratina).

En este se estudió si anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos que se encuentran al interior celular tienen el mismo efecto sobre la proliferación que el ya reportado para anticuerpos dirigidos contra antígenos externos. Para ello, se cultivaron  $3 \times 10^3$  células en placas de 96 pozos durante 48 horas en presencia de los anticuerpos monoclonales anti ( $\alpha$ )  $\alpha$ -IL-2,  $\alpha$ -RIL-21,  $\alpha$ -Caspasa 3,  $\alpha$ -Citoqueratina y  $\alpha$ -IgG. Como control se usaron células de CaCu cultivadas en ausencia de anticuerpos.

### I. Efecto de anticuerpos monoclonales $\alpha$ -IL-2 y $\alpha$ -RIL-21 sobre la proliferación de células de CaCu CALO e INBL

Se cultivaron células de las líneas de CaCu CALO e INBL en presencia de 50 ng/mL de anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -IL-2 y  $\alpha$ -RIL-21. La proliferación celular se evaluó a las 48 horas utilizando la técnica de Cristal Violeta. Los datos obtenidos para las células de la línea CALO muestran una disminución de la proliferación de -13.48% en los cultivos en presencia de  $\alpha$ -IL-2 y de -13.85% en presencia de  $\alpha$ -RIL-21 (Figura 8).

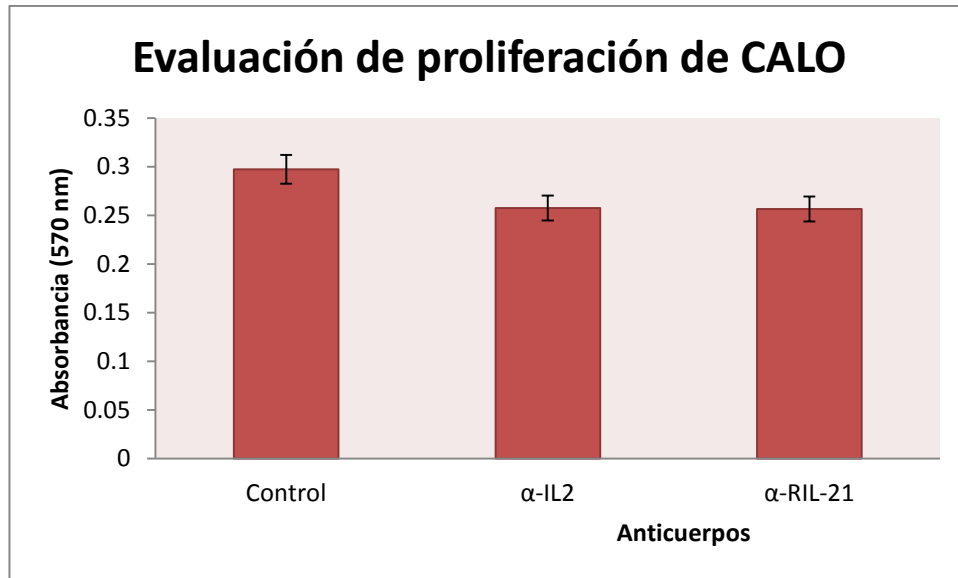


Figura 8. Proliferación de células de la línea de Carcinoma de Cérnix CALO cultivada durante 48 horas en presencia de anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -IL-2 y  $\alpha$ -RIL-21. La evaluación se realizó por la técnica de Cristal Violeta observando una disminución en la proliferación cuando las células son cultivadas en presencia de ambos anticuerpos. n= 6 ensayos realizados.

Mientras que, para la línea celular INBL observamos que los mismos anticuerpos producen un aumento de la proliferación. El incremento de la proliferación en presencia de ambos anticuerpos fue de +19.66% con  $\alpha$ -IL-2 y de +23.74% con  $\alpha$ -RIL-21 (Figura 9).

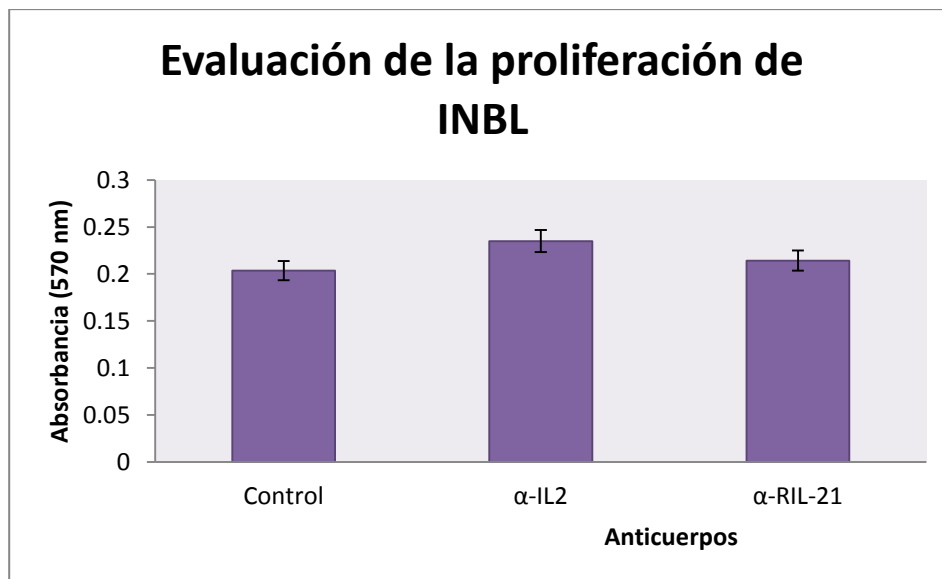


Figura 9. Proliferación de células de la línea de Carcinoma de Cérnix INBL cultivada durante 48 horas en presencia de anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -IL-2 y  $\alpha$ -RIL-21. La evaluación se realizó por la técnica de Cristal Violeta observando un aumento en la proliferación cuando las células son cultivadas en presencia de ambos anticuerpos. n= 6 ensayos realizados.

Con el propósito de comparar los datos de proliferación obtenidos en ambas líneas de CaCu se realizó una gráfica, incluyendo los datos de densidad óptica de las células al ser cultivadas en presencia de ambos anticuerpos. Al comparar las columnas se aprecia una clara inhibición de la proliferación de las células en la línea CALO cuando son cultivadas en presencia de los anticuerpos. Por su parte, las células de la línea INBL incrementan su proliferación en presencia de los anticuerpos (Figura 10).

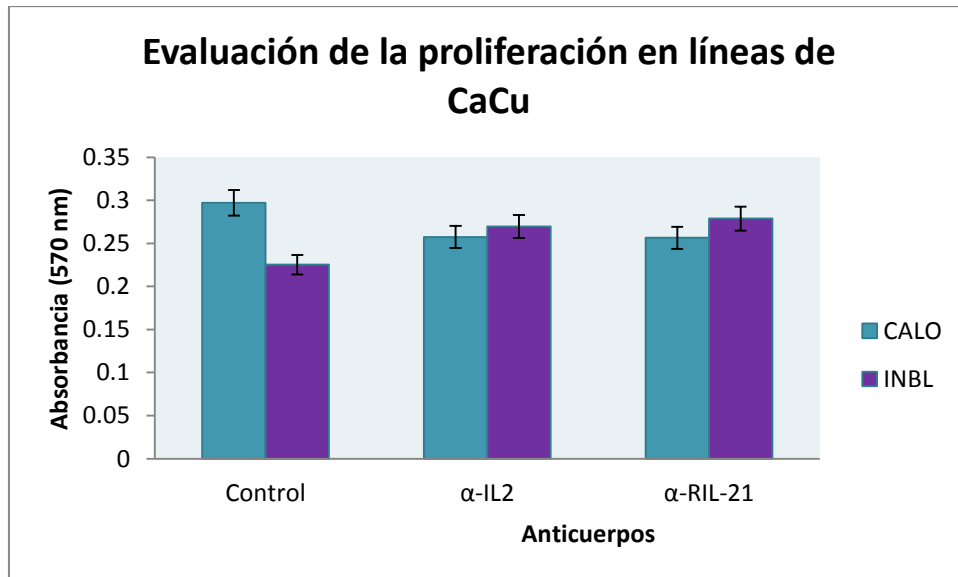


Figura 10. Comparación de Evaluación de la Proliferación Celular mediante Cristal Violeta en las líneas de Carcinoma de Cérvix CALO e INBL durante 48 horas cultivadas en presencia de los anticuerpos  $\alpha$ -IL-2 y  $\alpha$ -RIL-21. Se observa una inhibición en la proliferación para CALO, mientras que para INBL hay un aumento significativo. n=6 ensayos realizados.

Para tener un registro de la morfología de las células cultivadas en presencia de anticuerpos  $\alpha$ -IL-2 y  $\alpha$ -RIL-21, se tomaron Micrografías ópticas con cámara electrónica Leica. En las imágenes obtenidas para INBL puede observarse un mayor número de células, las cuales se encuentran agrupadas. En el caso de CALO, puede notarse menor número de células en comparación al control (Figura 11).

