



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

**“EFECTO DE LIPOSOMAS FORMULADOS, EN LA VÍA DE SEÑALI-
ZACIÓN PI3K/AKT Y EXPRESIÓN DE RECEPTORES FCγRIII (CD16)
EN CÉLULAS TUMORALES.”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA

PRESENTA

Urias Contreras Silvia Fernanda

DIRECTOR: Q.F.B. ARTURO VALLE MENDIOLA

ASESOR INTERNO: M. en C. ROSALVA RANGEL CORONA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos.

Agradezco a la UNAM y a Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por su formación académica.

A la UMIEZ, por brindarme las instalaciones requeridas para la realización de este proyecto.

Al laboratorio de la Dra. Isabel Soto por permitirme formar parte su grupo de investigación.

Al Doc. Arturo Valle por introducirme en el campo de la investigación, por su tiempo, tolerancia y conocimientos que fueron la base de este proyecto y de formación como investigadora.

A la Biol. Guadalupe Gómez por su apoyo en la unidad de Citometría de Flujo y análisis de datos.

A la M. en C. Rosalva Rangel quien proporcionó los liposomas para la realización de este proyecto.

A mi compañero de vida e ilustrador de este trabajo Alan Bautista

A mis compañeros del Laboratorio, Mary, Ricardo, Nubia, Lennis, Octavio y por supuesto a Anahí, por la ayuda, consejos, y diversión.

DEDICATORIAS.

A mi mamá y mis madres:

Yolanda contreras Campos

Ana Lilia contreras Campos

Sandra Antonia Contreras Campos

Por su tiempo y apoyo que ha sido fundamental a lo largo de mi trayectoria académica y personal.

A mis tíos

Por sus consejos dados y aliento para cumplir mis metas

Y a los que me acompañan a lo largo de mis días

Yuleni y Leo

A la capulina y dominika

Y al que hace cada uno de mis días una aventura

A mi niño Alan

INDICE

I.	RESUMEN	7
II.	INTRODUCCIÓN	9
	a. Cáncer	9
	b. Cáncer cérvico-uterino (CaCu)	10
	c. Terapias	11
	d. Liposomas	12
	e. Lípidos membranales	14
	f. Comunicación celular	16
	▪ Cinasas							
	g. Fosfatidilinositol-3 cinasa(PI3K)	17
	h. Cinasas Akt	19
	i. Vía de señalización PI3K-Akt	20
	j. Papel de la PI3K en la fusión de membranas y tráfico vesicular	22
	• Regulación de fagocitosis y macropinocitosis							
	• Reciclamiento de membranas							
	• Regulación de exocitosis							
	k. Receptores Fc (FcR)	26
	• Receptores Fc en células tumorales							
	l. Vía de señalización de receptores Fcγ (FcγR)	30
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
IV.	HIPÓTESIS	32
V.	OBJETIVO GENERAL	32
VI.	OBJETIVOS PARTICULARES	32
VII.	MATERIAL Y MÉTODOS	33
	a. Cultivo celular							
	b. Reactivos y anticuerpos							
	c. Tratamientos							
	d. Técnicas de bioquímica para el análisis de proteínas por Citometría de Flujo							
VIII.	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	35
	a. Expresión de CD16 (FcγRIII)	35
	b. Participación de PI3K	39
IX.	DISCUSIÓN	44
X.	CONCLUSIONES	47
XI.	PERSPECTIVAS	48
XII.	REFERENCIAS	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Estructura liposomal integrada por fosfolípidos.	.	.	.	13
Fig. 2. Estructura de fosfolípidos; Fosfatidilinositol.	.	.	.	15
Fig. 3. Fosfatdilinositol en células eucarióticas.	.	.	.	16
Fig.4. Fosfatidil inositol 3- cinasa, PI3K.	.	.	.	18
Fig.5. Función de la PI3K.	.	.	.	18
Fig.6. Cinasa Akt.	.	.	.	19
Fig. 7. Vía de señalización PI3K/Akt.	.	.	.	21
Fig. 8. Efectores de PtdIns en el tráfico vesicular.	.	.	.	24
Fig.9. interacción entre Receptor Fc e IgG.	.	.	.	26
Fig. 10. Familia de receptores FcyR.	.	.	.	27
Fig.11. Vía de señalización de receptores Fcy (FcyRIII).	.	.	.	30
Fig. 12. Expresión de CD16 (FcyRIII) en CALO frente a tratamientos.	.	.	.	36
Fig. 13. Expresión de CD16 (FcyRIII) en INBL frente a tratamientos.	.	.	.	37
Fig. 14.. Expresión de CD16 (FcyRIII) en MONOCITOS.	.	.	.	38
Fig. 15. Fosforilación de la cinasa Akt en la línea celular CALO.	.	.	.	39
Fig. 16. Fosforilación de la cinasa Akt en la línea celular INBL.	.	.	.	39
Fig. 17. Radio de fosforilación correspondiente a las líneas celulares CALO e INBL41
Fig 18. Análisis del radio de fosforilación constitutiva de la cinasa Akt en la línea celular CALO.41

Fig. 19. Análisis del radio de fosforilación constitutivo de la cinasa Akt en la línea celular INBL.	.42
Fig. 20. Proporción de p-AKT correspondiente a las diferentes isoformas en INBL.	.42
Fig. 21. Proporción de p-Akt correspondiente a diferentes isoformas en CALO .	.43

I. RESUMEN

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es la tercera causa de muerte a nivel mundial y es considerado como la segunda causa de defunción por neoplasias del género femenino en México; frente a esta enfermedad se han desarrollado terapias como la cirugía, radioterapia en combinación con la quimioterapia empleando fármacos antitumorales; sin embargo, su administración vía sistémica y falta de especificidad ocasiona diversos efectos tóxicos que afectan tanto a células tumorales como a células normales, ante lo cual se ha impulsado el desarrollo de mecanismos para disminuir la toxicidad manteniendo o aumentando su actividad antitumoral.

El encapsulamiento liposomal de fármacos hace posible dirigir su acción hacia órganos blanco disminuyendo su toxicidad; su formulación basada en la mecánica de la membrana celular hace posible una mayor absorción de sustancias antitumorales; por lo que se considera a los liposomas como excelentes vehículos para la administración de sustancias antitumorales.

En estudios realizados en el laboratorio de Oncología Celular de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, el uso de liposomas con IL-2 ha logrado una regresión del tamaño en ratones con tumores inducidos con células de cáncer de cérvix, disminuyendo la citotoxicidad de esta citocina por lo cual se considera óptimo el estudio de estos biotransportadores para la administración de sustancias antitumorales con el propósito de impulsar la búsqueda de constituyentes que les confieran mayor estabilidad estructural.

La incorporación de fosfolípidos aumenta la estabilidad estructural del liposoma, en particular fosfolípidos cíclicos que están presentes en la membrana celular participando como sustrato en la activación de vías de señalización como la vía PI3K/Akt, involucrada en la dinámica del citoesqueleto, tráfico vesicular y activación de receptores inmunológicos tales como FcγRIII (Receptor III para la fracción cristalizante de la IgG). Se ha demostrado la presencia de receptores Fc en células tumorales no hematopoyéticas, lo cual podría conferir protección frente al reconocimiento por el sistema inmunológico e inclusive aumentar la vulnerabilidad tumoral frente a una inmunoterapia.

Por lo anterior, en el presente estudio se analizó el efecto de liposomas formulados sobre la expresión de CD16 en líneas celulares de cáncer cérvico uterino CALO e INBL. Nuestros resultados muestran que la estructura formada por el fosfolípido cíclico unido al liposoma

incrementa el nivel de expresión basal de FcγRIII (CD16) en las líneas celulares, CALO (51.2%), INBL (47.44%) y monocitos (84.8%).

La incorporación de un lípido cíclico a la formulación liposomal, no activa la vía PI3K/Akt ya que no se modifica el nivel de fosforilación basal de la proteína Akt. La determinación del radio de fosforilación constitutiva de Akt-1 en el cual la línea celular CALO presenta un 0.65 e INBL un 0.77; así como la proporción correspondiente a cada isoforma del total de Akt- fosforilada representa el 54% en CALO y el 78% en INBL de Akt-1; el 46% en CALO y el 22% en INBL a las isoformas de Akt 2/3, muestran diferencias bioquímicas atribuidas al grado de progresión tumoral CALO IIB e INBL IVB.

En conclusión, la estructura formada por el lípido cíclico unida al liposoma incrementa la afinidad de estas partículas a las membranas celulares sin afectar los niveles de activación constitutiva de Akt, sin embargo esta evaluación no determina que el componente estructural del liposoma no pueda activar otras vías de señalización involucradas con proteínas que presenten dominios de unión a este tipo de lípidos, vías de señalización donde la PI3K ejerza su participación o relacionadas con la activación del tráfico vesicular, permitiendo la externalización de los receptores inmunológicos FcγRIII resguardados en vesículas al interior de la membrana celular a través de un re-arreglo del citoesqueleto.

II. INTRODUCCIÓN

a. Cáncer

Desde la antigüedad, el cáncer ha acompañado a la humanidad. Hacia el año 400 a.C. Hipócrates lo nombró *karkinos*, en griego significa cangrejo (Barruti, 2012); haciendo una analogía a su desordenado crecimiento con ramificaciones que se adhieren a todo con obstinación y forma similar a un cangrejo marino.

El cáncer es una enfermedad multifactorial en la cual la dieta, hábitos tóxicos, el estilo de vida y el medio ambiente, incluyendo la infección por microorganismos son factores que actúan sobre el genoma de la célula como iniciadores o promotores tumorales en la transformación celular (Díaz *et al.*, 1998), dando paso a un proceso de inmortalización celular con un crecimiento desordenado, incontrolable, excesivo y autónomo que supera la velocidad de crecimiento de tejidos normales, capaz de diseminarse a otros órganos (metástasis) y lograr la colonización tisular.

El humano se encuentra constituido aproximadamente por 10^{15} células normales, de las cuales se pierden 400 mil millones en tejidos y órganos diariamente, por lo que las células requieren dividirse y diferenciarse. Se han calculado 10^{12} divisiones de células por día, dentro de las cuales se estima una frecuencia de mutaciones de 10^{-10} /división celular en un medio sin mutágenos; sin embargo la exposición a factores iniciadores o promotores tumorales incrementa la acumulación de estas mutaciones y alteraciones epigenéticas, alterando la actividad de genes involucrados en el control del ciclo celular; incrementando la activación de genes involucrados en proliferación (oncogenes) y la disminución o inactivación de genes involucrados en mecanismos de reparación molecular y apoptosis (genes supresores de tumores). Confiendo una ventaja selectiva a nivel celular que permite la evasión de mecanismos homeostáticos normales y la adquisición de un fenotipo cancerígeno, heredable, que al paso del tiempo sea capaz de matar al organismo (Valle, 2003).

El cáncer es considerado una de las primeras causas de muerte a nivel mundial. En el año 2012 se registraron 14.1 millones de casos nuevos de cáncer, 8.2 millones de muertes por cáncer y 32.6 millones de personas que viven con cáncer (OMS, 2014; Globocan, 2012).

En México es la tercera causa de muerte con 65 casos por cada 100,000 habitantes, y cada año se suman más de 128,000 casos (SPPS, 2014). Dentro de los más de 100 tipos de cáncer, los principales causantes de mortalidad son el cáncer de mama (13.8%) seguido por el cáncer cérvico-uterino (10.4%).

b. **Cáncer cérvico-uterino (CaCu)**

A nivel mundial, el cáncer cérvico-uterino es el séptimo cáncer más común y el cuarto entre las mujeres; en el año 2012 se estimaron 528 mil nuevos casos y se atribuyeron 266 mil muertes por cáncer cervical en todo el mundo, lo cual representa el 7,5% de todas las muertes por cáncer en las mujeres. (Globocan, 2012). En México es la segunda causa de cáncer más común y presenta un 8% (275,100) del total de muertes en mujeres por cáncer en el 2008, siendo la primera causa de defunción por neoplasias en el género femenino (SSEM, 2014; Cetina L, 2014); anualmente se espera la aparición de 500 mil casos nuevos y 200 mil muertes por esta causa (Cortés, 2003).

Dentro de los factores etiológicos más importantes que actúan sobre el genoma como iniciadores o promotores del cáncer de cérvix se encuentra la infección por el virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR); relación avalada por estudios epidemiológicos en los cuales el VPH-AR se encontró en el 99.7 % de los casos de cáncer de cérvix (Muñoz, 2000) y en más del 70% de las biopsias realizadas en el mundo se han encontrado los tipos oncogénicos 16 y 18 (Walboomers, 1999).

El virus del papiloma humano pertenece a la familia *Papovaviridae*, considerado como un ADN-virus, debido al material genético que portan. Su genoma contiene 6 genes de expresión temprana (E) implicados en la regulación y replicación y 2 genes de expresión tardía (L) que codifican las proteínas de la cápside vírica (De la Cruz *et al.*, 2004).

Este virus infecta epitelios estratificados, ingresando a través de microlesiones superficiales e infectando a células de la lámina basal donde el virus desarrolla un microambiente a través de su maquinaria proteica ligada al proceso de diferenciación celular, de esta forma las células infectadas amplifican el ADN vírico dado por la expresión de oncoproteínas tempranas E1 y

E2; al inicio del proceso de diferenciación celular, la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 permiten la transcripción y traducción de los genes tardíos que codifican las proteínas de la cápside L1 y L2 en la parte superior del epitelio, donde se ensamblan las partículas víricas infecciosas (De la Cruz *et al.*, 2004).

La relación entre esta infección viral y la oncogénesis del cáncer cérvico-uterino involucra la transcripción y traducción de los oncogenes virales que codifican para la expresión de la oncoproteína E6 que degrada a la proteína supresora de tumor p53 y la proteína E7 que inactiva la proteína supresora de tumor Rb, lo que permite la progresión del ciclo celular de G1 a S, desregulando procesos como la proliferación y apoptosis; dando paso a la transformación e inmortalización de las células infectadas (Cortés, 2003).

c. **Terapias**

Con relación al tratamiento de esta enfermedad se han desarrollado diversas terapias como la cirugía, radioterapia, inmunoterapia y quimioterapia; sin embargo, su empleo combinado durante la aplicación de una terapia convencional presenta grandes dificultades: la falta de especificidad y /o su ineficacia para el control de la enfermedad residual (Subiza *et al.* 1994).

El desarrollo e implementación de la inmunoterapia podría solucionar estas limitaciones puesto que aprovecha el potencial del sistema inmunológico y su capacidad de respuesta frente a células tumorales; las bases de la inmunoterapia se remontan hacia el año 1908, cuando Paul Ehrlich sugiere la existencia de una respuesta inmune frente al crecimiento tumoral basándose en la regresión espontánea de algunos tumores. Actualmente, esta terapia se basa en el uso de anticuerpos monoclonales así como el empleo de citocinas, debido a sus propiedades inmuno-reguladoras y antiproliferativas para el desarrollo de vacunas o agentes antineoplásicos (Subiza *et al.*, 1994). Por ejemplo la interleucina-2 (IL-2) fue aprobada como fármaco efectivo para la terapia contra tumores humanos por su activación del sistema inmunológico (Mule, 1985); sin embargo, su administración en inmunoterapia ha sido limitada debido a su alta toxicidad (Rangel *et al.*, 2014).