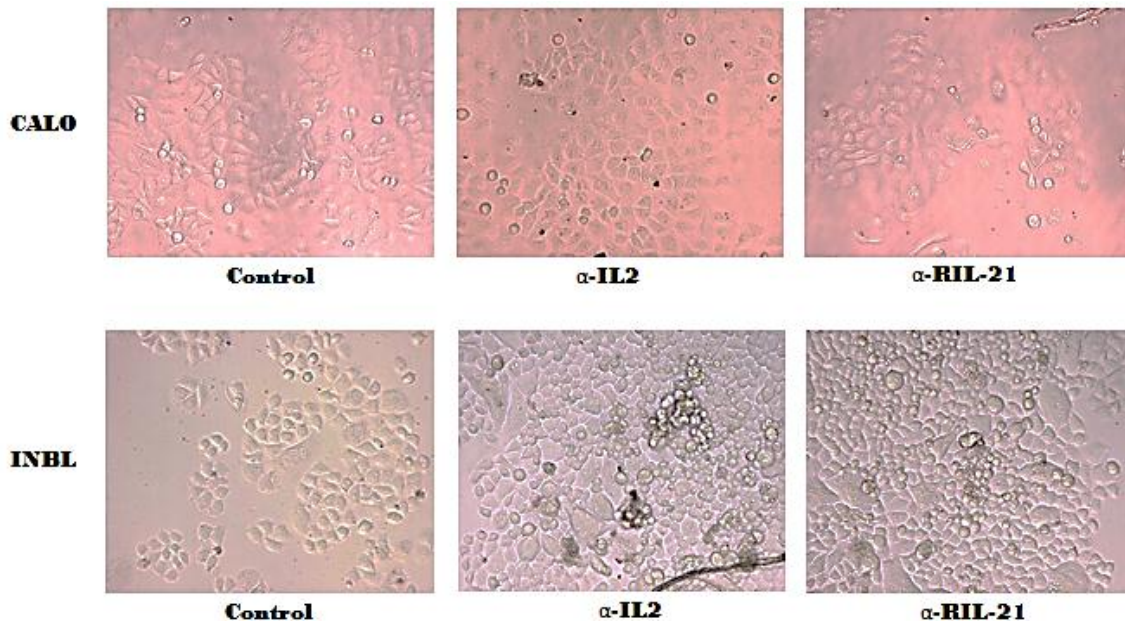


Figura 11. Micrografías ópticas (10X) de las líneas celulares de Carcinoma de Cérnix CALO e INBL, cultivadas durante 48 horas con  $\alpha$ -IL2 y  $\alpha$ -RIL-21. En INBL se observa un mayor número de células cuando son cultivadas en presencia de ambos anticuerpos, en contraste, CALO muestra menor número de células.

Una vez probados los anticuerpos cuyos antígenos se encuentran en la membrana externa de la célula se procedió a cultivar células de las líneas de CaCu, CALO e INBL, en presencia de los anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -Caspasa 3 y  $\alpha$ -Citoqueratina dirigidos contra antígenos intracelulares.

## II. Efecto de anticuerpos monoclonales $\alpha$ -Caspasa 3 y $\alpha$ -Citoqueratina sobre la proliferación de células de CaCu CALO e INBL

El cultivo de células de la línea CALO, en presencia de anticuerpos monoclonales cuyos antígenos se encuentran en el citoplasma ( $\alpha$ -Caspasa 3,  $\alpha$ -Citoqueratina) muestra un incremento en la proliferación celular en comparación al control. En el caso de  $\alpha$ -Caspasa 3 se observa un aumento de +11.49%, mientras que para  $\alpha$ -Citoqueratina es de +8.26% (Figura 12).

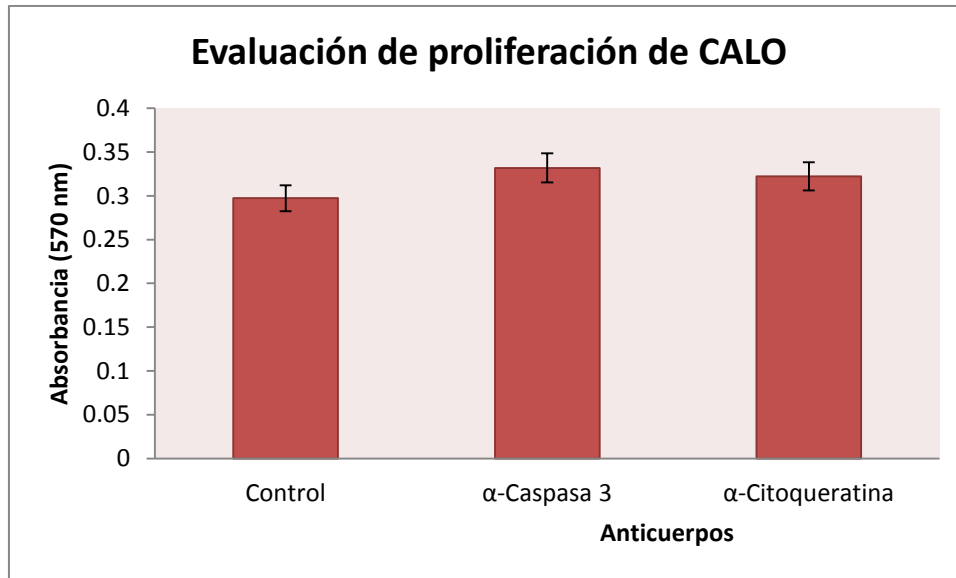


Figura 12. Proliferación de células de la línea de Carcinoma de Cérvix CALO cultivada durante 48 horas en presencia de anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -Caspasa 3 y  $\alpha$ -Citoqueratina. La evaluación se realizó por la técnica de Cristal Violeta observando un aumento en la proliferación cuando las células son cultivadas en presencia de ambos anticuerpos. n= 6 ensayos realizados.

Para el caso de las células de la línea INBL cultivada en presencia de los mismos anticuerpos se detecta una disminución de la proliferación de -11.11% con  $\alpha$ -Caspasa 3 y de -16.76% con  $\alpha$ -Citoqueratina (Figura 13).

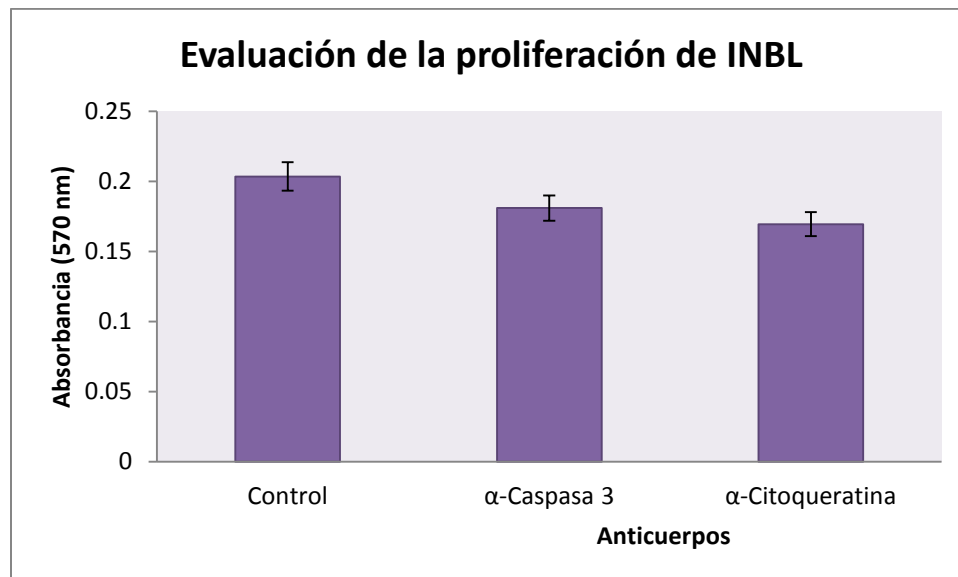


Figura 13. Proliferación de células de la línea de Carcinoma de Cérvix INBL cultivada durante 48 horas en presencia de anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -Caspasa 3 y  $\alpha$ -Citoqueratina. La evaluación se realizó por la técnica de Cristal Violeta observando una disminución en la proliferación cuando las células son cultivadas en presencia de ambos anticuerpos. n= 6 ensayos realizados.



Al hacer la comparación de las gráficas de proliferación entre las líneas de CaCu cultivadas en presencia de los anticuerpos utilizados,  $\alpha$ -Caspasa 3 y  $\alpha$ -Citoqueratina, es más evidente la proliferación para las células de la línea CALO que para los cultivos de (Figura 14).