Así como la IL-2, diversos fármacos citolíticos, citostáticos y citotóxicos son administrados vía sistémica logrando periodos cortos de duración, además la falta de especificidad de estos fármacos afecta tanto a células tumorales como a células normales, produciendo importantes cambios estructurales y funcionales en células normales; por lo que se ha impulsado la búsqueda de mecanismos para dirigir fármacos a tejidos específicos, disminuyendo los efectos hacia células normales y manteniendo o aumentando su actividad antitumoral al evitar ser metabolizados y excretados rápidamente garantizando la liberación controlada de estos agentes antitumorales.

d. Liposomas

La nanobiotecnología ha impulsado el desarrollo de sistemas farmacéuticos eficientes y seguros capaces de entregar fármacos a células dañadas denominados por Paul Ehrlich en 1906 como “balas mágicas” (Shashi *et al.*, 2012).

Los liposomas son transportadores constituidos por bicapas concéntricas de lípidos anfipáticos descubiertos por Alec D. Bangham en 1961 mientras estudiaba el papel de los fosfolípidos en la coagulación sanguínea. Los fosfolípidos en agua forman esferas cuyas paredes se organizan en bicapas debido al carácter anfipático de estas moléculas, dejando compartimientos acuosos al interior y al exterior (Fig. 1.) (Lanio *et al.*, 2009). Bajo este concepto se han desarrollado vesículas artificiales de fosfolípidos que presentan propiedades físico-químicas similares a las membranas celulares, permitiendo su empleo en modelos *in vitro* de membranas biológicas para la investigación en bioquímica de membranas y mecanismos de transporte (Gutierrez, 1997); este comportamiento y capacidad de encapsular compuestos han convertido a los liposomas en una herramienta importante para acarrear sustancias al interior de las células, teniendo otras ventajas como ser fácilmente metabolizables, no tóxicos ni antigénicos.

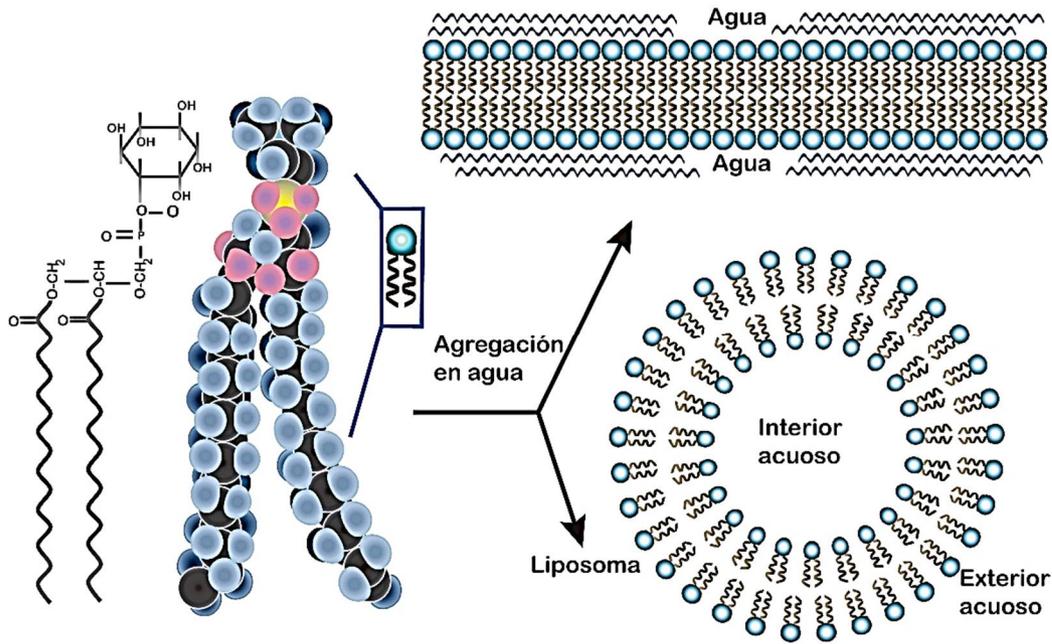


Fig. 1. Estructura liposomal integrada por fosfolípidos. Modificado de Alberts et al., 2008

Por estas características los liposomas han constituido uno de los mejores sistemas acarreadores empleados en la liberación de fármacos, terapia génica y como adyuvantes (Lanio *et al.*, 2009) transportando diversas sustancias hidrofílicas como ácidos nucleicos, fármacos inorgánicos, citocinas, antígenos o anticuerpos (Rangel *et al.*, 2014) con el objetivo de reducir los efectos tóxicos colaterales de las sustancias administradas y lograr una mayor especificidad al aumentar su afinidad hacia las membranas de las células tumorales (Kecpczyński, 2008).

La formulación liposomal convencional se basa en moléculas anfipáticas derivadas o basadas en la estructura de los lípidos de las membranas biológicas (Lassic, 1997), estructuradas por una parte hidrofóbica a partir de un enlace éster de dos cadenas hidrocarbonadas con la molécula del glicerol (glicerolípidos), o por la unidad hidrofóbica ceramida (esfingolípidos) a la cual se une a una cabeza polar hidrofílica que puede contener fosfolípidos y/o glicerolípidos zwitteriónicos biológicamente relevantes como la fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), esfingomiélinea (SM), así como moléculas cargadas negativamente: ácido fosfatídico (PA),

fosfatidil glicerol (PG), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), cardiolipina (CL) y glicolípidos (Lanio *et al.*, 2009).

Sin embargo, la administración vía sistémica de liposomas ocasiona su interacción con lipoproteínas de alta densidad las cuales remueven los fosfolípidos de las bicapas ocasionando su ruptura y liberación de su contenido en la circulación. Frente a esto, se ha impulsado la búsqueda de constituyentes que les confieran una mayor estabilidad estructural o modifiquen las propiedades físicas de estos transportadores, ya que el patrón de distribución y absorción del fármaco depende totalmente de las propiedades fisicoquímicas del liposoma (Kaye, 1981).

De esta manera, estudios basados en las propiedades físico-químicas de las membranas celulares, han permitido la modificación físico-química de liposomas mediante su capacidad de incorporación, estabilidad, y su distribución *in vivo* (Lanio *et al.*, 2009). Se ha informado que la inclusión de lípidos catiónicos en la composición liposomal ha potenciado su capacidad para mediar la transfección de material genético (Ulrich, 2002), así como el estudio realizado por Bergers y col. en el cual los liposomas con carga negativa tuvieron una mayor efectividad y la eficacia de su incorporación fue dependiente de la carga del liposoma, el pH y la fuerza iónica del medio.

e. Lípidos membranales

Fisiológicamente las moléculas lipídicas constituyen el 50% de los componentes de la membrana celular proporcionando su estructura básica; dentro de los componentes más abundantes se encuentran los fosfolípidos que poseen una cabeza polar y dos colas hidrocarbonadas hidrofóbicas por lo cual se denominan como moléculas antipáticas. Los principales fosfolípidos presentes en las membranas celulares son los fosfogliceridos, que poseen un esqueleto de glicerol de tres átomos de carbono con dos ácidos grasos de la cadena larga están unidos mediante enlaces éster y un grupo fosfato el cual está unido a diferentes grupos polares que se diferencian por el tamaño, forma o carga eléctrica (Fig. 2). En las células animales lo principales fosfogliceridos que se encuentran en la membrana celular son la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina, la fosfatidilcolina y el fosfatidilinositol (Alberts *et al.*, 2008).

Estos componentes membranales no solo juegan un papel importante en la estructura membranal; también cumplen su función como reguladores de importantes vías de señalización celular al actuar como segundos mensajeros, un ejemplo es el fosfatidilinositol, el cual posee un grupo alcohol cíclico de seis carbonos llamado inositol, que presenta una carga eléctrica negativa y es altamente polar debido a su elevado contenido en grupos hidroxilo (Fig. 2.).

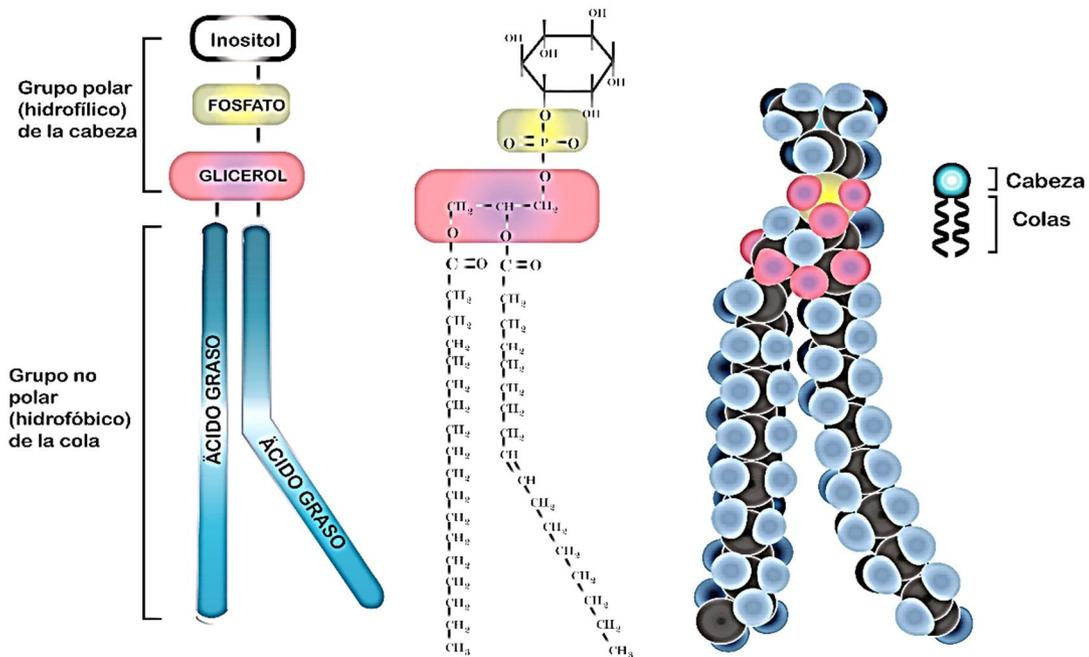


Fig. 2. Estructura de fosfolípidos; Fosfatidilinositol. Modificada de Alberts et al., 2008

Este fosfolípido se encuentra localizado en la membrana interna donde ejerce su papel como sustrato de una amplia variedad de enzimas incluyendo fosfatasas, fosfolipasa C (PLC), la fosfolipasa D (PLD) (Corvera, 1999), así como enzimas cinasas de lípidos como la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), capaces de fosforilar los hidroxilos libres del inositol produciendo derivados fosforilados del fosfatidilinositol, llamados "fosfoinositidos" como el fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato ($PI[3,4,5]P_3$) y el fosfatidilinositol 3-fosfato ($PI[3]P$), los cuales pueden actuar como segundos mensajeros y regular importantes vías de señalización (Knödler, 2005).

Los fosfoinosítidos (PtdIns), son esenciales en las células eucarióticas, al actuar como reclutadores locales de proteínas con dominio PH (homologo a pleckstrina), FIVE (Fab1, YOTB, Vac1 y EEA1) y PX (phox homology), a través de los cuales modulan la maquinaria proteica que controla vías de señalización celular involucradas en procesos nucleares, la dinámica del citoesqueleto y el trafico vesicular implicado en la vía secretora y endocítica (Lemmon, 2003); por lo cual reacciones celulares que alteren los niveles de fosfoinosítidos podrían eficientemente regular el tráfico vesicular (Fig. 3.).

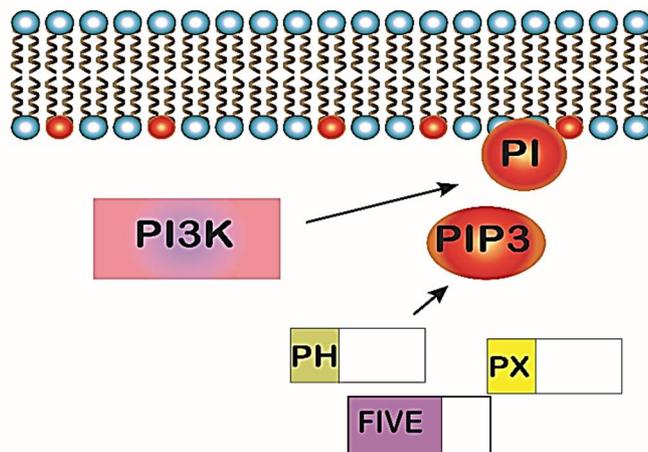


Fig. 3. Fosfatidilinositol en células eucarióticas. Localizado en la membrana interna donde interctua como sustrato de enzimas cinansas de lípidos que generan PtdIns capaces de reclutar proteínas con dominios PH, FIVE, PX.

f. Comunicación celular

Las rutas de transducción de señales son vías por las cuales se regulan los eventos más importantes en la actividad celular que opera a partir del transporte de señales del exterior hacia interior de las células, desencadenando cascadas de señalización celular que incluyen eventos de fosforilación y desfosforilación llevados a cabo por proteínas cinasas y fosfatasas, respectivamente.

Cinasas

Las proteínas cinasas constituyen un grupo de enzimas responsables de la fosforilación de proteínas, la cual es una modificación postraduccionál covalente que altera la actividad de las proteínas blanco, al ser capaces de catalizar la transferencia del fosfato- γ del ATP o GTP a las

proteínas; estas proteínas cinasas se encuentran clasificadas en función de los aminoácidos que fosforilan: cinasas de tirosina y de serina/treonina, las cuales pueden ser receptores de superficie celular o cinasas intracelulares que operan como miembros de cascadas de señalización (Berridge, 2014). Otro grupo de proteínas cinasas son las de lípidos, las cuales fosforilan grupos hidroxilo de lípidos presentes en la membrana celular, produciendo segundos mensajeros que contribuyen al reclutamiento y activación de importantes miembros de las vías de señalización que concluyen en la transducción de la señal extracelular en una respuesta celular (Aguilera, 2005).

g. **Fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)**

Dentro de las proteínas cinasas de lípidos se encuentra la fosfatidilinosol-3-cinasa (PI3K), la cual es reguladora de numerosas rutas de transducción de señales intracelulares que coordinan el crecimiento celular, la entrada al ciclo celular, migración y supervivencia (Aguilera, 2005).

La familia de PI3K constituye un grupo de proteínas cinasas que incluyen cinasas de fosfatidilinositol, proteínas cinasas dependientes de ADN (DNA-PK), ataxia telangiectasia-mutada (ATM), ataxia telangiectasia y rad3 (ATR) (Pinzón, 2009).

Se han reportado 8 tipos de PI3K en mamíferos, clasificadas en tres clases con distinta actividad (Victoria, 2012) en función al tipo celular en el cual se expresa el sustrato específico y las subunidades necesarias para la activación de cada clase (Ghayad *et al.*, 2010).