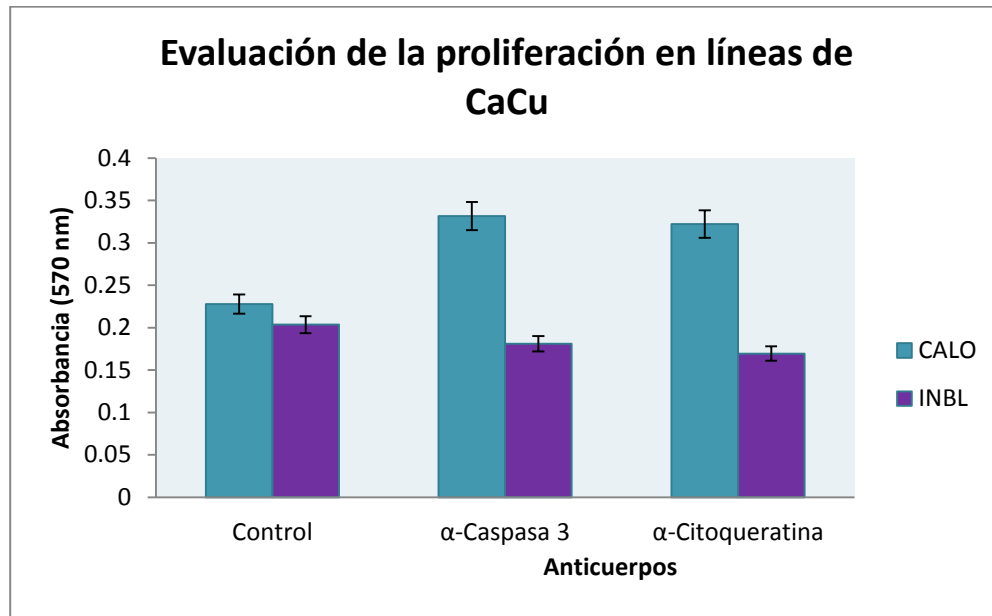


Figura 14. Comparación de Evaluación de la Proliferación Celular mediante Cristal Violeta en las líneas de Carcinoma de Cérvix CALO e INBL durante 48 horas cultivadas en presencia de los anticuerpos  $\alpha$ -Citoqueratina y  $\alpha$ -Caspasa 3. Se nota el aumento de la proliferación de CALO en presencia de los anticuerpos, en contraste, INBL muestra una inhibición de la misma. n= 6 ensayos realizados.

Las Micrografías ópticas (10X) muestran el registro de la morfología celular de ambas líneas celulares cultivadas con  $\alpha$ -Caspasa 3 y  $\alpha$ -Citoqueratina. Se puede observar una disminución en el número de células de la línea INBL, mientras que para la línea CALO hay un ligero aumento en el número de células presentes en el cultivo (Figura 15).

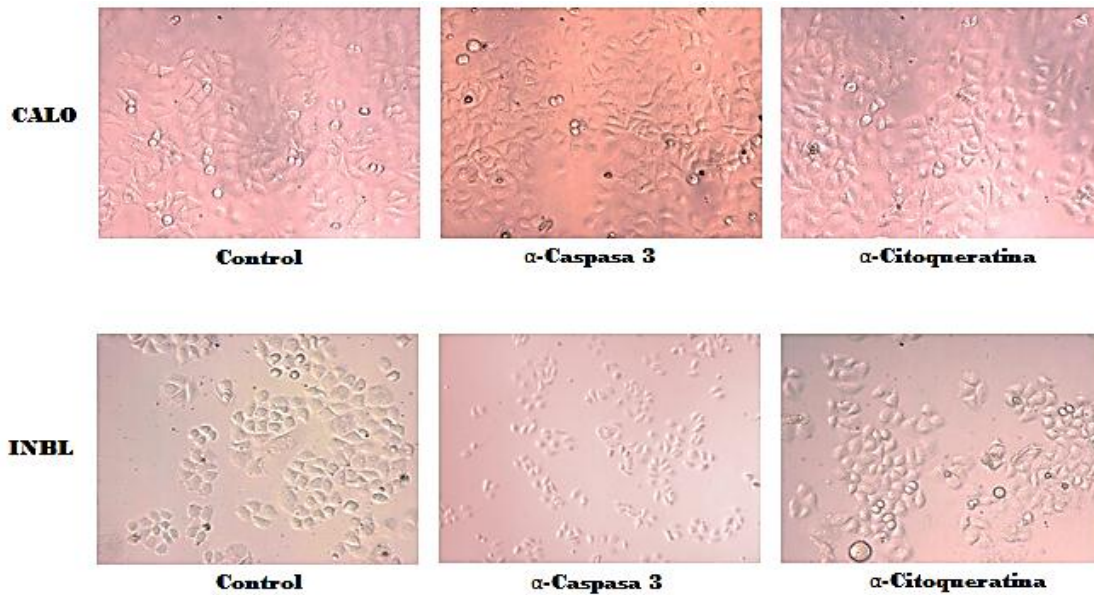


Figura 15. Micrografías ópticas (10X) de las líneas celulares de Carcinoma de Cérnix CALO e INBL. Se tomaron a las 48 horas de cultivo con anticuerpos hacia antígenos encontrados en el Citoplasma ( $\alpha$ -Caspasa 3,  $\alpha$ -Citoqueratina). Se percibe una disminución en el número celular en INBL, mientras que para CALO se muestra un aumento en el número de células presentes.

Posteriormente, se evaluó la proliferación celular con un anticuerpo irrelevante de isotipo IgG1 como control de anticuerpo. Esto con el fin de evaluar si la proliferación de las células de Carcinoma de Cérnix es regulada por los anticuerpos específicos, o bien, por cualquier IgG que se utilice.

### III. Evaluación de la proliferación celular con el anticuerpo $\alpha$ -IgG en las líneas celulares de CaCu CALO e INBL

Con el propósito de esclarecer si la regulación de la proliferación celular observada con anticuerpos  $\alpha$ -IL-2,  $\alpha$ -IL-21R,  $\alpha$ -Caspasa 3 y  $\alpha$ -Citoqueratina se debe a la unión específica de estos a su antígeno, o bien, es resultado de una activación a través de la unión inespecífica de la fracción Fc de los anticuerpos, a otras moléculas expresadas en la membrana de las células de CaCu, se decidió utilizar un anticuerpo irrelevante (es decir un anticuerpo sin antígeno blanco) del mismo isotipo que los anticuerpos utilizados, en este caso una IgG1.

Para ello, en una placa de 96 pozos se cultivaron  $3 \times 10^3$  células de las líneas de CaCu CALO e INBL en presencia de 50 ng/mL del anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -IgG. La evaluación de la proliferación celular se realizó a las 48 horas mediante la técnica de Cristal Violeta.

Al realizar la evaluación de la proliferación para la línea celular CALO se observa una significativa inhibición de la proliferación al compararla con las células control. La gráfica para INBL muestra un ligero aumento en la proliferación celular (Figura 16), sin embargo, al observar el cultivo de las mismas bajo el microscopio óptico, se distinguen modificaciones morfológicas en ellas, como una disminución del tamaño celular (Figura 17).

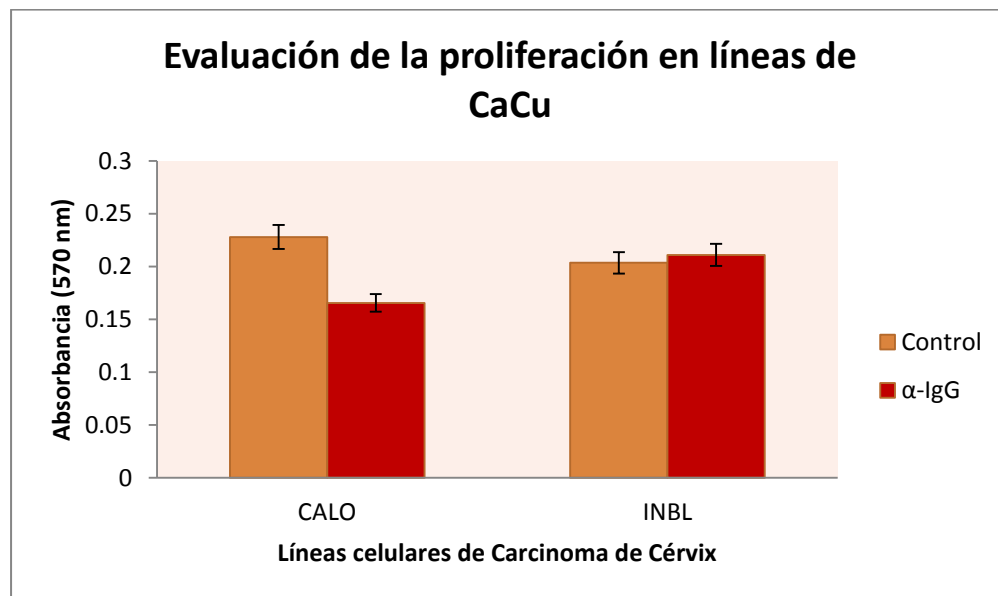


Figura 16. Proliferación de células de las líneas de Carcinoma de Cérvix CALO e INBL cultivadas durante 48 horas en presencia del anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -IgG. La evaluación se realizó por la técnica de Cristal Violeta. Para CALO hay una disminución significativa en la proliferación, mientras que para INBL se observa un aumento de la misma. n= 6 ensayos realizados.