La PI3K clase I es una proteína heterodimérica conformada por una subunidad reguladora p85 y una subunidad catalítica p110. Existen cinco subunidades reguladoras (p85 α , p85 β , p55 α , p50 α y p55 γ) las cuales cumplen su función como proteínas adaptadoras; la subunidad reguladora p85 contiene un dominio homólogo Scr3 (SH3), un dominio breakpoint-cluster-region homology (BH), dos regiones ricas en prolina y dos dominios homólogos a Scr2 (SH2) separados por un dominio de unión a la subunidad catalítica p110. Esta proteína interactúa con el dominio de unión a p85 localizado en la subunidad catalítica la cual presenta tres subunidades (p110 α , p110 β y p110 δ) (Fig. 4.). Los diferentes dominios de unión en las

subunidades catalíticas incrementan la versatilidad de esta enzima para interactuar con una gran variedad de moléculas de señalización (Berridge, 2014).

PI3K CLASE 1
SUBSTRATO LIPÍDICO
PtdIns (4,5) P₂

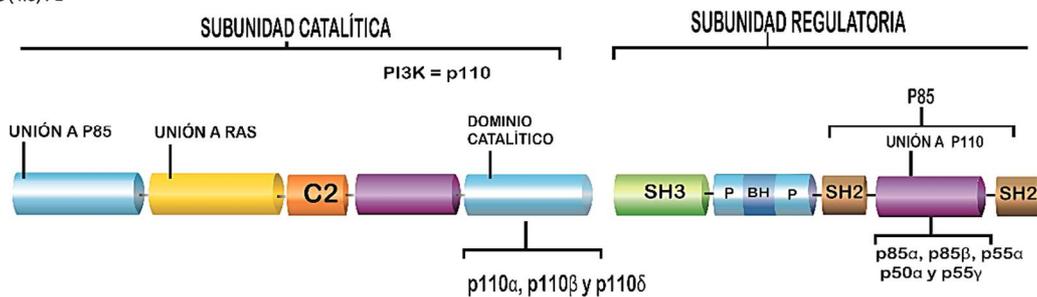


Fig. 4. Fosfatidilinositol 3- cinasa, PI3K. Dominios presentes en la subunidad catalítica p110 y reguladora p85.

Modificado de Vanhaesebroek, 2010.

La principal función de la fosfatidilinositol 3-cinasa es mediar la fosforilación en la posición 3 del anillo de inositol el cual es un componente lipídico de la membrana y preferentemente fosforila al fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, $PI[4,5]P_2$ (PIP₂) generando fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato $PI[3,4,5]P_3$ (PIP₃) (Fig. 5.), estas moléculas son denominadas como segundos mensajeros y contribuyen al reclutamiento y activación de proteínas con dominios de unión a fosfoinositidos D3 fosforilados, como proteínas con dominios PH dando lugar a la formación de complejos de señalización, siendo de particular interés la proteína cinasa de serina/treonina PKB/Akt y la proteína cinasa 1 dependiente de fosfoinositidos (PDK1) (Aguilera, 2005).

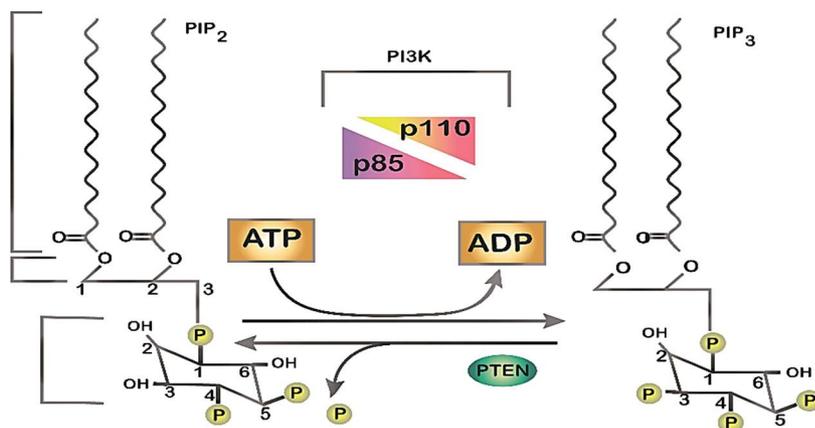


Fig. 5. Función de la PI3K. Fosforilación en la posición 3 del anillo inositol, PtdIns (4,5)P₂, mediado por la PI3K, generando PtdIn (3,4,5)P₃. Modificado de

<http://pendientedemigracion.ucm.es/info/biomol2/Ruta%20de%20la%20Fosfatidil%20inositol%203%20quinasa.pdf>

h. Cinasa Akt

La proteína cinasa de serina/treonina Akt o cinasa B (PKB), es considerada el homólogo del oncogén viral v-Akt (retrovirus Akt8) asociado con linfomas de ratón (Cornero, 2010). La activación de Akt regula numerosos procesos involucrados en la apoptosis, el crecimiento celular y el ciclo celular (Aguilera, 2005).

La cinasa Akt pertenece a una gran familia de cinasas con las cuales conservan un alto grado de homología, tales como PKA y PKC. Akt tiene tres isoformas conocidas derivadas de distintos genes Akt1/PKB α , Akt2/PKB β y Akt3/PKB γ .

La respuesta originada por Akt depende de cada una de las tres isoformas conocidas, las cuales poseen un dominio amino-terminal PH, el cual regula interacciones proteína-proteína o lípido-proteína, un dominio central catalítico y un dominio regulador carboxiterminal de unión a fofoinositoles-3 fosfato (PIP3) generados por PI3k, el cual contribuye a su reclutamiento y activación (Victoria, 2012) (Fig. 6.).

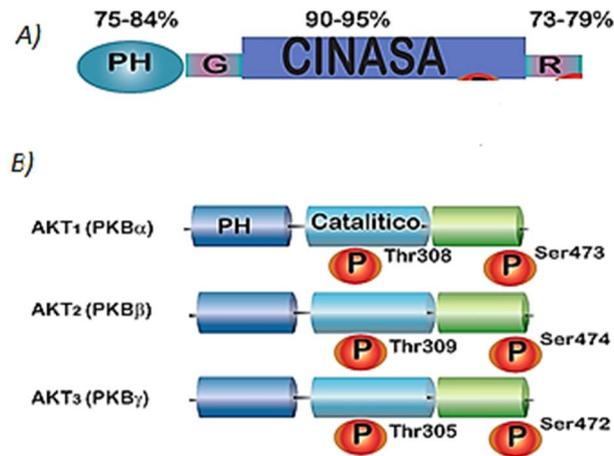


Fig. 6. Cinasa Akt. A) Porcentajes de homología en dominios entre los miembros de la familia PKB, PKC y Akt.

B) Dominios de activación en las isoformas de Akt. Modificado de Sup Song, et al., 2012.

Se han identificado diferentes proteínas cinasas involucradas en su proceso de activación incluyendo el complejo rictor-mTOR (blanco en mamífero de rapamicina), PDK1, ILK (cinasa ligada a la integrina), la PKC β II e incluso la propia Akt, aunque aún no se encuentra claro el papel de éstas en la regulación de esta proteína (Pinzón, 2009).

i. Descripción de la vía de señalización PI3k/Akt

Históricamente a la vía PI3K se le ha llamado RAC-PK por su relación con la proteína cinasa A (PKA) y C (PKC), así en los años 90 se demostró que PKB o Akt se encontraba regulada por PI3K debido a la relación directa con la muerte celular, proliferación y sobrevivencia (Majumder, 2005) estableciendo una vía integrada entre PI3K y Akt (Coffer *et. al.* 1998).

La vía de señalización PI3K/Akt es activada en respuesta a diversos estímulos extracelulares que propician la fosforilación de la subunidad p85 de la PI3K, causando un cambio conformacional capaz de reclutar la subunidad catalítica p110 para su activación.

La proteína PI3k activa, fosforila el fosfatidilinositol 4,5 difosfatato (PI2P) convirtiéndolo en un segundo mensajero fosfatidilinositol 3, 4, 5 trifosfato (PI3P), capaz reclutar a la proteína AKT mediante la interacción del dominio PH en la región N-terminal de Akt con el PI3P, induciendo cambios conformacionales en Akt, lo que permite la exposición de sus dos sitios principales de fosforilación.

El dominio PH presente en Akt puede mediar la proximidad de PDK1, la cual fosforila a Akt en el dominio treonina (Thr 308), dando estabilidad a este complejo de señalización para la posterior fosforilación por el complejo proteico mTOR-riCTOR en el dominio serina (Ser 473) de Akt, activándola; permitiendo su acción sobre distintos blancos responsables de los diversos efectos de la vía implicados como puntos fundamentales en procesos particulares como la supervivencia celular y la inhibición de la muerte celular (Ji *et al.* 2003).

La regulación de esta vía de señalización PI3K/Akt es a través de la desfosforilación PI3P a PI2P mediado por la fosfatasa homóloga a tensina PTEN, la cual se encuentra mutada en muchos cánceres, permitiendo la producción constitutiva de PI3P y la consecuente activación de Akt que conduce a una respuesta proliferativa y antiapoptótica relacionada con el desarrollo de diferentes tipos de cáncer (Pinzón, 2009) (Fig. 7).

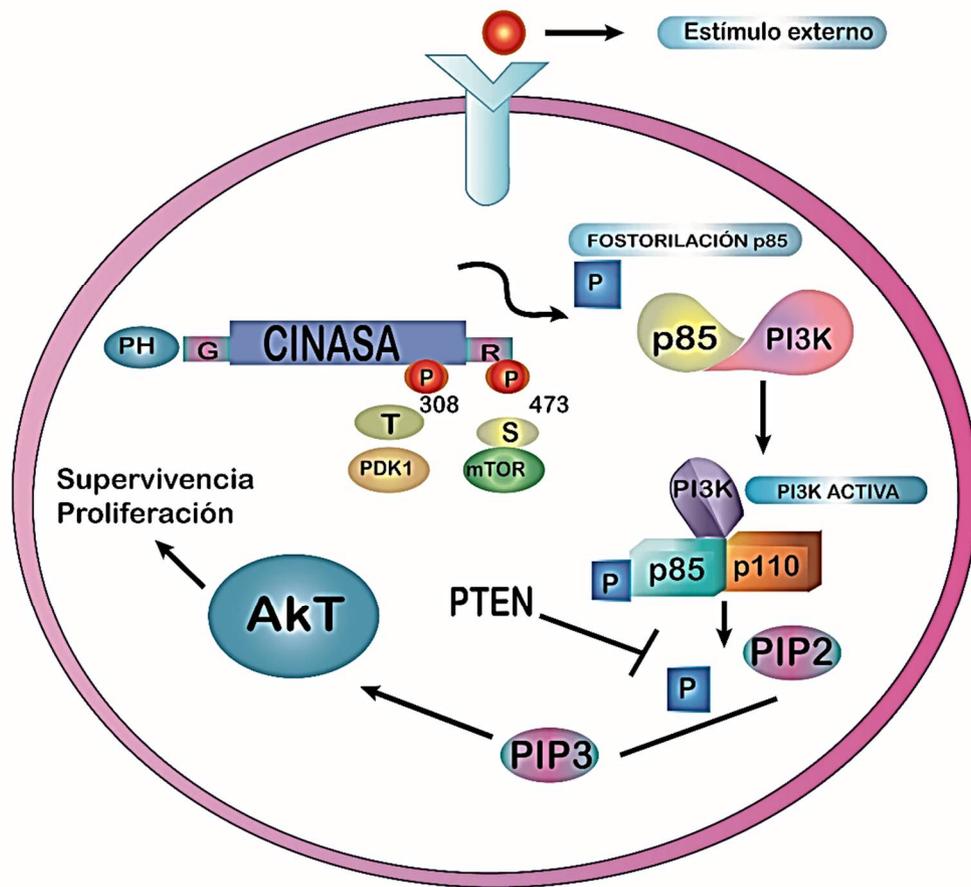


Fig. 7. Vía de señalización PI3K/Akt. La fosforilación de la subunidad p85 de la PI3K, tras estímulos extracelulares propicia un cambio conformacional capaz de reclutar la subunidad catalítica p110 para su activación; una vez activa la PI3K, fosforila el fosfatidilinositol 4,5 difosfato (PI2P) generando fosfatidilinositol 3, 4, 5 trifosfato (PI3P), capaz reclutar a la proteína Akt mediante la interacción con su dominio PH en la región N-terminal, lo que induce cambios conformacionales en Akt, que permiten una primera fosforilación en su dominio treonina (Thr 308) por la PDK1 y una segunda fosforilación en el dominio serina (Ser 473) por el complejo proteico mTOR-ricor, lo que propicia su activación sobre distintos blancos involucrados en diversos procesos celulares como la supervivencia proliferación y supervivencia. La regulación de esta vía de señalización PI3K/Akt es a través de la desfosforilación PI3P a PI2P mediado por la fosfatasa homóloga a tensina PTEN. Modificado de Victoria (2012).

j. Papel de la PI3K en la fusión de membranas y tráfico vesicular.

Las tres clases en las cuales se encuentran clasificadas las diversas moléculas de PI3K (Tabla 1.), desencadenan diferentes tipos de respuestas celulares en función a la preferencia por el substrato y el modo de activación de cada clase de PI3K.

CLASES DE PI3K						
CLASE	SUBUNIDAD	FUNCIÓN	SUSTRATO	ACTIVADO POR	DOMINIOS EFECTORES	Tráfico vesicular
IA	Catalítica (p110 α , β , δ)	PIP2 a PIP3	PtdIns (4,5)P ₂	FcyR	PH	Fagocitosis Macropinocitosis Exocitosis Autofagia
	Regulatoria (p85 α , β ,p55 γ)	Activa proteínas G inhibe p110		RTKs Ras		
IB	Catalítica(p110 γ)	PIP2 a PIP3	PtdIns (4,5)P ₂	GPCRs	PH	
	Regulatoria(p101)	Regula p110		Ras		
II	Catalítica (PI3K-C2, α , β , γ)	PtdIns a PIP y PIP2, activa Rho-GTPasas, rac-1 y Cdc-42	PtdIns	LPA IRs	FIVE PX	
III	Catalítica (Vps34/hVps34) Regulatoria(Vps15/p150) Accesorias (Vps30/Beclin1) (Vps38 o Vps14)	PtdIns a PIP2	PtdIns	constitutiva		Tráfico vesicular constitutivo Autofagia

Tabla 1. Clases de PI3K. PI3k de clase I y II son reguladores agonistas inductoras de procesos de tráfico vesicular inducidos por receptores como la fagocitosis, macropinocitosis y la exocitosis.

La clase I, emplea el fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato como su substrato y produce fosfatidilinositol (3, 4, 5)-trifosfato. La subclase **IA** de PI3K es típicamente activada por receptores tirosina cinasa (RTK) ó receptores para inmunoglobulinas G (FcyR). La subclase de enzimas **IB** es activada por receptores acoplados a proteínas G (GPCR). **La clase II** Emplea PtdIns produciendo fosfatidilinositol 3-fosfato (PtdIns(3)P) tras su activación por estímulos extracelulares.

La clase III, media eventos constitutivos de tráfico vesicular independientes de receptores como la endocitosis, el tráfico membranal, maduración del fagosoma y la autofagia, a través de sus productos catalíticos PtdIns 3-p. se encuentra representada por hVps34 y es considerada como la forma más antigua de PI3K. Modificado de Victoria Z, 2012, Lindmo et al., 2005.

Dentro de las respuestas moduladas por las proteínas PI3K se encuentran procesos involucrados con la dinámica del citoesqueleto y el tráfico vesicular, en procesos endocíticos como la fagocitosis y la macropinocitosis; así como en procesos exocíticos como la degranulación de mastocitos y basófilos; la translocación del receptor transportador de glucosa GLUT-4 inducido por insulina y la liberación de gránulos neurosecretorios (Lindmo *et al.*, 2005).

Regulación de la fagocitosis y macropinocitosis

Procesos endocíticos como la fagocitosis y macropinocitosis requieren de la reorganización del citoesqueleto de actina el cual es controlado por la PI3K clase IA (p110 β), la cual puede ser activada por diversos mecanismos. El inicio de la fagocitosis de partículas opsonizadas con IgG a través de receptores Fc γ presentes en células fagocíticas se encuentra mediado por la proteína cinasa Syk, responsable del reclutamiento y activación de la PI3K IA. Alternativamente la activación constitutiva o en respuesta a estímulos de la macropinocitosis para la internalización de líquidos extracelulares en vesículas a través de la formación de protrusiones de la membrana (Maltese *et al.*, 2015), puede involucrar el reclutamiento y activación de PI3K IA dependiente de la proteína Rab5. La activación de PI3K IA genera PtdIns(3,4,5)P₃, capaces de regular lípidos efectores involucrados en la dinámica del citoesqueleto de actina y de la membrana plasmática, los mejores candidatos para regular este proceso son un grupo de factores intercambiadores de nucleótidos (GEF) que poseen dominios PH capaz de unirse a GTPasas pequeñas; la activación de Rac1 por el GEF Vav, modula la activación de Rho el cual es un mediador importante en la dinámica del citoesqueleto; los GEF de la familia zizimin son capaces de la activación de Cdc42 responsable del alargamiento de pseudopodos.

De esta manera el requerimiento de la PI3K IA en la fagocitosis se encuentra restringida a la etapa en la cual se da la formación de un cuenco en la membrana para la formación de un fagosoma, a partir de lo cual efectores de PtdIns modulan el destino vesicular.

Reciclamiento de membranas

La ruta que sigue el fagosoma hacia su reciclamiento membranar o a su maduración se encuentra influenciada principalmente por la relación inversamente proporcional entre la activación de Arf6 y Rac1. Se ha reportado que niveles elevados de Arf6 activada por EFA y GRP1 (GEF) propicia el reciclamiento vesicular del fagosoma; y niveles elevados de Rac1 conllevan a la formación de un fagosoma tardío donde los niveles de PtdIns (3,4,5)P3 decaen por la acción de la fosfatasa SHIP, permitiendo la activación de la PI3KIII que junto con Rab5, inician el proceso de maduración del fagosoma para la formación de un endosoma tardío con marcadores característicos (EEA1, Hrs, PtdIns 3-P) y un pH bajo, que a su fusión con un lisosoma terminará con la degradación del material ingerido (Maltese *et al.*, 2015 y Lindmo *et al.*, 2005).

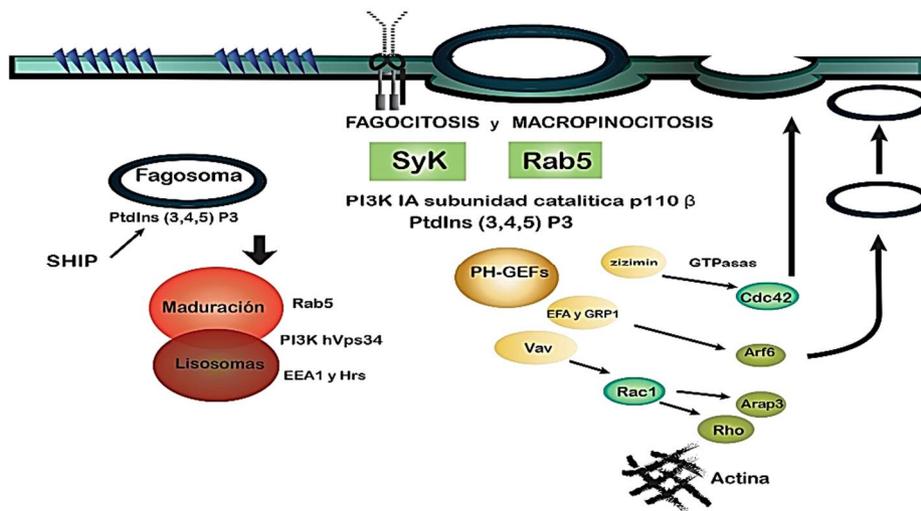


Fig.8. Efectores de PtdIns en el tráfico vesicular. La Regulación de procesos endocíticos como la fagocitosis y macropinocitosis requieren de la reorganización del citoesqueleto de actina el cual es controlado por el reclutamiento de la PI3K clase IA (p110β) mediante la proteína cinasa Syk y Rab5, respectivamente. La activación de PI3K IA genera PtdIns(3,4,5)P3 capaces de regular GEF (factores intercambiadores de nucleótidos) con dominios PH de unión a GTPasas pequeñas; la activación de Rac1 por el GEF Vav modula la activación de Rho mediador importante en la dinámica del citoesqueleto, los GEF de la familia zizimin activan Cdc42 responsable del alargamiento de pseudopodos; estos procesos concluyen en la formación de un fagosoma, a partir de lo cual efectores de PtdIns modulan su reciclamiento membranar mediado por EFA y GRP1 (GEFs) activadores de Arf6; o la maduración del fagosoma inducido por Rac1, SHIP y la activación de la PI3KIII que junto con Rab5 adquieren marcadores característicos (EEA1, Hrs, PtdIns 3-P) y un pH bajo, que tras su fusión con un lisosoma conducirá la degradación del material ingerido.

Regulación de la exocitosis

La exocitosis de vesículas en procesos como la degranulación de mastocitos y basófilos y la translocación de transportadores de glucosa GLUT-4 contenidos en vesículas endosomales son modulados por la acción de la PI3k-IA y sus efectores en presencia de insulina; así como en la liberación de gránulos neurosecretores se encuentra mediada por PI3K-II (PI3K-C2 α) generando PI3P que influyen en los niveles de ATP y la consiguiente liberación de vesículas (Lindmo *et al.*, 2005).

k. Receptores Fc (FcR)

Los receptores para la fracción cristalizable de inmunoglobulinas (FcR) son proteínas que se encuentran en la superficie de células inmunológicas, ejerciendo su papel como receptores específicos para la parte carboxilo terminal Fc (Fragmento cristalizable) de anticuerpos (Fig.9), que activan los mecanismos destructivos de las células fagocíticas y citotóxicas del sistema inmunológico frente al reconocimiento específico de antígenos, por medio de su fracción Fab (Fragmento de unión al antígeno) en la activación de una respuesta inmunológica (Mora, 2009).

La interacción de los FcR con los anticuerpos estimula células fagocíticas o citotóxicas para la destrucción de microorganismos o células infectadas a través de mecanismos como:

- Fagocitosis
- Liberación de metabolitos proinflamatorios
- Modulación de la proliferación celular y diferenciación
- Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA)
- Activación del complemento

Así, estos receptores de origen hematopoyético presentes en el linaje linfóide y mieloide juegan un papel central durante la respuesta inmune, ya que son el vínculo en la respuesta humoral y la actividad celular.

En humanos se conocen cinco clases de receptores Fc dependiendo el tipo de inmunoglobulina al que se asocia: Para IgA, Fc α R; IgD, Fc δ R; IgE, Fc ϵ R; IgG, Fc γ R; IgM, Fc μ R.

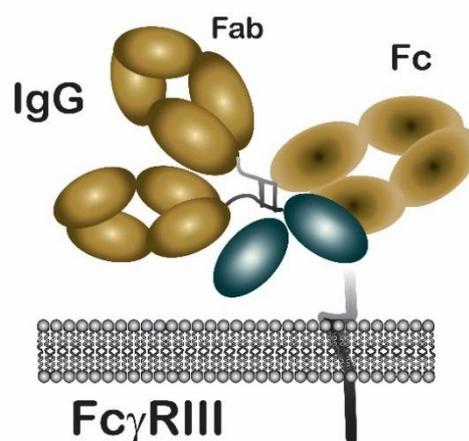


Fig. 9 Interacción entre receptor Fc e IgG. Modificado de Sautés, et al., 2003.

Dentro de la familia de receptores para IgG, FcγR, se han descrito tres clases en humanos: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) (Fig. 10.). Estos receptores pertenecen a la superfamilia de moléculas tipo inmunoglobulinas (IgG) y difieren tanto en su avidéz relativa por las cadenas pesadas de diferentes subclases de IgG, como en su expresión en diferentes tipos celulares (Mora, 2009).

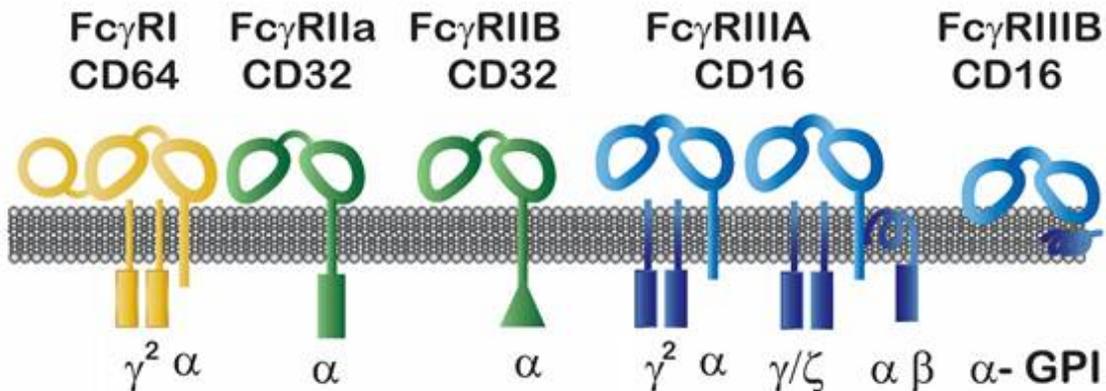


Fig.10. Familia de receptores FcγR. Modificado de Mark, et al., 2012.

Todos los receptores para el Fcγ contienen una cadena α, de unión a su ligando IgG, la variación estructural de esta cadena define las diferencias en las especificidades o afinidades de cada receptor frente a varios isotipos IgG; la región citoplasmática ejerce su función como transmisora de señales. En todos los FcR excepto los FcγRII, la cadena α se encuentra asociada a una o más cadenas polipeptídicas adicionales implicados en la transducción de señales (Abbas *et al.*, 2012).

FcγRI (CD64), es el principal receptor del Fcγ del fagocito. Expresado principalmente en macrófagos y neutrófilos. Se considera como receptor de afinidad alta que une IgG1 e IgG3 monomérica con una Kd de 10^{-8} a 10^{-9} M. La región extracelular amino terminal de la cadena α presenta tres dominios en tándem similares a Ig. La cadena α se asocia a un homodímero (unido por enlaces disulfuro) de la proteína transductora de señales llamada cadena γ del FcR, esta cadena también se encuentra en los complejos transductores de señales asociados a FcγRIII, FcαR y FcεRI. La cadena γ posee un amino extracelular y un carboxilo terminal citoplasmático con una estructura de activación con dominios, ITAM (del inglés, immunorreceptor tyrosine-based activation motif), homologa a la cadena ζ del complejo TCR

que acopla el agrupamiento de receptores a la activación de proteínas tirosina cinasas (Abbas et al., 2012), que desencadenan las cascadas de señalización.

El FcγRII (CD32), se considera como un receptor de baja afinidad a los isotipos de IgG1 e IgG3 con una $K_d=10^{-6}$ M. La duplicación y diversificación del gen da lugar a tres isoformas llamadas FcγRII A, B, y C, las cuales presentan dominios extracelulares y especificidades por el ligando similares pero difieren en su estructura citoplasmática, distribución celular y función. El FcγRIIA se expresa en neutrófilos y fagocitos mononucleares donde desencadena la fagocitosis de partículas opsonizadas. El FcγRIIC se expresa en los fagocitos mononucleares, neutrófilos y linfocitos NK, ambos FcγRIIA y C contienen dominios ITAM citoplasmáticos que al ser agrupadas por partículas o células cubiertas de IgG1 e IgG3 pueden enviar señales activadoras a los fagocitos (Abbas et al., 2012).

El FcγRIIB es un receptor inhibitorio expresado en todas las células inmunitarias, ya que posee un dominio citoplasmático ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif), y es el único receptor inhibitorio de Fc situado en Linfocitos B.

El FcγRIII (CD16) es un receptor de afinidad baja para la IgG, su porción extracelular presenta dos dominios Ig de unión al ligando su afinidad y especificidad por la IgG es similar a la del FcγRII. Este receptor existe en dos formas, cada una codificada por un gen separado.

La isoforma FcγRIIIA es una proteína transmembranal expresada, principalmente en linfocitos NK. El FcγRIIIA se asocia a homodímeros de cadena γ y del FcR, homodímeros de la cadena ζ del TCR o heterodímeros de la cadena γ y del FcR y la cadena ζ. Esta asociación es necesaria para que las señales activadoras intracelulares se envíen a través del ITAM en estas cadenas transmisoras de señales (Abbas et al., 2012).

La isoforma FcγRIIIB se encuentra presente en neutrófilos carece de porción citoplasmática y se une a la membrana por medio de un enlace glicosilfosfatidilinositol (GPI), actualmente no se conocen otras subunidades asociadas a este receptor; sin embargo se considera su cooperación con otros receptores. Su función se conoce poco ya que no media la fagocitosis ni activa al neutrófilo (Abbas et al., 2012).

Los receptores Fc son activados de manera óptima por anticuerpos unidos a sus antígenos, no por anticuerpos circundantes de forma libre y la mayoría activa a las células que los expresan.

Receptores Fc en células tumorales

Se ha establecido que células normales y tumorales presentan receptores Fc γ (Sevennevig, 1982; Wallace, 1994) similares en su naturaleza y propiedades, ya que son capaces de responder a IgG, con características y propiedades compartidas entre tejidos linfáticos, linfocitos de sangre periférica, monocitos y células malignas (Tonder *et al.*, 1974).

La presencia de estos receptores Fc en células tumorales ha vinculado las funciones efectoras de estos receptores Fc con el desarrollo de estrategias para escapar de la inmunidad celular antitumoral, disminuyendo la susceptibilidad del tumor a las repuestas efectoras innatas dependientes de Fc γ R. En la progresión del melanoma, existe un desarrollo de inmunidad antitumoral con la producción de anticuerpos, sin embargo se ha reportado que durante la progresión tumoral las células metastásicas de melanoma expresan el Fc γ RIIB1, isoforma inhibitoria de Fc γ R que las provee de protección frente a las lisis celular por células NK mediante la CCDA; (Casard *et al.*, 2008). Algunos estudios han vinculado la expresión de receptores Fc con mecanismos de infección viral demostrando que el Fc γ RIII (CD16) es uno de los receptores altamente involucrados en la interacción de partículas del virus VPH 16 conformadas por proteínas de la cápside L1 y L2 con células inmunológicas que presentan marcadores como el MCHII, CD80 y CD86 así como en células epiteliales, considerando que el receptor CD16 podría actuar como una molécula accesoria que contribuye a la inmunogenicidad del VPH (Da Silvia *et al.*, 2001).