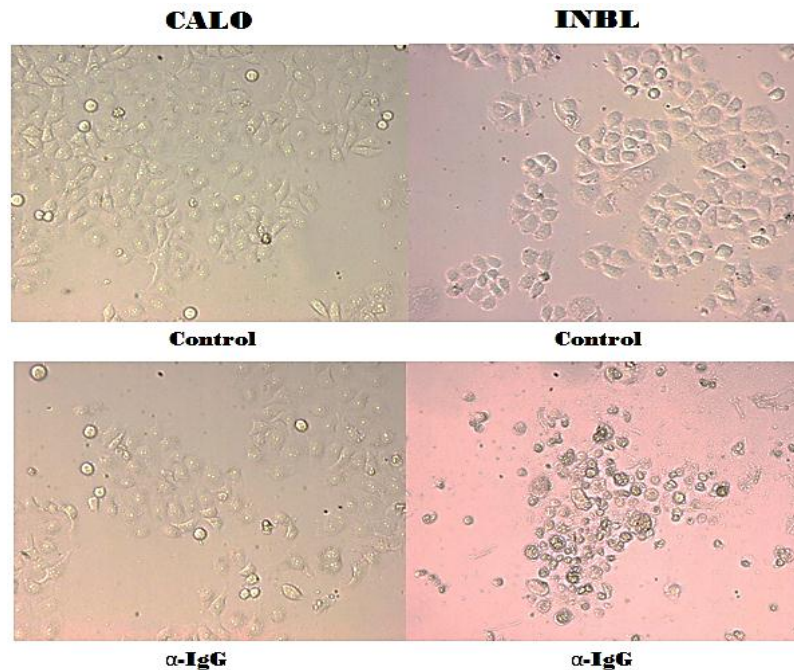


Figura 17. Micrografías ópticas (10X) de las líneas celulares de Carcinoma de Cérvix CALO e INBL. Se tomaron a las 48 horas de cultivo con el anticuerpo inespecífico  $\alpha$ -IgG. Puede observarse el cambio en la morfología de las células de INBL, mientras que para CALO, solo se observa menor número de células.

Con el propósito de saber qué fracción del anticuerpo es la que está produciendo el efecto proliferativo en las líneas de CaCu CALO e INBL, se procedió a la estandarización de las condiciones necesarias para la digestión de dichas moléculas con una enzima proteolítica. Al ser sometida a digestión proteolítica, esta molécula genera dos fracciones: la fracción Fab responsable de la unión con antígeno y la fracción Fc que determina diversas funciones biológicas en las diferentes Inmunoglobulinas. Posteriormente se realizará una prueba *in vitro* en presencia de las fracciones obtenidas.

#### IV. Estandarización de condiciones para fragmentar anticuerpos

Para establecer las condiciones óptimas para la digestión de los anticuerpos en sus fracciones Fc y Fab se empleó la enzima proteolítica Papaína. Se utilizó un anticuerpo monoclonal inespecífico ( $\alpha$ -IgG), además dicho anticuerpo se empleó como control para la digestión de los anticuerpos  $\alpha$ -IL-2 y  $\alpha$ -RIL-21.

Una vez hecha la digestión del anticuerpo  $\alpha$ -IgG y para comprobar que se obtuvieron dos fracciones del anticuerpo, se realizó un gel de poliacrilamida SDS-PAGE para el análisis de las fracciones obtenidas. Del lado izquierdo se observa la escalera de pesos moleculares, que corre de 200 a 20 kilodaltones (kDa), mientras que del lado derecho se observan las bandas obtenidas de la digestión con papaína (Figura 18a).

Para el análisis se utilizó el software “Doc-It Acquisition and Analysis” (Version 7.1RC3.54)<sup>(UVP, EUA)</sup>, con el cual se analizaron las bandas en el gel. La columna que se encuentra del lado izquierdo de la imagen identificada con la letra A, hace referencia a los pesos moleculares que nos ayuda a determinar el peso molecular de las bandas obtenidas de la digestión (Figura 18b). Asimismo, del lado derecho de la imagen se observan 4 bandas de proteínas que corresponden a los pesos moleculares de 50 (B1); 30 (B2); 25 (B3) y 15 (B4) Kilodaltones respectivamente. Las bandas proteicas B1 y B2 corresponden a los pesos moleculares de las fracciones del anticuerpo de 50 kDa para la fracción Fab y 30 kDa para la fracción Fc (Figura 18b).



Figura 18a. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE, Inmunoglobulina (IgG) digerida durante 27 horas. Fotografía obtenida del gel SDS-PAGE, del lado izquierdo se encuentra la escalera de pesos moleculares y del lado derecho los productos de digestión.

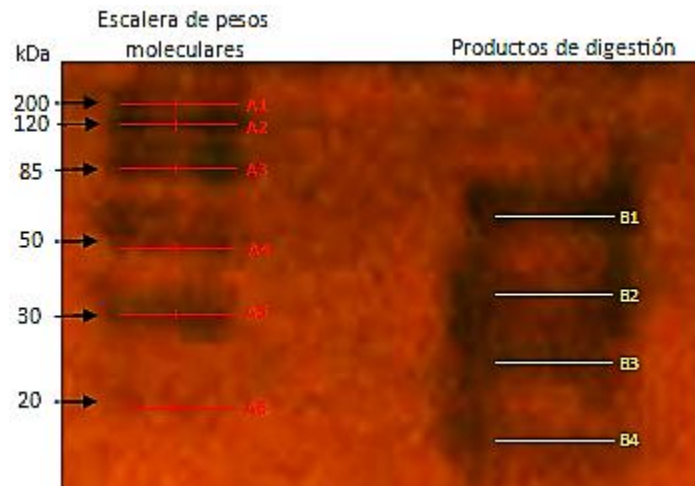


Figura 18b. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE, Inmunoglobulina (IgG) digerida durante 27 horas. Fotografía analizada con el software Doc-It Acquisition and Analysis (Version 7.1RC3.54)<sup>(UVP, EUA)</sup>. Las bandas B1 y B2 se encuentran en los pesos de 50 y 30 kDa respectivamente, lo que confirma la separación de la molécula de Inmunoglobulina.

Una vez confirmado mediante el gel de poliacrilamida que los anticuerpos efectivamente estaban digeridos y separados en sus dos fragmentos, se probaron *in vitro* por separado en cultivos de ambas líneas de Carcinoma de Cérvix. Esto para determinar qué fracción del anticuerpo es la que está provocando la respuesta proliferativa en las células de Carcinoma.

#### V. Prueba de proliferación con las fracciones Fab y Fc de los anticuerpos monoclonales $\alpha$ -IgG, $\alpha$ -IL-2 y $\alpha$ -RIL-21 sobre las líneas celulares de CaCu CALO e INBL

Al realizar el ensayo de proliferación a 24 horas con las fracciones de la Inmunoglobulina IgG, se observa de manera general, que tanto para la fracción Fc como para Fab, disminuye significativamente la proliferación de las células de Carcinoma de Cérvix cuando se hace la comparación con la Inmunoglobulina no digerida y el control. Particularmente se observa que las dos fracciones tienen el mismo efecto sobre las dos líneas de CaCu, en donde Fc disminuye más la proliferación que Fab (Figura 19).

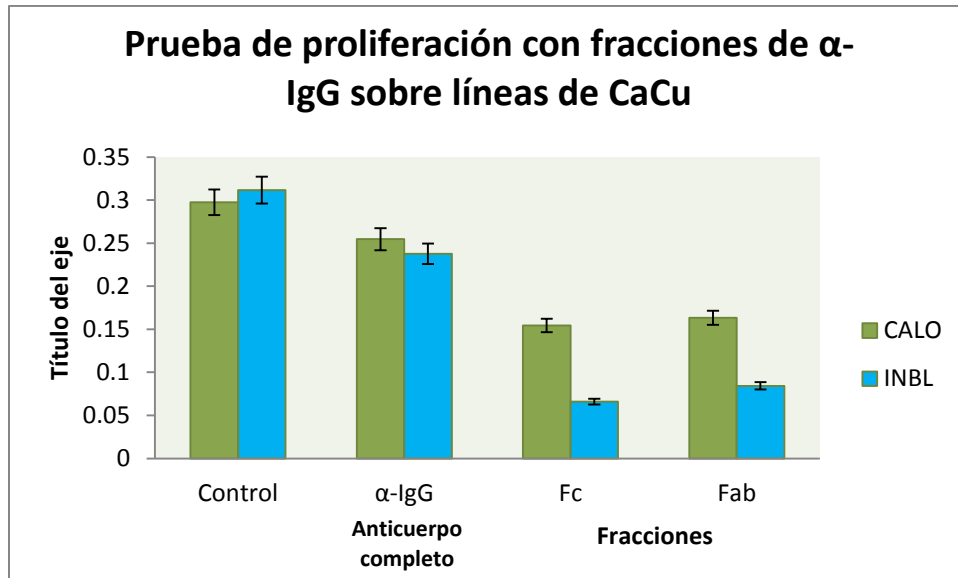


Figura 19. Prueba de las fracciones Fab y Fc de Inmunoglobulina (IgG) sobre las líneas de Carcinoma de Cérvix CALO e INBL a 24 horas. Para ambas fracciones se puede observar una disminución significativa de la proliferación cuando se compara con el anticuerpo completo y el control. n= 6 ensayos realizados.

Cuando la línea celular CALO es cultivada en presencia de los anticuerpos completos  $\alpha$ -IL-2 y  $\alpha$ -RIL-21 o fracciones (Fab y Fc) de ellos la proliferación es inhibida significativamente (Figura 20).

Para el caso de la línea INBL cultivada en presencia de los mismos anticuerpos completos se observa un aumento en la proliferación. Cabe destacar que cuando se cultivaron las células con las fracciones de los anticuerpos  $\alpha$ -IL-2 y  $\alpha$ -RIL-21 se observa en general una disminución de la proliferación, siendo mayor en presencia de la fracción Fc (Figura 20).

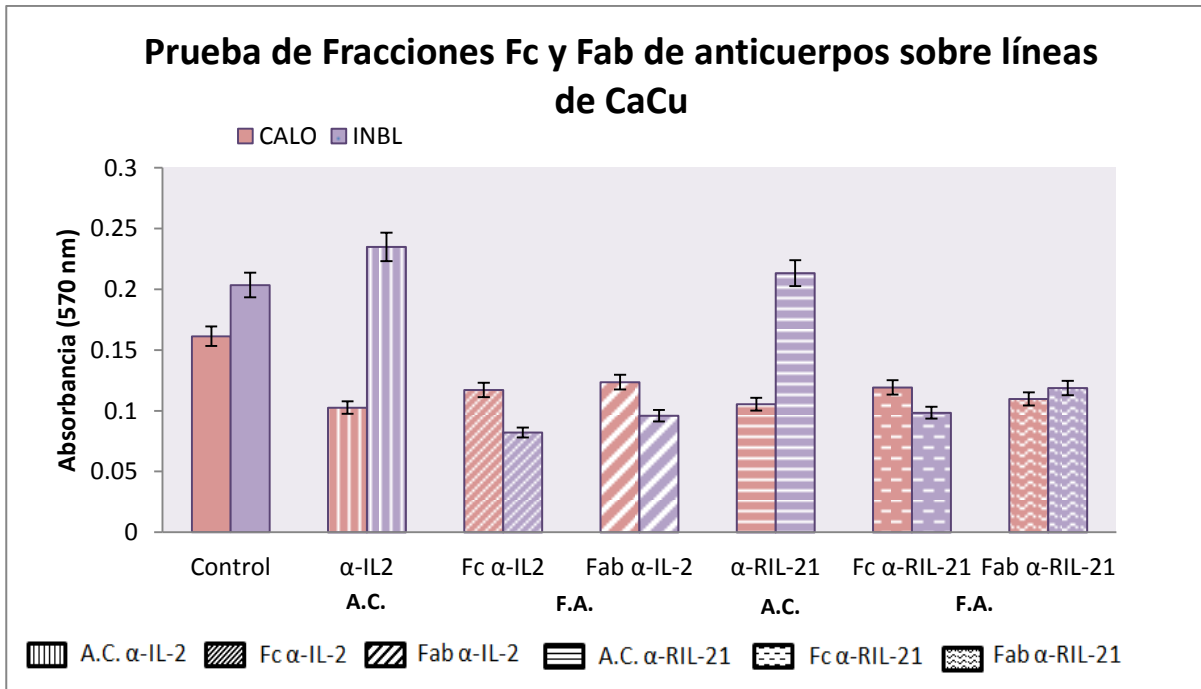


Figura 20. Prueba de las fracciones Fab y Fc de los anticuerpos  $\alpha$ -IL-2 y  $\alpha$ -RIL-21 sobre las líneas de Carcinoma de Cérvix CALO e INBL a 24 horas. Se observa una disminución significativa en ambas líneas de CaCu cuando son cultivadas en presencia de las fracciones de anticuerpos. n= 6 ensayos realizados. A.C.= anticuerpos completos. F.A.= fracciones de anticuerpos.



## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Actualmente el cáncer es un problema sanitario de primer orden a nivel mundial, lo que hace que múltiples investigaciones estén dirigidas hacia el estudio de esta enfermedad. Debido a los esfuerzos enfocados para combatir el cáncer ha habido un gran avance en su entendimiento y gracias a esto, se han desarrollado diferentes terapias para eliminar el padecimiento. Es sabido que las terapias usadas comúnmente como son la quimioterapia, radioterapia y cirugía tienen graves efectos secundarios sobre el paciente, no solo temporales si no que también pueden ser permanentes.

Por esta razón, en los últimos años, se han desarrollado terapias alternas, a las ya conocidas, que no sean agresivas hacia el paciente. La inmunoterapia ha tenido un gran avance en ese sentido ya que, es un tipo de tratamiento del cáncer que ayuda a estimular las defensas naturales del cuerpo para combatir la enfermedad también, puede brindar al paciente componentes del Sistema Inmune como son proteínas fabricadas del propio sistema, anticuerpos, para combatir a la enfermedad. Existen evidencias claras que algunas formas de inmunoterapia pueden tener éxito para ciertos tipos de cáncer.

La inmunoterapia es clasificada en activa y pasiva. La primera estimula el Sistema Inmune del propio paciente para favorecer una respuesta efectiva frente al tumor, es decir, usa la respuesta global del sistema para destruir al tumor. Mientras que la segunda controla del tumor mediante la administración de mediadores (anticuerpos, células) con capacidad de destrucción celular intrínseca e independiente de la situación del sistema inmune del paciente (Ruiz-Alonso *et al.*, 2004). La terapia con anticuerpos monoclonales es considerada como una forma de inmunoterapia pasiva que tiene como objetivo dirigir selectivamente el tratamiento antitumoral hacia antígenos específicos presentes en las células tumorales y pueden utilizarse de forma única o en combinación con otros agentes terapéuticos para aumentar su eficiencia, evitando así, tanto la exposición de las células normales al agente citotóxico como reducir los efectos secundarios que producen la mayoría de los fármacos quimioterapéuticos convencionales (Cajaraville y col., 2008). Este tipo de terapia ha reportado tener resultados positivos en cánceres como lo son

melanoma, colón, mama, leucemia, gástrico, entre muchos otros (Ruiz-Alonso *et al.*, 2004).

Algunos anticuerpos monoclonales (mAb) estimulan una reacción inmunitaria que destruye células cancerosas de una forma semejante a los anticuerpos producidos naturalmente por los linfocitos B, estos anticuerpos monoclonales opsonizan las células cancerosas, lo que desencadena su destrucción por el Sistema Inmune. Otro tipo de anticuerpos interfieren con la acción de las proteínas que son necesarias para el crecimiento tumoral, al bloquear los receptores para desencadenar la señalización, un ejemplo de estos es el bevacizumab que impide el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos del tumor. Existe un grupo diferente de anticuerpos conocidos como inmunoconjugados, los cuales consisten de un anticuerpo adherido a una sustancia que destruye células, como una toxina de plantas o de bacterias, un fármaco de quimioterapia o una molécula radiactiva (NCI, 2013).

La FDA ha aprobado el uso de diferentes mAb para el tratamiento del cáncer, como el rituximab (linfoma no Hodgkin), el alemtuzumab (leucemia linfocítica crónica), el <sup>90</sup>Y ibritumomab tiuxetán (linfoma no Hodgkin) y el ado-trastuzumab emtansina (cáncer de mama), entre otros (NCI, 2013).

A pesar de lo antes mencionado, no se tienen reportes específicos de cómo los anticuerpos monoclonales están siendo utilizados por células de Carcinoma de Cérvix. Por esta razón, el Laboratorio de Oncología Celular de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC), ha realizado diversos estudios para esclarecer dicha evasión y proporcionar información a cerca de la biología del Carcinoma de Cérvix. Los datos aquí mostrados revelan que hay una proliferación diferencial de estas células tumorales cuando son cultivadas en presencia de anticuerpos dirigidos contra antígenos membranales o antígenos intracelulares.

En particular nuestro equipo de trabajo plantea la hipótesis de que la interacción de la porción Fc de las IgG's con el receptor FcγRI está relacionada con la proliferación celular a

través de varios mecanismos moleculares que no se han descrito detalladamente para células de CaCu.

Los datos obtenidos para la línea celular INBL (estadio IVB metastásico), en la que se observa una mayor proliferación en presencia de anticuerpos dirigidos contra antígenos membranales y una disminución, de la misma, al utilizar anticuerpos contra antígenos intracelulares, apoyan la teoría de que las células de Carcinoma de Cérvix pueden estar expresando receptores FcR que serían utilizados para regular su proliferación.

Los receptores Fc (FcR) ayudan al procesamiento de antígenos y maduración mediada por el complejo inmune de células dendríticas, activación de células B, citotoxicidad celular mediada por anticuerpos, endocitosis y fagocitosis del complejo inmune y producción de citocinas (Qin *et al.*, 2004; Nimmerjahn y Ravetch, 2008). No solo controlan la activación del Sistema Inmune Innato, sino también están involucrados en la producción y especificidad de otros ligandos inmunes (anticuerpos) (Nimmerjahn y Ravetch, 2008).

Se tienen identificadas 3 familias de los receptores Fc: FcγR, FcαR y FcεR; siendo FcγR la que cuenta con más isotipos (FcγRIa, FcγRIb, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa, FcγRIIIb). Cabe destacar que FcγRIIb es el único miembro de la familia que presenta una región inhibitorio ITIM, mientras que los demás miembros presentan una región ITAM de activación.

Los FcγR tienen participación en la activación de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y comparten mecanismos similares de transducción de señales con las células monocíticas: la agrupación de los FcγR induce a la fosforilación inmediata de las tirosinas de ITAM que sirve como sitio de unión para los dominios SH2 de la tirosina cinasa Syk. La unión de Syk con ITAM conduce a la activación catalítica de Syk promoviendo la fosforilación de segundos mensajeros en la cascada de señalización de FcγR (Halla-Calleros *et al.*, 2005).