Se ha planteado el empleo de estos receptores Fc como blancos de complejos inmunológicos mediante la entrega de sustancias antitumorales usando un complejo común de antígeno-anticuerpo como transportador de la sustancia antitumoral, desarrollando así sistemas de entrega de fármacos mediados por FcR, relevantes en campos de inmunología y quimioterapéutica (Shen *et al.*, 1984; Yashwant *et al.*, 1997).

I. Vías de señalización de receptores Fcγ (FcγRIII)

La vía de señalización desencadenada tras la interacción entre los receptores FcγRIII con inmunoglobulinas (Ig) (Fig. 11), lleva a cambios moleculares, induciendo a la activación de cinasas de la familia Src, principalmente Hck, Fgr y Lyn encontradas cerca de la porción citoplasmática de los receptores, los cuales se localizan cerca de balsas lipídicas; estas cinasas Src, fosforilan las secuencias ITAM del receptor o cadenas asociadas formando sitios de unión para regiones SH2 de la cinasa SyK, molécula central de las vías de señalización, que lleva a la fosforilación y activación del complejo SLP6/LAT/Gads, iniciando múltiples respuestas como el reclutamiento de proteínas como la fosfolipasa Cy1 (PLCγ1), que genera segundos mensajeros como el inositolfosfato y diacilglicerol, causantes de la liberación de calcio intracelular y activación de la proteína cinasa C (PKC), la cual lleva a la activación de las cinasas mitogénicas ERK y p38. Por otro lado la activación de Vav, factor intercambiador de nucleótidos de guanina, activa proteínas G pequeñas como Rho y Rac, involucradas en la regulación del citoesqueleto de actina (Mora, 2009). Sin embargo otras enzimas como la cinasa de tirosina de Bruton (Btk) y la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), son capaces de activar a Rac y factores nucleares como el NF-κB (Mora, 2009).

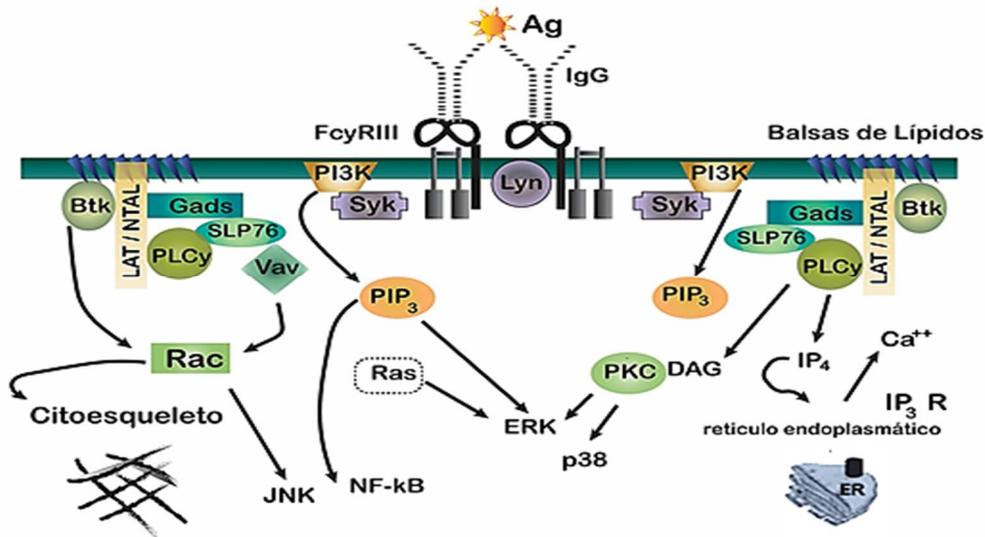


Fig. 11. Vía deseñalización de receptores Fcγ (FcγRIII). La unión de IgGs a receptores Fc localizados en balsas lipídicas induce a la activación de cinasas de la familia Src (Hck, Fgr y Lyn) las cuales fosforilan secuencias ITAM del receptor o cadenas asociadas formando sitios de unión para regiones SH2 de la cinasa SyK, responsable de la activación del complejo SLP6/LAT/Gads, que recluta a proteínas como la fosfolipasa Cy1 (PLCγ1), generadora de PIP3 y DAG, causantes de la liberación de calcio intracelular y activación de la PKC, activadora de ERK y p38. Por otro lado la activación de Vav, activa a Rho y Rac, involucradas en la regulación del citoesqueleto de actina. Tomada de Mora (2009).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A nivel mundial el cáncer cérvico-uterino es la tercera causa de mortalidad en la población femenina y representa más del 24% de las neoplasias malignas reportadas en México

Considerando el elevado porcentaje de mortalidad por CaCu, se han desarrollado diversas terapias como: la cirugía, radioterapia, inmunoterapia y quimioterapia; además del desarrollo de numerosos fármacos antitumorales, sin embargo su administración vía sistémica no alcanza largos periodos de duración debido a su metabolismo y excreción por el organismo, además su falta de especificidad expone a células normales a citolíticos, citostáticos y citotóxicos capaces de ocasionar cambios estructurales, lo cual desencadena severos efectos secundarios. Frente a esto, el uso de la nanobiotecnología ha desarrollado sistemas para dirigir fármacos antitumorales a tejidos específicos, impulsando la búsqueda de mecanismos para la liberación controlada de fármacos disminuyendo los efectos en células normales, manteniendo y aumentando su actividad antitumoral.

El empleo de liposomas como biotransportadores de sustancias antitumorales presenta diversas ventajas que han impulsado la búsqueda de constituyentes que proporcionen una mayor estabilidad estructural y especificidad, lo que ha llevado a la formulación liposomal con un lípido cíclico implicado en la activación de la vía de señalización PI3K/Akt, involucrada en la dinámica del citoesqueleto, tráfico vesicular y activación de receptores inmunológicos tales como FcγRIII.

Se ha demostrado que la presencia de FcγRIII (CD16) en células tumorales no hematopoyéticas podría conferir protección frente al reconocimiento por el sistema inmunológico; sin embargo, el incremento de la expresión de estos receptores frente a una terapia inmunológica podría hacer más susceptible a las células a un ataque inmunológico.

Por lo anterior, en el presente estudio se analizó el efecto de una nueva formulación liposomal sobre la expresión receptores inmunológicos FcγRIII en la superficie celular y la posible activación de Akt.

IV. HIPÓTESIS

- * La administración de liposomas formulados a células de carcinoma de cérvix tendrá un efecto sobre la expresión de CD16 en la superficie celular, posiblemente a través de la activación de la cinasa Akt.

V. OBJETIVO

- * Determinar el efecto de liposomas formulados sobre la expresión de FcγRIII (CD16) y la participación de la cinasa Akt en líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

- * Determinar el efecto de liposomas formulados, sobre la expresión de receptores inmunológicos FcγRIII (CD16).
- * Analizar el mecanismo de expresión de receptores FcγRIII (CD16).
- * Determinar la activación de la cinasa Akt en respuesta a la administración de liposomas formulados.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

a. Cultivo celular.

Como material biológico se emplearon las líneas celulares CALO e INBL, ambas presentan HPV18, derivadas de carcinoma escamoso invasor de cérvix estadio IIB y IVB, respectivamente (Caceres *et al.*, 2001); obtenidas de biopsias de mujeres mexicanas y actualmente criopreservadas en la Unidad de Investigación de Diferenciación Celular y Cáncer en la FES. Zaragoza, UNAM. Las líneas celulares fueron cultivadas en un medio de RPMI 1640 al 10% de SFB (suero fetal bovino) y monocitos obtenidos de sangre periférica, cultivados con RPMI 1640 al 20% con SFB en condiciones de 37° C y 5% CO₂.

b. Reactivos y anticuerpos

LIPOSOMAS: convencionales con fosfolípidos y formulados, donados por la M. en C. Rosalva Rangel Corona, laboratorio de oncología celular 4 P.B UMIEZ, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Verseno, medio RPMI 1640 (Microlab) Suero Fetal Bovino (invitrogen), Bufer de fosfatos salino (PBS), PBS: 5% SFB, saponina 0.3% (Sigma), saponina 0.1%-PBS, metanol 100% (J.T. Baker), paraformaldehído 4% (J. T. Baker), anticuerpo murino monoclonal anti-humano FcγRIII (anti-CD16-PerCP (sc-20052), anticuerpo dirigido a Akt isoforma 1 hecho en ratón, anticuerpo dirigido a Akt fosforilada (Akt-P) hecho en conejo, anticuerpos anti-conejo y anti-ratón conjugados con FITC, (todos Santa Cruz Biotechnology, USA).

c. Tratamientos

Para dilucidar el efecto de los liposomas formulados se realizaron seis tratamientos con una duración de 30 minutos para las líneas celulares CALO, INBL y Monocitos obtenidos de sangre periférica; los cuales fueron células sin teñir (células solas), un isotipo IgG, células marcadas con CD16 para la determinación del nivel en su expresión normal, células tratadas con un lípido cíclico, liposomas formulados y liposomas convencionales solos.

d. Técnicas de bioquímica para el análisis de proteínas por citometría de flujo.

Detección de proteínas extracelulares por citometría de flujo.

Para evaluar la expresión de FcγRIII (CD16) en células de cáncer cérvico-uterino CALO, INBL y monocitos se empleó la técnica de citometría de flujo. Los tratamientos mencionados anteriormente se incubaron por 30 minutos, posteriormente se realizó una tinción con el anticuerpo CD16 (FcγRIII) conjugado con Per C-P (sc-20052) en PBS con 5% de SFB (1:10) incubado por 60 minutos, seguido de su fijación con paraformaldehído al 1% en PBS por 10 minutos para la posterior lectura en el citómetro FACS Aria II. Los datos obtenidos fueron analizados mediante el programa Flowing Software 2.5.1.

Evaluación de proteínas fosforiladas por citometría de flujo.

Para evaluar la participación de la proteína PI3K, se evaluó la actividad de Akt por citometría de flujo. Al concluir el tiempo de estímulo aplicado, las células se lavaron dos veces con PBS a 4°C, se fijaron con paraformaldehído al 2% a 4°C, se permeabilizó con metanol al 100%, el cual debe estar a -20°C durante 15 min; se realizaron dos lavados con PBS al 5% de SFB para eliminar completamente el metanol, posteriormente se incubó con el anticuerpo primario Akt-1 ó p-Akt 1/2/3 a una concentración de 1:100 (α- Akt o Akt-P : PBS-SFB 5%) durante 1 hora en oscuridad en agitación a 4°C, se realizaron dos lavados con PBS:SFB 5%, posteriormente se incubó 45 minutos con el anticuerpo secundario α- ratón ó α- conejo conjugado con FITC a una concentración 1:500 con PBS-SFB 5%, en oscuridad y agitación a 4°C, se realizaron 2 lavados con PBS-SFB 5%, las células se fijaron con paraformaldehído 2% para su posterior lectura en el citómetro de flujo FACS Aria II.

Determinación del radio de fosforilación.

Para determinar el radio de fosforilación de la proteína Akt-1 se tomó como control el nivel de expresión basal de esta proteína determinado por el anticuerpo Akt dirigido a la isoforma 1 (Akt-1), asignándole el valor del 100%; se correlacionó con la cantidad de proteína fosforilada determinada por el anticuerpo p-Akt dirigido a las isoformas 1/2/3 (p-Akt 1/2/3), relacionando la región delimitada por la intensidad de fluorescencia correspondiente a Akt1 con la región que le correspondía en la intensidad de fluorescencia emitida por p-Akt 1/2/3,

determinando de esta manera el porcentaje de fosforilación correspondiente a Akt-1, los eventos localizados fuera de esta región en el histograma corresponderían a la cantidad de Akt 2/3 fosforilada, presente en estas líneas celulares.

VIII. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

a. EXPRESIÓN DE CD16 (FcγRIII)

Con la finalidad de analizar el efecto de liposomas formulados sobre la expresión de receptores FcγRIII se incubaron las líneas celulares CALO e INBL en presencia de liposomas catiónicos y liposomas formulados.

Expresión de CD16 (FcγRIII) en las líneas celulares CALO e INBL. El tratamiento con liposomas formulados, incrementa el nivel de expresión basal de FcγRIII (CD16) en las líneas celulares, CALO (Fig. 12.B) e INBL (Fig. 13.B); en la figuras 12.E y 13.E se observa el porcentaje de incremento en la líneas celulares CALO con un 51.2% y 44.47% en INBL, respectivamente. El nivel de expresión basal de CD16 se muestra en Fig. 12.A (CALO) y Fig. 13.A (INBL), el cual no presenta una diferencia significativa en ningún otro tratamiento aplicado en las líneas celulares CALO (fig. 12.C) e INBL (Fig. 13.C).