Por lo antes mencionado, proponemos que la respuesta de proliferación diferencial presentada por las células de Carcinoma de Cérvix en presencia de anticuerpos dirigidos

contra antígenos membranales ( $\alpha$ -IL-2 y  $\alpha$ -RIL-21), se debe a que la fracción Fc de las Inmunoglobulinas regula la proliferación de las células de CaCu. En donde el mecanismo utilizado por la célula tumoral para proliferar, sería el de endocitar IgGs existentes (producidas como una respuesta de rechazo tumoral) para crecer a expensas de las moléculas sintetizadas por una respuesta inmunológica antitumoral.

Esto es un mecanismo molecular similar al activado en macrófagos, en el que, al identificar un patógeno recubierto con anticuerpos, el macrófago lo endocita por la unión de la región Fc del anticuerpo a los receptores Fc ubicados en la superficie celular del macrófago y de esta manera eliminar el agente patógeno. Pensamos que los anticuerpos  $\alpha$ -IL-2 y  $\alpha$ -RIL-21, usados en los experimentos *in vitro*, también se unen al receptor Fc expresado por células de CaCu (particularmente por INBL), siendo endocitados al unirse al receptor Fc, desencadenando la señalización de proliferación celular a través de Syk que conducirá a la transcripción de genes de proliferación celular (Halla-Calleros *et al.*, 2005).

Además, la unión entrecruzada de un complejo inmune con el receptor Fc $\gamma$ RI produce tanto la proliferación de células tumorales (cáncer de mama ductal) como la producción de mucina con el antígeno polivalente sialil-Tn (mucina-sTn). Asimismo, existe una unión entrecruzada entre el complejo inmunológico y el Fc $\gamma$ RI, lo cual resulta en la activación de la vía transduccional de tirosina cinasa, esta activación ha sido asociada con la proliferación tumoral (Nelson *et al.*, 2001).

Por su parte, cuando se usaron los anticuerpos dirigidos contra antígenos intracelulares observamos una inhibición de la proliferación que nos indica que éstos anticuerpos no se están uniendo a su receptor específico, debido a que se necesitaría permeabilizar la membrana celular para que los anticuerpos penetren al citoplasma y así unirse a su antígeno específico. Esto quiere decir que las células de CaCu solo son inducidas a proliferar con anticuerpos unidos a su blanco extracelular, lo que permite que la fracción Fc de anticuerpo quede expuesta, lo cual no sucede con anticuerpos libres que por estar en forma libre son eliminados con los lavados. Estos datos proporcionan apoyando la hipótesis de que las células de CaCu presentan FcR.

Es importante que en trabajos futuros se determine qué clase de FcR expresan las células de éste tipo de tumor para poder describir claramente el mecanismo molecular que la interacción antígeno-anticuerpo activa en este modelo tumoral y conduce así a la proliferación.

Por otro lado, cuando se realizaron las pruebas de proliferación en la línea de CaCu CALO con el anticuerpo  $\alpha$ -IgG se obtuvo una disminución significativa en la proliferación sin mostrar cambios morfológicos celulares, mientras que INBL si tuvo cambios morfológicos. Destacando que para la línea CALO la IgG actúa como un bloqueador de la proliferación, a diferencia de INBL en donde hay una inhibición de la proliferación. Sin embargo, se observa un cambio morfológico en citoplasma de la células que culmina con la muerte celular.

Al respecto, Nelson *et al.* (2001) afirman que la IgG monomérica puede inhibir la proliferación de células cancerígenas debido a la unión entrecruzada de antígeno-anticuerpo. Además, dicho entrecruzamiento puede estar relacionado con la cantidad de anticuerpo; lo que sugiere la posible existencia de un mecanismo de retroalimentación en el cual, la concentración y el tipo de elemento presente (antígeno tumoral y anticuerpo antitumoral) puede determinar la promoción o inhibición del crecimiento tumoral.

Partiendo de la idea que la célula tumoral produce una molécula de manera soluble y esta se une al receptor Fc $\gamma$ RI, Rangel-Corona *et al.* (2010) reportaron que las células de CaCu CALO e INBL producen IL-2, la cual es un promotor de la proliferación de las células de Carcinoma de Cérnix. Se puede inferir que al agregar  $\alpha$ -IL2 al medio tumoral, este se une a la IL-2 exógena producida por las células tumorales, formando complejos inmunológicos y uniéndose así al Fc $\gamma$ RI, de esta forma activando la vía de transducción tirosina cinasa.

En ese sentido, Soto-Cruz *et al.* (2008) reportaron para las mismas líneas de CaCu la regulación de proteínas asociadas a vía de transducción para HER-2, y Cáceres-Cortés *et al.* (2001) menciona que IL-2 regula la expresión de c-KIT y su ligando el factor Steel en estas mismas líneas de CaCu. Las moléculas antes mencionadas son citadas en la literatura

como posibles activadores de señales para inducir la proliferación celular, por lo tanto, pueden estar asociadas al desarrollo del CaCu. Lo cual apoya la idea de que se necesita la activación de la vía de transducción tirosina cinasa para inducir la proliferación de células tumorales CALO e INBL.

La expresión de estos receptores Fc en las células de CaCu puede servirles como mecanismo de escape inmunológico antitumoral. Diversos autores (Takai, 2002; Qin *et al.*, 2004; Parham, 2005, Cassard *et al.*, 2006, Abbas y col., 2008, Nimmerjahn y Ravetch, 2008, Mora y Rosales, 2009, Hogarth y Piertesz, 2012) mencionan que los Fc son expresados por casi todas las células del Sistema Inmune como son los macrófagos, linfocitos, plaquetas, granulocitos; así como por ciertos epitelios transportadores (placenta, hígado, intestino neonatal) y a través de este receptor, las células inmunológicas despiertan la respuesta inmune contra diferentes antígenos.

La digestión proteolítica de los anticuerpos revela información importante para determinar la estructura y función de una molécula de anticuerpo. Los anticuerpos pueden ser divididos en sus porciones Fab y Fc y cada una con actividad distinta (Ertürk *et al.*, 2011). Clásicamente, las Inmunoglobulinas son fragmentadas utilizando papaína, la cual escinde los enlaces de cisteína de la porción Fab dando como resultado la obtención de las fracciones Fab y Fc.

En nuestro caso, se realizó la digestión de los anticuerpos  $\alpha$ -IL-2,  $\alpha$ -RIL-21 y  $\alpha$ -IgG; su fragmentación se corroboró con un gel de poliacrilamida SDS-PAGE para visualizar las proteínas fragmentadas. Las bandas observadas en el gel confirmaron la correcta fragmentación del anticuerpo, ya que, de acuerdo con Andrew y Titus (1997), las bandas proteicas de las fracciones del anticuerpo están en los pesos moleculares distintos: 50 kDa para la fracción Fab y 27 kDa para la fracción Fc. Por otro lado, podemos saber que la digestión fue completa ya que no se observan bandas de 150 o 120 kDa, las cuales corresponden al peso molecular promedio de una Inmunoglobulina completa.

La respuesta de proliferación diferencial observado en los cultivos para las células CALO e INBL en presencia de los fragmentos Fc o Fab indica que las células responden a los fragmentos de anticuerpos dependiendo del estadio de tumor del cual provienen. De esta manera, los tumores de estadio temprano no responden a anticuerpos fragmentados mientras que las células provenientes de tumores en estadios avanzados serían más susceptibles a morir por fragmentos de anticuerpos. Al respecto Nelson *et al.* en 2001 demostraron que el fragmento Fc puede inhibir la inducción a la proliferación de células de cáncer de mama, a causa de la unión cruzada de antígeno-anticuerpo (es decir, un anticuerpo reacciona con antígenos que son similares, pero diferentes, a los antígenos específicos con los cuales reaccionan originalmente) (Anderson *et al.*, 2009). El que los anticuerpos  $\alpha$ -IL2 y  $\alpha$ -RIL-21 fragmentados promuevan la muerte o ningún cambio en la proliferación de las células tumorales indican que el fragmento Fc del anticuerpo completo es el responsable de regular la proliferación de las células de CaCu.

Por lo antes mencionado, se puede afirmar que se ha montado una vigilancia y selección inmunológica, es decir, que los tumores no son blancos pasivos para la intervención inmunológica y además son capaces de tanto escapar como de desensamblar al Sistema Inmune. Las células tumorales no son ignoradas por el Sistema Inmune, sin embargo, muchos de los antígenos asociados al tumor hasta ahora identificados son antígenos propios los cuales están sobre-expresados o presentan alteraciones post-transcripcionales. El tumor *per se* puede producir citocinas, entre ellas se pueden mencionar las siguientes: la familia de ligandos de TNF; FasL; TGF- $\beta$ ; IL-10; ZIP (proteína inhibidora asociada a la cadena  $\zeta$ ), prostaglandina E2; epinefrina; MRO, gangliósidos asociados a tumor y algunos productos virales entre otros. En los pacientes con cáncer se pueden encontrar en circulación citocinas inflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- $\gamma$  que reflejan un estado de activación crónico probablemente inducido por la circulación de AAT o complejos antígeno-anticuerpo en sangre (Rangel-Corona, 2003). Las células de Carcinoma de Cérnix están expresando a los receptores Fc como un escape al Sistema Inmune, ya que de esta forma, los anticuerpos se unen al receptor y los utilizan para su propio beneficio, es decir, para proliferar y no para desencadenar la respuesta inmune.