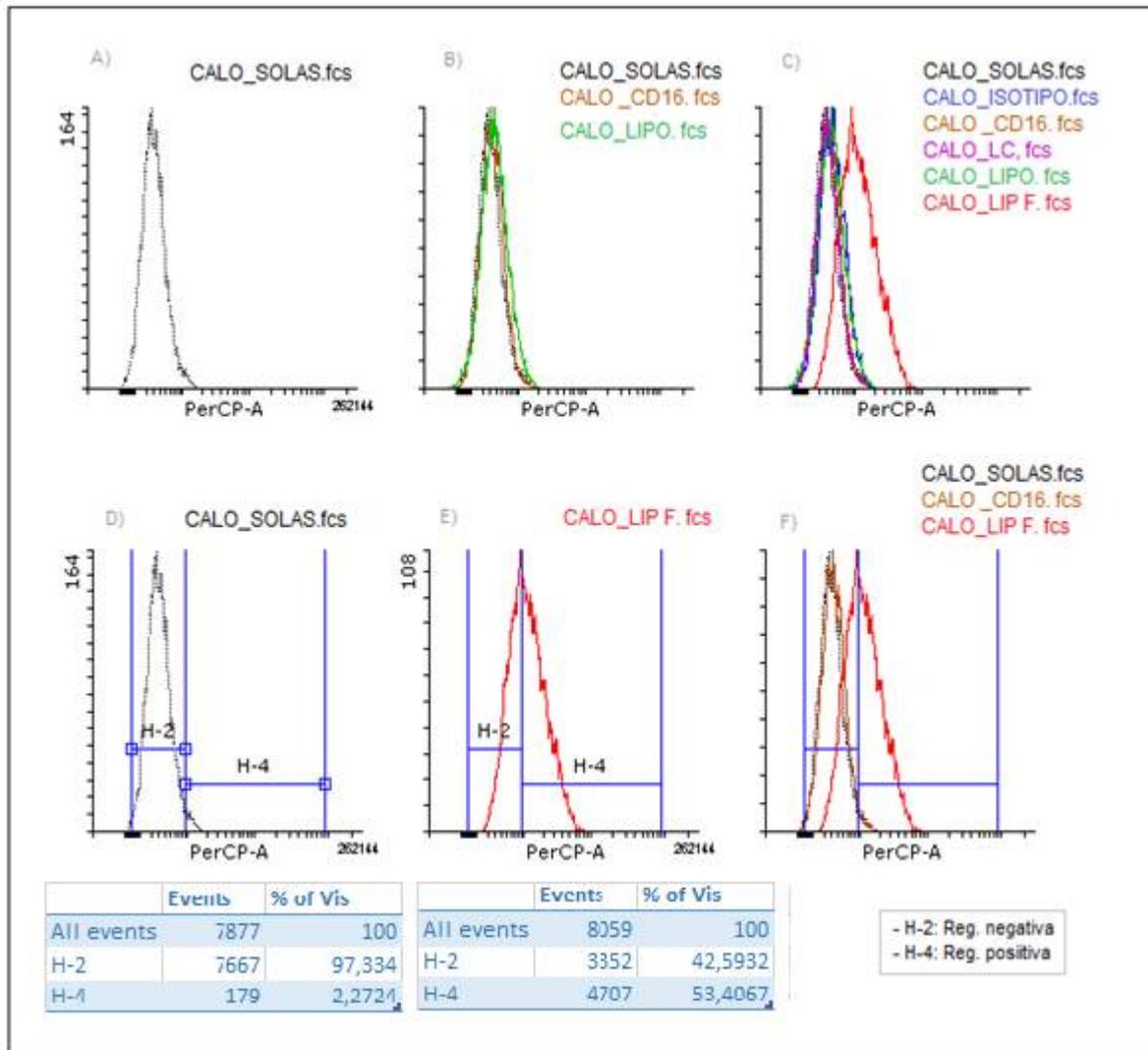


Fig 12. Expresión de CD16 (FcγRIII) en CALO frente a tratamientos (A, B y C). Análisis de la expresión de CD16 (FcγRIII) en CALO. Región negativa (H-4), representada por células sin teñir y región positiva (H-5), representada por células teñidas con anti-CD16 conjugado con PerCP (D, E y F). Tratamientos CALO_SOLAS (células sin teñir), CALO_ISOTIPO (isotipo de IgG), CALO_CD16 (expresión basal del receptor CD16), CALO_LIPO (administración de liposomas convencionales), CALO_LC (tratamiento con el lípido cíclico), CALO_LIP F (tratamiento con liposomas formulados).

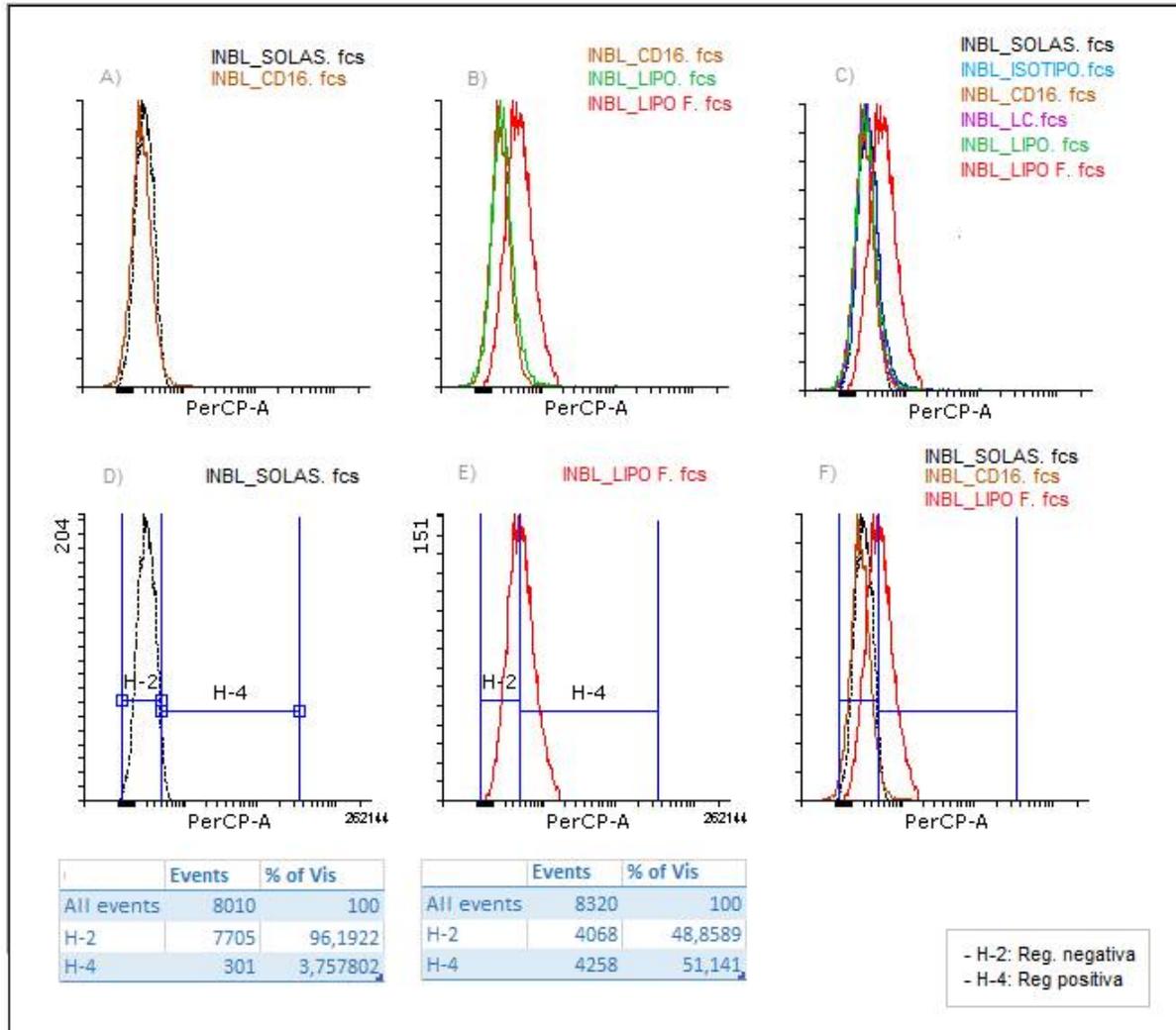


Fig 13. Expresión de CD16 (FcγRIII) en INBL frente a tratamientos (A, B y C). Análisis de la expresión de CD16 (FcγRIII) en INBL. Región negativa (H-3), representada por células sin teñir y región positiva (H-4), representada por células teñidas con anti-CD16 conjugado con PerCP (D, E y F). Tratamientos INBL_SOLAS (células sin teñir), INBL_ISOTIPO (isotipo de IgG), INBL_CD16 (expresión basal del receptor CD16), INBL_LIPO (administración de liposomas convencionales), INBL_LC (tratamiento con el lípido cíclico), INBL_LIP F (tratamiento con liposomas formulados).

Expresión de CD16 (FcyRIII) en monocitos. Se emplearon monocitos obtenidos de sangre periférica para seleccionarlos como nuestro control de células normales y positivas para CD16 (Fig. 14). El tratamiento de liposomas formulados administrados a células monocíticas obtenidas de sangre periférica, incrementaron un 84.8% la expresión de FcyRIII (Fig. 14.G); el tratamiento con liposomas convencionales incrementó la expresión de este receptor inmunológico en un 10.7% (Fig.14.F), del nivel de expresión basal de FcyRIII ya que estas células presentan la expresión de FcyRIII de manera constitutiva en un 7.17% (Fig. 14.E).

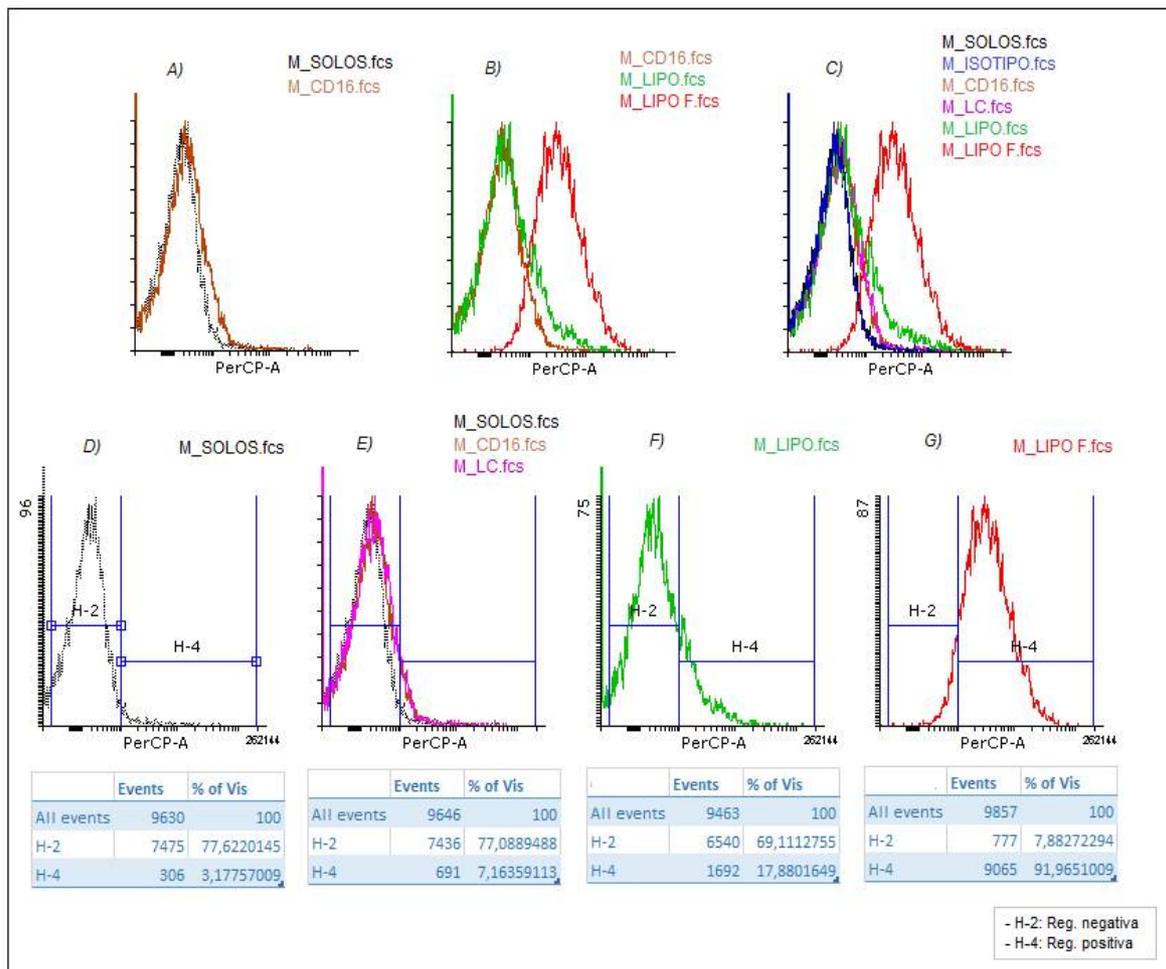


Fig 14. Expresión de CD16 (FcyRIII) en Monocitos (A, B y C). Análisis de la expresión de CD16 (FcyRIII) en monocitos Región negativa (H-4), representada por células sin teñir y región positiva (H-5), representada por células teñidas con anti-CD16 conjugado con PerCP (D, E, F y G). Tratamientos M_SOLAS (monocitos sin teñir), M_ISOTIPO (isotipo de IgG), M_CD16 (expresión basal del receptor CD16), M_LIPO (administración de liposomas convencionales), M_LC (tratamiento con el lípido cíclico), M_LIP F (tratamiento con liposomas formulados).

b. PARTICIPACIÓN DE PI3K.

Para determinar el efecto de la formulación liposomal sobre la activación de la PI3K se evaluó la proteína Akt y Akt-fosforilada (pAKT) en las líneas celulares de cáncer cérvico-uterino CALO e INBL, mediante citometría de flujo.

Fosforilación de la cinasa Akt en las líneas celulares CALO e INBL.

Los tratamientos administrados a las líneas celulares CALO (Fig. 15.C) e INBL (Fig. 16.C) no mostraron efecto sobre la activación de la cinasa Akt.

Las células CALO e INBL muestran la presencia de Akt fosforilada de manera constitutiva, CALO Fig 15.A e INBL Fig. 16.A.

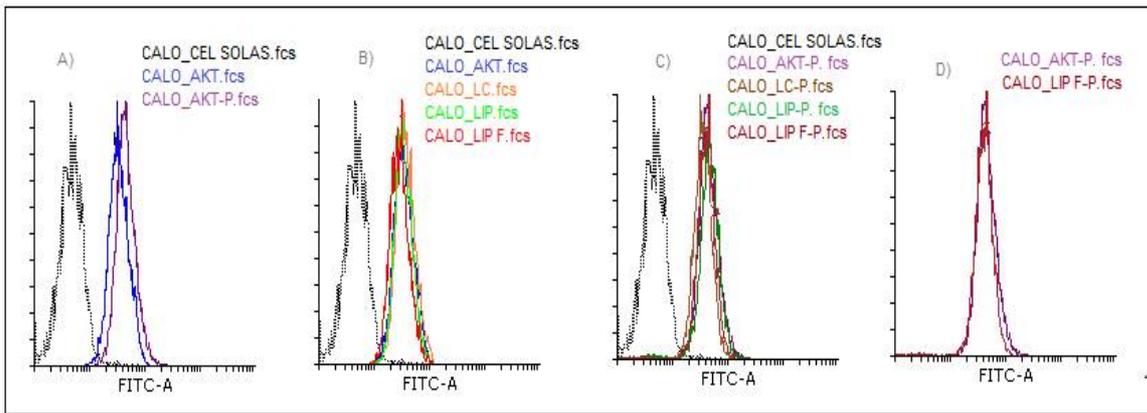


Fig 15. Fosforilación de la cinasa Akt en la línea celular CALO

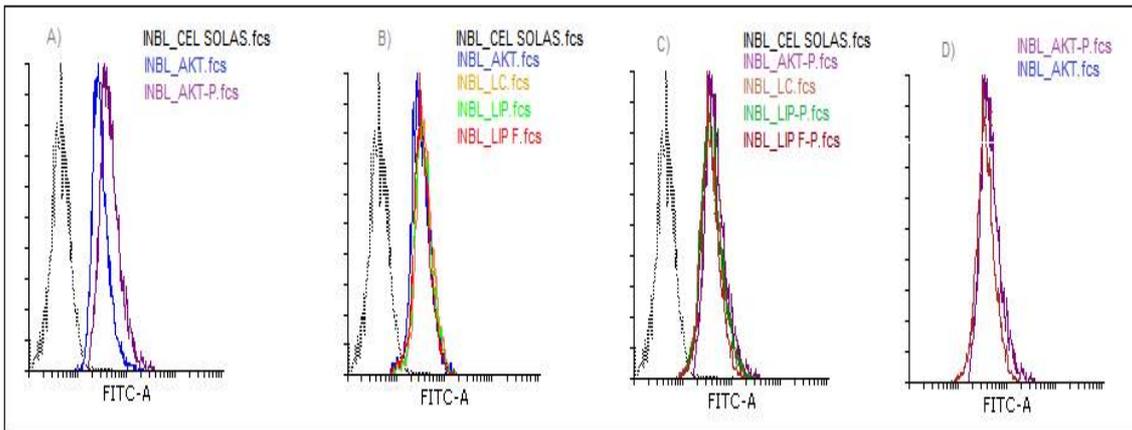


Fig 16. Fosforilación de la cinasa Akt en la línea celular INBL.