Finalmente es importante mencionar que la terapia con anticuerpos monoclonales debe de aplicarse después de haber identificado sí el cáncer a tratar expresa los receptores Fc (FcR), debido a que los datos aquí mostrados concluyen que, dependiendo del estadio y el tipo de anticuerpo utilizado, las células de CaCu usan los anticuerpos para desencadenar la señalización de proliferación en vez de realizar la función principal de eliminar a las células tumorales.



**CONCLUSIONES**

- Σ Los anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -Caspasa 3 y  $\alpha$ -Citoqueratina inducen proliferación de células de CaCu CALO.
- Σ Los anticuerpos  $\alpha$ -IL2 y  $\alpha$ -RIL-21 disminuyen la proliferación de células de CaCu CALO.
- Σ En la línea de CaCu INBL hay una mayor proliferación celular en presencia de los anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -IL2 y  $\alpha$ -RIL-21.
- Σ En la línea de CaCu INBL disminuye la proliferación en presencia de los anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -Caspasa 3 y  $\alpha$ -Citoqueratina.
- Σ En ambas líneas celulares de CaCu hay una disminución en la proliferación cuando es cultivada con  $\alpha$ -IgG.
- Σ Se establecieron las condiciones necesarias para realizar la digestión de anticuerpos con la enzima Papaína.
- Σ Las fracciones Fab y Fc de los anticuerpos  $\alpha$ -IL2,  $\alpha$ -RIL-21 y  $\alpha$ -IgG inhiben la proliferación celular de la línea de CaCu INBL.
- Σ En la línea de CaCu CALO la proliferación no es regulada diferencialmente en presencia de las fracciones Fab y Fc de los anticuerpos  $\alpha$ -IL2 y  $\alpha$ -RIL-21, mientras que hay una inhibición de la proliferación celular con las fracciones de  $\alpha$ -IgG.

**PERSPECTIVAS**

Para complementar el presente trabajo, sería interesante continuar con las siguientes propuestas:

- Σ Determinar mediante la técnica de Citometría de Flujo la presencia de la familia de receptores FcγR.
- Σ Analizar la transcripción del RNAm del complejo ITAM.
- Σ Determinar por Citometría de Flujo la presencia de la proteína ITAM funcional.
- Σ Determinar la presencia de la cinasa Syk.

## Bibliografía

- ⊕ Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S. (2008). Inmunología celular y molecular. Sexta Edición. Editorial Saunders Elsevier. México.
- ⊕ Alonso de Ruiz, P., Lazcano-Ponce, E., Hernández-Ávila, M. (2000). Cáncer Cervicouterino: Diagnostico, Prevención y Control. Editorial Médica Panamericana. México.
- ⊕ American Cancer Society (ACS). What is Immunotherapy? [en línea]. 2 de Febrero del 2013 [24 de Septiembre del 2013]. Disponible en: <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/immunotherapy/immunotherapy-what-is-immunotherapy>
- ⊕ Anderson, K., Anderson, L., Glanze, W. (2009). Mosby's Medical Dictionary. Quinta Edición. Editorial Elsevier. Estados Unidos de América.
- ⊕ Andrew, S. M., Titus, J. A. (1997). Fragmentation of Immunoglobulin G. Current Protocols in Immunology. 21:2.8.1–2.8.10.
- ⊕ Álvarez-López, M.R., López-Álvarez, M.R., Muro-Amador, M. (2004). Rinitis Alérgica: Mecanismos y Tratamiento. Mra Editores. Barcelona, España.
- ⊕ Cáceres-Cortés, J., R., Alvarado-Moreno, J., A., Waga, K., Rangel-Corona, R., Monroy-García, A., Rocha-Zavaleta, L., Urdiales-Ramos, J., Weiss-Steider, B., Haman, A., Hugo, P., Brousseau, R., Hoang, T. (2001). Implication of Tyrosine Kinase Receptor and Steel Factor in Cell Density-dependent Growth in Cervical Cancers and Leukemias. Cancer Research, 61: 6281-6289.
- ⊕ Cajaraville, G., Carreras, M. J., Massó, J., Tamés, M.J. (2008). Farmacia Hospitalaria. Tercera Edición. Fundación Española de Farmacia Hospitalaria. p.p. 1183-1185.
- ⊕ Cassard, L., Cohen-Solal, J., Camilleri-Broët, S, Fournier, E., Fridman, Wolf, H, Sautès-Fridman, C. (2006). Fc gamma receptors and cancer. Springer Seminars in Immunopathology, 28: 321–328.
- ⊕ D-zul-Rosado, K., Puerto-Solís, M., González-Losa, M. (2004). Cáncer cervicouterino: métodos actuales para su detección. Revista Biomédica, 15: 233-241.

- ⊕ Ertürk, G., Bereli, N., Uzun, L., Tümer, M. A. (2001). Affinity Separation and Characterization of IgG Subfragments by Fast Protein Liquid Chromatography with HiTrap\_r Protein A Column. *Journal of Biology & Chemistry*, 39(2): 133–138.
- ⊕ Gómez-Medellín, L., M., Cañas-Cali, C., Anaya-Medellín, J., M. (2005). Receptores Fcγ y autoinmunidad. *Acta Medica Colombiana*, 30: 27-35.
- ⊕ Hallal-Calleros, C., Agramonte-Hevia, J., Garay-Canales, C., Oliver, J., Guerra-Araiza, C., Heras, D., Camacho-Arroyo, I., Soto-Cruz, I., Ortega, E. (2005). Syk and Lyn phosphorylation induced by FcγRI and FcγRII crosslinking is determined by the differentiation state of U-937 monocytic cells. *Immunology Letters*, 99: 169-179.
- ⊕ Hogarth, M., Pietersz, G. (2012). Fc receptor-targeted therapies for the treatment of Inflammation, Cancer and beyond. *Drug Discovery*, 11: 311-331.
- ⊕ Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Estadísticas a propósito del Día Mundial contra el Cáncer [en línea]. Febrero, 2013 [10 de julio de 2013]. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2013/cancer0.doc>
- ⊕ Koolman, J., Roehm, K. (2005). *Color Atlas of Biochemistry*. Second Edition. Thieme Editions. Estados Unidos de América.
- ⊕ Lewis, M. (2004). Análisis de la situación del Cáncer Cérvicouterino en América Latina y el Caribe. OPS. Estados Unidos de América.
- ⊕ López-Saavedra, A., Lizano-Soberón, M. (2006). Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología*, 1: 31-55.
- ⊕ Martínez-Hernández, J.C. (2004). Calor de Adsorción y estudios de la actividad catalítica de una enzima sulhídrica sobre SiOH<sub>2</sub> mesoporoso con alta área específica. UAM-I. p.p. 16.
- ⊕ Mora, N., Rosales, C. (2009). Funciones de receptores Fc en mecanismos de defensa y regulación inmunológica. *Revista de Investigación Clínica*, 61 (4): 313-326.

- ⊕ Murphy, K., Travers, P., Walport, M. (2008). *Inmunología de Janeway*. Séptima Edición. McGraw-Hill Interamericana Editores. México.
- ⊕ National Care Institute (NCI). ¿Qué es el cáncer? [en línea]. Febrero, 2013 [10 de Julio de 2013]. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>.
- ⊕ National Care Institute (NCI). Terapias biológicas para el cáncer [en línea]. 12 de junio de 2013 [24 de Septiembre de 2013]. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/recursos/hojas-informativas/tratamiento/terapias-biologicas-respuestas>
- ⊕ Nelson, M. B., Nythus, J. K., Oravec-Wilson, I., Barbera-Guillem, E. (2001). Tumor Cells Express FcγRI which contributes to Tumor Cell Growth and a Metastatic Phenotype. *Neoplasia*, 3(2): 115-124.
- ⊕ Nimmerjahn, F., Ravetch, J. (2007). Antibodies, Fc receptors and cancer. *Current Opinion in Immunology*, 19: 239-245.
- ⊕ Nimmerjahn, F., Ravetch, J. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews, Immunology*, 8: 34-47.
- ⊕ Organización Mundial de la Salud (OMS). (2011). Global status report on noncommunicable diseases 2010. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Italia.
- ⊕ Organización Mundial de la Salud. Cáncer (OMS) [en línea]. Febrero, 2014 [17 de Abril de 2014]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- ⊕ Parham, P. (2005). *Inmunología*. Segunda Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- ⊕ Passarge, E. (2004). *Genética: Texto y Atlas*. Segunda Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- ⊕ Qin, H., Edberg, J. C., Gibson, A. W., Page, G.P., Teng, L., Kimberly, R.P. (2004). Differential Gene Expression Modulated by the Cytoplasmic Domain of FcγRIa (CD64) α-Chain. *The Journal of Immunology*, 173: 6211–6219.

- ⊕ Rangel-Corona, R. (2003). Inmunoterapia del Cáncer. VERTIENTES Revista Especializada en Ciencias de la Salud, 6(1): 58-62.
- ⊕ Rangel-Corona, R., Corona-Ortega, T., Soto-Cruz, I., López-Labra, A., Pablo-Arcos, T., Torres-Guarneros, C., Weiss-Steider, B. (2010). Evidence that cervical cancer cells secrete IL-2, which becomes an autocrine growth factor. Cytokine, 50: 273-277.
- ⊕ Roitt, I., Delves, P., Martin, S., Burton, D. (2006). Inmunología. 11° Edición. Editorial Panamericana. España.
- ⊕ Ruiz-Alonso, A., Rodríguez-Gallego, J. C., Sáez-Bravo, L., Lara-Jiménez, P. (2004). Hormonoterapia e Inmunoterapia del Cáncer. BioCancer Research Journal, 1: 1-14.
- ⊕ Sáez-Bravo, M., L., Falcón-Vizcaíno, O., Pinar-Sedeño, B., Lara-Jiménez, P., C. (2004). Cáncer de Cérvix. BioCancer Research Journal, Volumen 1.
- ⊕ Serrano-Hernández, A. (2009). Células colaboradoras (TH1, TH2, TH17) y reguladoras (Treg, TH3, NKT) en la artritis reumatoide. Reumatología Clínica, 5(S1): 1-5.
- ⊕ Soler-Gómez, M., D., Garcés-Honrubia, V., Zorrilla-Ayllón, I. (2007). Cáncer y cuidados enfermeros. Ediciones Difusión Avances de Enfermería. Madrid, España.
- ⊕ Soto-Cruz, I., Rangel-Corona, R., Valle-Mendiola, A., Moreno-Morales, X., Santiago-Pérez, R., Weiss-Steider, W., Cáceres-Cortés, J. (2008). The thyrophostin B42 inhibits cell proliferation and HER-2 autophosphorylation in cervical carcinoma cell lines. Cancer Investigation, 26: 136-144.
- ⊕ Takai, T. (2002). Roles of Fc Receptors in Autoimmunity. Nature, 2: 580-592.
- ⊕ Takai, T. (2005). Fc Receptors and Their Role in Immune Regulation and Autoimmunity. Journal of Clinical Immunology, 25 (1): 1-18.
- ⊕ Tortora, G., J., Funke, B. R., Case, C. (2007). Introducción a la Microbiología. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina.
- ⊕ Vidal-Gómez, J. (2006). Psicoimmunología. Publicacions, Edicions de la Universitat de Barcelona.

## APÉNDICE I

### Reactivos y Soluciones utilizados

#### Soluciones para cultivo

- ∞ RPMI-1640.
- ∞ Suero Fetal Bovino (SFB).
- ∞ Solución fisiológica de Verseno.
- ∞ Solución de Fosfatos (PBS).

#### Reactivos para la Evaluación Celular

- ∞ Glutaraldehído al 1.1%.
- ∞ PBS.
- ∞ Cristal Violeta al 0.1% 200mM pH 3.5.
- ∞ Ácido Acético al 10%.

#### Reactivos y soluciones para la Digestión de Anticuerpos

- ∞ Papaína látex.
- ∞ Cisteína.
- ∞ Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).
- ∞ PBS.
- ∞ Yodoacetamida.

#### Reactivos y soluciones para el Gel de Poliacrilamida SDS-PAGE

- ∞ Buffer de Laemli.
- ∞ DTT.
- ∞ Acrilamida.
- ∞ Bis-acrilamida.
- ∞ TRIS 3 M pH 8.8.
- ∞ SDS 10%.
- ∞ Persulfato de amonio 1.5%.
- ∞ TEMED.
- ∞ TRIS 1 M pH 6.8.

#### Reactivos para tinción con Azul de Coomasie 0.1%

- ∞ Metanol 50%.
- ∞ Ácido acético 7%.
- ∞ Agua destilada 43%.
- ∞ Azul de Coomasie 0.1%.

## APÉNDICE II

### Preparación de Reactivos y Soluciones

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

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

#### *Solución fisiológica de Verseno*

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

- ∞ TRIS base 3.04 g (Sigma Chemical Co., E.U.A.).
- ∞ Cloruro de sodio 8.00 g (Sigma Chemical Co., E.U.A.).
- ∞ Cloruro de potasio 0.04 g (Sigma Chemical Co., E.U.A.).
- ∞ Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.40 g (Sigma Chemical Co., E.U.A.).

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

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

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

- ∞ Cloruro de magnesio 0.10 g (Sigma Chemical Co., E.U.A.).
- ∞ Cloruro de calcio 0.10 g (Sigma Chemical Co., E.U.A.).
- ∞ Cloruro de sodio 8.00 g (Sigma Chemical Co., E.U.A.).
- ∞ Cloruro de potasio 0.20 g (Sigma Chemical Co., E.U.A.).
- ∞ Fosfato monoácido de sodio 2.16 g (Sigma Chemical Co., E.U.A.).
- ∞ Fosfato diácido de potasio 0.20 g (Sigma Chemical Co., E.U.A.).



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

#### *Solución Cristal Violeta 0.1% 200 mM pH 3.5*

El Cristal Violeta se utiliza para teñir las células fijadas al sustrato de la placa de 96 pozos. Penetra la célula y se intercala en la cadena de DNA mediante atracción de cargas: la cadena de DNA tiene carga negativa y el Cristal Violeta cuenta con carga positiva.

- ∞ Ácido fórmico concentrado 10µL (J.T. BAKER, E.U.A.).
- ∞ Agua destilada 100 mL (Theissier, México).
- ∞ Cristal Violeta 100 mg (Sigma Chemical Co., E.U.A.).

A los 100 mL de agua destilada se le agregan 10 µL del ácido fórmico concentrado. Posteriormente se añaden 100 mg del Cristal Violeta a la solución antes preparada. Se mide el pH y de ser necesario se ajusta a pH de 3.5. La solución se deja en reposo a temperatura ambiente durante una semana.

#### *Solución de Glutaraldehído al 1.1%*

- ∞ Glutaraldehído al 25% (Sigma Chemical Co., E.U.A.).
- ∞ Agua destilada (Theissier, México).

Para preparar 15 mL de la solución se toman 660 µL del Glutaraldehído al 25% y se le agregan 14.34 mL de agua destilada. La solución al ser fotoreactiva debe ser guardada en un lugar oscuro y a una temperatura de 5°C.

#### *Buffer de Digestión de anticuerpos*

- ∞ PBS.
- ∞ EDTA 0.02 M 0.037 g (Sigma Chemical Co., E.U.A.).
- ∞ Cisteína 0.02 M 0.012 g (Sigma Chemical Co., E.U.A.).
- ∞ Agua MiliQ.

Primero se preparan los reactivos por separado: para el EDTA se agregan los 0.037 g y se añaden 5 mL de agua MiliQ; para el caso de la cisteína se ponen 0.012 g en 5 mL de MiliQ. Se toman 2 mL de cada reactivo (PBS, EDTA, cisteína), se debe tener en cuenta que el buffer debe tener una relación 1:1:1. Se debe almacenar a <math><10^{\circ}\text{C}</math>.

#### *Buffer de Laemli (5X)*

- ∞ Tris 0.0625 M pH 6.8 (Sigma Chemical Co., E.U.A.).
- ∞ SDS 2% (Sigma Chemical Co., E.U.A.).
- ∞ Glicerol 10% (J.T. BAKER, E.U.A.).
- ∞ Azul de Bromofenol 0.02% 8 (Sigma Chemical Co., E.U.A.).

Añadir 20  $\mu\text{L}$  de Azul de Bromofenol 0.02% a 4 mL de TRIS 0.0625 M pH 6.8. Posteriormente añadir 10 mL de glicerol y agitar, agregar 2 g de SDS y agitar. La solución se guarda a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### *Buffer de Corrida*

- ∞ SDS 5 g (Sigma Chemical Co., E.U.A.).
- ∞ Glicina 72 g (J.T. BAKER, E.U.A.).
- ∞ Tris 15.5 g pH 8.3 (Sigma Chemical Co., E.U.A.).

Los reactivos se disuelven en 800 mL de agua bidestilada, que ajusta al pH a 8.3 y se afora a 1000 mL de agua bidestilada.

#### *Solución de tinción de Azul de Coomasie 0.1%*

- ∞ Metanol.
- ∞ Agua destilada (Theissier, México).
- ∞ Ácido acético (Sigma Chemical Co., E.U.A.).
- ∞ Azul de Coomasie (Jena Bioscience GmbH, Alemania).

Se miden cada uno de los reactivos por separado: 50 mL de Metanol, 43 mL de agua destilada, 7 mL de ácido acético y 100  $\mu\text{L}$  de Azul de Coomasie. Se mezcla bien y se almacena a temperatura ambiente en un frasco ámbar.

*Solución desteñidora*

- ∞ Metanol.
- ∞ Ácido acético (Sigma Chemical Co., E.U.A.).
- ∞ Agua destilada (Theissier, México).

Se agregan todos los reactivos en una probeta: 20 mL de metanol (30-35%), 75 mL de agua destilada y 5 mL de ácido acético. Se cubre la probeta con Parafilm y se mezcla suavemente por inmersión.