Para determinar el radio de fosforilación de Akt1 así como la proporción promedio de proteína fosforilada correspondiente a la isoforma 1 e isoformas 2/3 de la cantidad de total de proteína Akt-fosforilada se tomó un mínimo de 3 experimentos, considerando sus coeficientes de variación obteniendo los siguientes resultados.

Radio de fosforilación.

Los ensayos realizados para determinar el radio de fosforilación constitutiva de Akt-1 presentaron un coeficiente de variación del 33% en la línea celular CALO y un 26% en la línea celular INBL (Fig. 17); se consideró como control la cantidad de total de Akt1 presente en CALO (Fig. 18.A) e INBL (Fig. 19.A), delimitando su región correspondiente para correlacionarla con la cantidad total de proteína fosforilada (p-Akt 1/2/3) en estas líneas celulares CALO (Fig. 18.B) e INBL (Fig. 19.B), determinando que del 100% de la proteína Akt1 presente en estas líneas celulares el 0.65 en CALO y el 0,77 en INBL se encuentra fosforilada de manera constitutiva.

Proporción de p-Akt correspondiente a cada isoforma.

Con un coeficiente de variación entre ensayos de 34% en la línea celular CALO y un 29% en la línea celular INBL se determinó que de la cantidad total de proteína Akt-fosforilada el 54% en CALO y el 78% en INBL corresponde a Akt 1; así como el 46% en CALO y el 22% en INBL a las isoformas de Akt 2 y 3 (Fig 18.B y 19.B), esquematizado en Fig. 20 y 21.

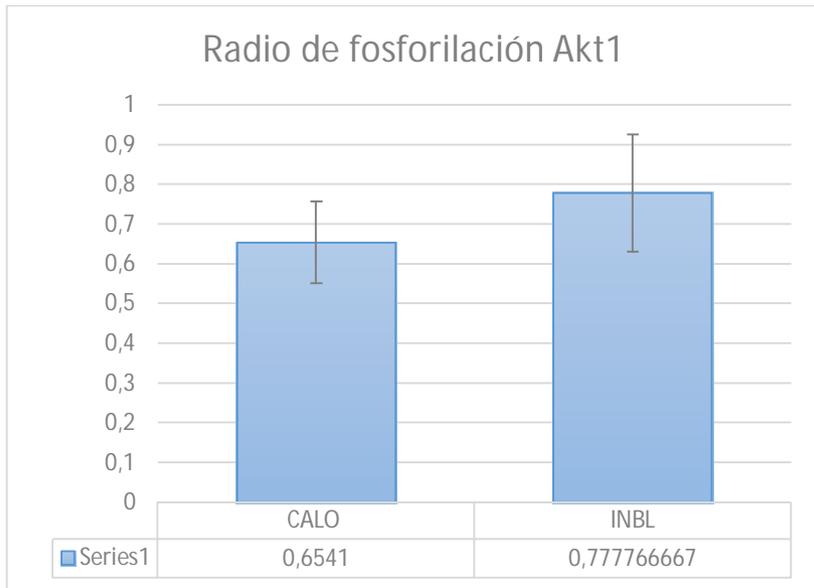


Fig. 17. Radio de fosforilación constitutiva de Akt-1. Realizado al correlacionar la cantidad de Akt1, con la cantidad de p-Akt1, correspondiente a cada línea celular. Determinando que del total de Akt1 presente en CALO el 0,65 se encuentra fosforilado y en la línea INBL un 0,77. CV entre ensayos del 33% en CALO y un 26% en INBL

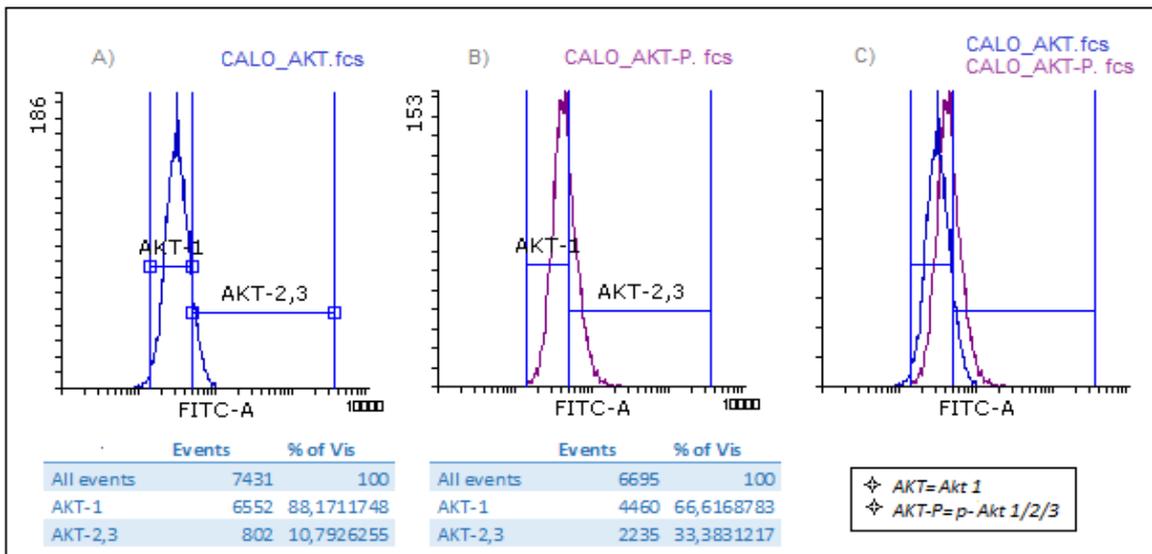


Fig. 18. Análisis de la fosforilación constitutiva de la cinasa Akt en la línea celular CALO. A) intensidad de fluorescencia emitida por el anticuerpo dirigido a Akt1. B) Intensidad de fluorescencia emitida por el anticuerpo p-Akt 1/2/3 el cual muestra la cantidad total de p-Akt. C) sobre posición de las intensidades de fluorescencia para determinar la proporción correspondiente a p-Akt1 y p-Akt2/3 de la fosforilación total.

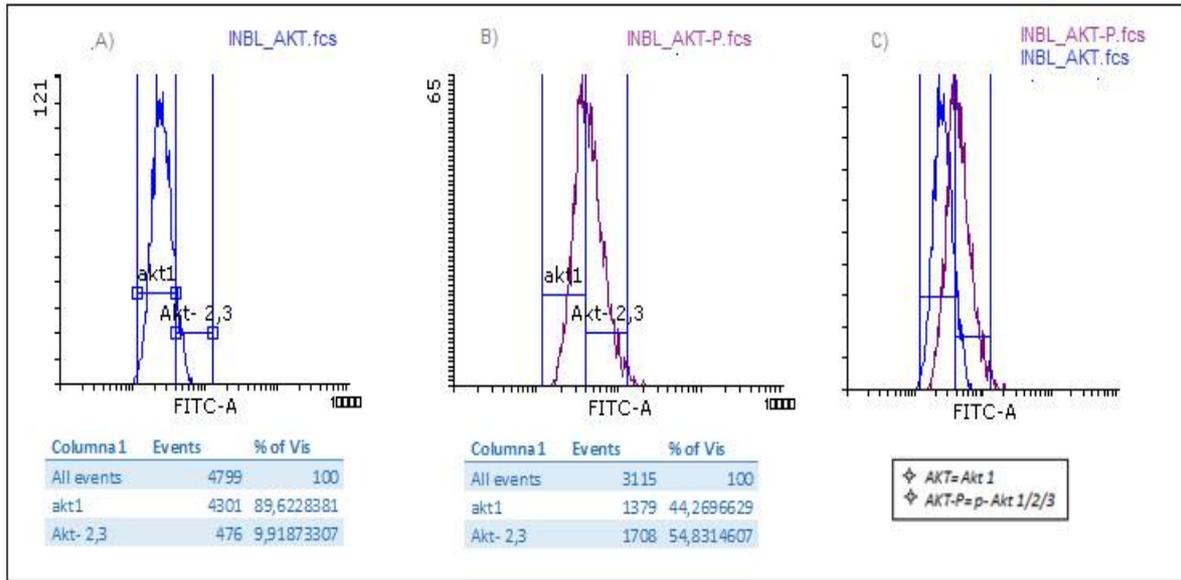


Fig. 19. Análisis de la fosforilación constitutivo de la cinasa Akt en la línea celular INBL. A) intensidad de fluorescencia emitida por el anticuerpo dirigido a Akt1. B) Intensidad de fluorescencia emitida por el anticuerpo p-Akt 1/2/3, el cual muestra la cantidad total de p-Akt. C) sobre posición de intensidades de fluorescencia que muestran la proporción correspondiente a p-Akt1 y p-Akt2/3 de la fosforilación total.

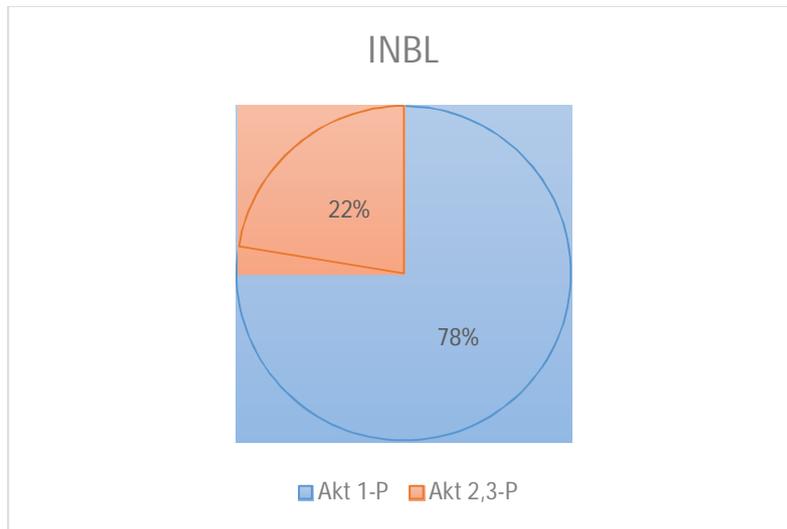


Fig. 20 Proporción del total de AKT-p en INBL correspondiente a las isoformas p-Akt 1 y p-Akt2/3. CV entre ensayos del 29%

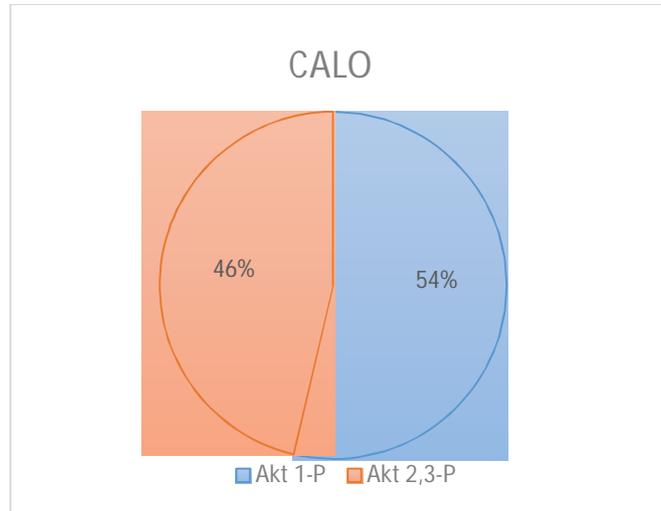


Fig. 21 Proporción del total de AKT-p en CALO correspondiente a las isoformas p-Akt 1 y p-Akt2/3. CV entre ensayos del 34%

IX. DISCUSIÓN

La capacidad de encapsular compuestos ha convertido a los liposomas en una herramienta importante para acarrear sustancias al interior de las células, constituyendo uno de los mejores sistemas acarreadores empelados en la liberación de fármacos, terapia génica y como coadyuvantes. El empleo de liposomas como transportadores de fármacos anticancerígenos, podría superar la falta de especificidad que presentan las terapias actuales evitando la exposición de células normales, e impulsar el desarrollo de la inmunoterapia al acarrear sustancias como citocinas que a altas dosis podrían desencadenar una respuesta inmunológica contra el tumor reduciendo sus efectos tóxicos colaterales y de las sustancias administradas logrando una mayor especificidad al aumentar su afinidad hacia las membranas de las células tumorales.

Se ha reportado el empleo de liposomas catiónicos como acarreadores de IL-2 en el tratamiento de ratones con tumores inducidos de CaCu, obteniendo una reducción de la masa tumoral y de los efectos colaterales de esta citocina (Hernández *et al.*, 2005 y Rangel, 2010). Lo que ha impulsado el desarrollo de diversas investigaciones basadas en las propiedades físico-químicas de las membranas celulares para búsqueda de constituyentes que modifiquen las propiedades físico-químicas mediando la capacidad de incorporación, estabilidad y distribución *in vivo* de estos biotransportadores (Lanio, *et al.*, 2009).

En este trabajo se evaluó el efecto de liposomas formulados, sobre la expresión del receptor inmunológico FcγRIII (CD16) y su capacidad para activar a PI3K en las líneas celulares de cáncer cérvix CALO e INBL.

Los liposomas formulados fueron administrados a las líneas celulares CALO e INBL por 30 min, y se midió el efecto sobre la expresión de receptores inmunológicos FcγRIII (CD16) mediante citometría de flujo. Los resultados mostraron que se requiere de la estructura del lípido cíclico unido al liposoma, para producir un efecto e incrementar el nivel de expresión basal de receptores FcγRIII ya que los tratamientos con liposomas convencionales y el tratamiento con el lípido cíclico carecieron de algún efecto.

La carga negativa de los liposomas conferida por el lípido incorporado a su formulación incrementaría la afinidad de estas nanopartículas a las membranas de las células tumorales CALO e INBL, debido a la inversión del potencial eléctrico que presentan las membranas de células tumorales (Sharma *et al.*, 2013), la incorporación de estas partículas podría desencadenar una modificación del citoesqueleto para la fusión de estas partículas con las membranas celulares; al interiorizarse el lípido presente en el liposoma podría incrementar los niveles normales de este componente al interior celular activando vías de señalización involucradas en el transporte vesicular de receptores a lo cual es atribuido el incremento de la expresión de FcγRIII en un 50.52% en la línea celular CALO y un 34.36% en INBL, destacando que la presencia de estos receptores inmunológicos en las líneas celulares se atribuye al fenotipo adquirido durante la transformación cancerígena debido al origen epitelial de las líneas celulares CALO e INBL.

Para determinar si el lípido cíclico presente en los liposomas podría interactuar como sustrato para la activación de la cinasa PI3K, se evaluó el efecto de los liposomas formulados con el lípido cíclico administrados a las líneas celulares CALO e INBL sobre la activación de Akt; observando que el lípido cíclico incorporado a la formulación liposomal, no activa la vía PI3K/Akt al no modificar el nivel de fosforilación basal de la proteína Akt.

Sin embargo la evaluación de la participación del lípido cíclico sobre la fosforilación de Akt no determina que este componente estructural del liposoma no pueda activar otras vías de señalización involucradas con proteínas que presenten dominios de unión a fosfoinosítidos como PH, FYVE, PX, ENTH (Knödler, 2005), SH2, PTB, dominios C2 ó menos específicos como grupos con residuos cargados positivamente (Cremona, 2001), sin excluir la activación de otras vías de señalización donde la PI3K ejerza su participación como, la vía de la fosfolipasa Cγ (PLC) la cual cataliza la formación de inositoltrifosfato y diacilglicerol a partir del fosfatidilinositol-4,5 bifosfato o relacionadas con el citoesqueleto de actina lo cual podría contribuir a la externalización de los receptores inmunológicos FcγRIII resguardados en vesículas al interior de la célula, esto podría involucrar la activación del tráfico vesicular donde la proteína AKT juega un papel principal en la modulación de este proceso, sin embargo esta actividad no es posible de apreciar en los resultados, estimando que el elevado porcentaje basal de Akt1 fosforilado que presentan las líneas celulares CALO e INBL podría ser suficiente para la

activación de este proceso, por lo cual no se puede observar un cambio en el nivel de fosforilación tras el incremento en la expresión de receptores FcγRIII.

Los ensayos realizados para la evaluación de Akt y p-Akt mediante citometría de flujo presentaron un CV alrededor del 30% lo cual, se considera óptimo para el análisis cuantitativo de los resultados (Nolan G., *et al.* 2003). Determinando que el ratio de fosforilación constitutiva de p-Akt1 en la línea celular CALO corresponde al 0.65 y en INBL al 0.77 del total de proteína Akt-1 presente en cada línea celular; lo cual se corrobora con resultados obtenidos anteriormente por nuestro grupo de trabajo donde se determinó la fosforilación constitutiva de Akt en las líneas celulares CALO e INBL mediante la técnica de Western-blot en la cual es posible apreciar cualitativamente una mayor cantidad de Akt fosforilada en la línea celular INBL que en CALO (Zerecero, 2014; Orduña, 2015).

En diferentes tipos de cáncer como el cáncer de pecho, de próstata y cervical se ha asociado la activación constitutiva de Akt con la progresión del cáncer, resistencia a agentes anticancerígenos y un mal diagnóstico; frente a lo cual se han realizado estudios para la determinar la función y el mecanismo de regulación de cada isoforma en la progresión del cáncer lo que ha determinado la relevancia de la isoforma Akt-2 en la modulación de la proliferación y supervivencia de células MDA-MB23 provenientes de cáncer de pecho (Lee *et al.*, 2011). Nuestros resultados muestran que la proporción del total de proteína Akt-fosforilada correspondiente a las isoformas presenta una fosforilación constitutiva de la isoforma Akt1 en la línea celular CALO del 54%, y en la línea celular INBL un 78%, así como de las isoformas Akt 2/3 en INBL un 22% y CALO un 46%; estas diferencias en las proporciones de proteína Akt fosforilada de cada isoforma podría vincularse con el grado de progresión tumoral ya que la línea celular INBL presenta un estadio IVB y CALO IIB.

Los datos obtenidos en esta investigación, resaltan la importancia de la nueva formulación liposomal como biotransportadores de sustancias anticancerígenas con una mayor afinidad hacia las membranas celulares, así como su empleo frente a una terapia dirigida al evidenciar fenotípicamente y talvez funcionalmente a células tumorales epiteliales a través de receptores Fc. Así como el complemento al conocimiento acerca de las vías de señalización como mecanismo que opera el comportamiento estas líneas de cáncer de cérvix que a un futuro ayude a erradicar esta enfermedad.

X. CONCLUSIONES

- Los liposomas formulados incrementan la expresión de receptores inmunológicos FcγRIII (CD16) en las líneas celulares de cáncer cérvico-uterino CALO e INBL así como en células monocíticas obtenidas de sangre periférica.
- El lípido de la formulación liposomal no interactúa como sustrato en la activación de la cinasa PI3K.
- Se propone un mecanismo de expresión de estos receptores mediante una modificación en el citoesqueleto de actina derivando en la activación del tráfico vesicular externalizando los receptores resguardados en vesículas al interior de la membrana celular.

XI. PERSPECTIVAS

- Debido a que el incremento de receptores CD16 tras la administración de liposomas formulados es atribuido a la intervención de un mecanismo de tráfico vesicular que sugiere la externalización de receptores localizados en vesículas intracelulares se sugiere el análisis mediante una tinción múltiple en la cual sea posible observar el cambio en la cantidad de receptores intracelulares a extracelulares tras la administración de los liposomas formulados y su efecto sobre los niveles de actina.
- El incremento de estos receptores inmunológicos en CALO e INBL, podrían funcionar como un carácter fenotípico aplicable al buscar diferencias significativas entre estas células tumorales y normales, para el desarrollo de terapias dirigidas, para lo cual se requiere determinar si estos receptores se encuentran funcionalmente activos.

XII. REFERENCIAS

Aguilera A, Beltran E, Higareda E, Pardo A. Cascada de transducción de señales: via PI3K involucrada en diferentes respuestas celulares. *Cien Nicolaita* 2005; 41:155-168.

Abbas k, Lichtman H, Pillai S. *inmunología celular y molecular*. 7ª ed. Elsevier. España. 2012; 273-275.

Aberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biología molecular de la célula*. Quinta edición. Omega. 2008; 617-650.

Barruti S. Breve historia del cáncer. *Gerontogeriatría on line*. 2012; Órgano oficial de la Federación Argentina de Geriatría y Gerontología y de la Asociación Gerontológica Argentina. <http://www.gerontogeriatría.org/component/content/article/42-recomendaciones/2009-breve-historia-del-cancer.html>

Bergers J, Den W, Dullens H, Kerkvliet C, Crommelin D. Interleukin-2 containing liposomes: interaction of interleukin-2 with liposomal bilayers and preliminary studies on application in cancer vaccines. *Pharm-R* 1993; 10: 1715-21.

Berridge M. 2014. *Cell signalling biology*. 2014; doi:10.1042/csb0001001 Disponible en: <http://www.biochemj.org> Cell Signalling Biology, 2014. http://www.biochemj.org/csb/002/csb002.htm#Inositol_lipid_metabolism

Bracke M, Nijhuis E, Willem J, Lammers J, Coffey J, Koenderman L. A critical role for PI3-kinase in cytokine induced Fc α -receptor activation. *Blood* 2000; 95(6):2037-2043.

Casard L, Cohen-Solal J, Fourmier E, Camiell-Broet S, Spatz A, et al., Selective expression of inhibitory Fc γ R by metastatic melanoma impairs tumor susceptibility to IgG-dependent cellular response. *J Cáncer* 2008; 123: 2832-2839.

Caceres C, Alvarado M, Waga K, Rangel C, Monroy G, *et al.* Implication of tyrosine kinase receptor and steel factor in cell density-dependent growth in cervical cancers and leukemias. *Cancer Res* 200; 61: 6281-9.

Cetina L, Ochoa F. Cáncer cervicouterino, aún el reto por vencer. *GAMO* 2014; 13:1-3

Coffer P, Jin J, Woodget J. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J* 1998; 335:1-13.

Cortés Y. Papilomavirus y Cáncer de Cérvix. *Rev Colomb Obstet Ginecol* 2003; 54: 107-112

Cornero A. The PI3K/AKT pathway in cancer. *Curr Pharm Design* 2010; 16:34-44

Corvera S, Arrigo A, Stenmark H. Fosfoinositides in membrane traffic. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 460-465

Cremona O, De Camilli P. Phosphoinositides in membrane traffic at the synapse. *J Cell Sci* 2001; 114: 1041-1052.

Da Silvia D, Velders M, Nieland J, Schiller J, Nickoloff B, Kast W. Physical interaction of human papilloma virus-like particles with immune cells. *Int Immunol* 2001; 13:633-641.

De la Cruz Hernández E, Mohar Betancourt A, Lizano Soberón M. Elementos víricos y celulares que intervienen en el proceso de replicación del virus del papiloma humano. *Oncology* 2004; 6:263-71

Díaz R, Faxas G, Arango P. Factores etiopatogenicos y moleculares en la génesis del cáncer. *Rev Cubana Oncol* 1998; 14:42-50

Ehrlich P. Biologische Therapie. *Int Wschr Wiss Kunst Tech* 1907; 1:125–32. Disponible en: [http://zl.elsevier.es/es/revista/enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28/cien-a%C3%B1os-bala-magica-dr.-ehrllich-%EF%BF%BD%EF%BF%BD\)-13155954-revisiones-2010#bib87](http://zl.elsevier.es/es/revista/enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28/cien-a%C3%B1os-bala-magica-dr.-ehrllich-%EF%BF%BD%EF%BF%BD)-13155954-revisiones-2010#bib87)

Ehrlich P. Experimental researches on specific therapeutics. Nueva York: Paul B. Hoeber; 1909. Disponible en: <http://www.archive.org/details/experimentalrese00ehrllich>.

Ghayad S, Cohen P. Inhibitors of the PI3K/AKT/mTOR pathway: New hope for breast cancer patients. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2010; 5: 29-57

Globalcan. 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx

Gutiérrez Y. Actividad antitumoral de la interleucina-2 recombinante libre y atrapada en liposomas en un modelo de linfoma subcutáneo murino. Tesis Maestría en ciencias Inmunología Universidad Autónoma de Nuevo León. México 1997.

Hernández J, Corona O, Ibañez H, Baeza R, Leyva S, Weiss S, Rangel C. caracterización de liposomas Catiónicos Como acarreadores de interleucina 2 (IL-2). XIV Congreso de Bioenergetica y Biomembranas. Sociedad Mexicana de bioquímica 2005. Oaxaca.

Kaye S. Liposome-problems and promises as selective drug carriers. *Cancer Treat Rev.* 1981; 8: 27-50

Kepczyński M, Nawalany K, Kumorek M, Kobierska A, Jachimska B, Nowakowska M. Which physical and structural factors of liposome carriers control their drug-loading efficiency?. *Chem Phys Lipids* 2008; 155: 7-15.

Knödler A, Mayinger P. Analysis of phosphoinositide-binding proteins using liposomes as an affinity matrix. *Biotechniques* 2005; 38:858-862

Krutzik P, Nolan G. Intracellular phospho-protein staining techniques for flow cytometry: monitoring single cell signaling events. *Cytometry* 2003; 55A:61-70

Lanio M, Luzardo M, Laborde R, Sánchez O, Cruz-Leal F, Tejuca M, Valle A, Alonso M, Fernández L, Alvarez C. Las vesículas liposomales: obtención, propiedades y aplicaciones potenciales en la biomedicina. *Cub Físic* 2009; 26:23-30

Lasic D. Liposomes in Gene Delivery. *Biophys J* 1998; 74:2138–2139.

Lee H, Santi S. ablation of Akt2 induces autophagy through cell cycle arrest, the downregulation of p70S6K, and the deregulation of mitochondria in MDA-MB231 cells. *Plos one* 2011; 6:e14614

Lemmon M. Phosphoinositide recognition domains. *Traffic* 2003; 4:201-213.

Lindmo K, Stenmark H. Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. *J Cell Sci* 2005; 119: 605-614

Luo J, Maning BD, Cantley L. Targeting the PI3K- AKT pathway in human cancer: rationale and premise. *Cancer cell* 2003; 4: 257-62

Maltese W, Overmeyer J. Non-apoptotic cell death associated with perturbations of macropinocytosis. *Front physiology* 2015; 6: 1-9

Majumder P. Akt-regulated pathways in prostate cancer. *Oncogene* 2005; 24:7465-7474.

Mora N, Rosales C. Funciones de receptores Fc en mecanismos de defensa y regulación inmunológica. *Invest Clin* 2009; 61:313-326.

Mule J, Shu S, Rosenberg S. The anti-tumor efficacy of lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin 2 in vivo. *J Immunol* 1985; 135: 646-652

Muñoz N. Papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 2000; 19: 1-5.

OMS. (2014). <http://www.who.int/cancer/about/facts/es/>

Orduña L. Evaluación del efecto de isondolonas sobre la proliferación de células de cáncer cérvico uterino. Tesis. QFB. UNAM

Pinzón C, Serrana M, Sanabria M. Papel de la vía de fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en humanos. *Rev Cienc Salud Bogota* 2009; 7: 47-66

Rangel C, Soto-Cruz I, Weiss S, Gil A, Corona O. Propuesta biotecnológica para el tratamiento del cáncer de cérvix uterino, empleando liposomas. *An Real Acad Farm* 2014; 80:179-191.

Shashi K. Satinder K. Bharat P. A complete review on: liposomes. *Int J Pharm* 2012; 3: 10-16

Sharma B. Peetla C. Adeji I. Labhasetwar V. Selective biophysical interactions of surface modified nanoparticles with cancer cell lipids improve tumor targeting and gene therapy. *Cancer Lett* 2013; 334: 228-236

Secretaría de Salud del Edo. de México
.2014.<http://salud.edomex.gob.mx/Html/article.php?sid=286>

SPPS. (2014). <http://www.spps.salud.gob.mx/noticias/1445-5-tipos-cancer-mas-afectan-mexicanos.html>

Subiza J, Medina M. Inmunoterapia del cáncer: nuevas estrategias experimentales. *Inmunologia* 1994; 13: 5-17

Svennevig J, Anderson T. Cells bearing Fc receptors in human malignant solid tumors. *Br J Cancer* 1982; 45:201-208

Tonder O, Morse P, Humphrey J. Similarities of Fc receptors in human malignant tissue and normal lymphoid tissue. *J Immunol* 1974; 113: 1162-1169.

Ulrich A. Biophysical Aspects of Using Liposomes as Delivery Vehicles. *Bioscience Rep* 2002; 22:129-150

Valle M, Weiss S. Origen Molecular del Cáncer. *Vertientes* 2003; 6:3-8

Victoria Z. Participación de la vía PI3K/Akt en la mediación del efecto citotóxico inducido por TNF- α ". Tesis Licenciatura. UNAM FES Zaragoza 2012

Walboomers J, Jacobs M, Manos M, Bosch F, Kummer J, Shah K, Snijders P, Peto J, Meijer C, Muñoz N. Human papillomavirus a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189:12-19

Wallace P, Howell A, Fanger M. Role of Fc γ receptors in cancer and infectious disease. *J Leukocyte Biol* 1994; 45:816-826

Yashwant M, Robert F, Roland R, Jan G. Clinical significance of IgG Fc receptors and Fc γ -directed immunotherapies. *Trends Immunol* 1997; 18:127-135

