



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA DE PUEBLA  
FACULTAD DE MEDICINA

---

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN

**“DETERMINACIÓN DE LAS POBLACIONES CELULARES NK, T<sub>c</sub> y MACRÓFAGOS  
EN EL INFILTRADO INFLAMATORIO INDUCIDO EN RATONES BALB/C INMUNIZADOS  
CON EL ANTICUERPO POLICLONAL ANTI-CGA-5 E IMPLANTADOS CON  
CÉLULAS TUMORALES GÁSTRICAS”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN

Presenta:

SILVIA SANCHEZ ALONSO

DIRECTOR:

D.C. MARIA ALICIA DIAZ Y OREA

CO-DIRECTOR:

D.C. EDUARDO GOMEZ CONDE

JULIO 2015. PUEBLA,PUE.



	INDICE	
INTRODUCCIÓN		5
ANTECEDENTES		
A) Generales		6
B) Específicos		14
JUSTIFICACIÓN		21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA		22
PREGUNTA CIENTÍFICA		22
HIPÓTESIS DE TRABAJO		23
OBJETIVOS		
A) General		23
B) específicos		23
MATERIAL Y MÉTODO		24
A) variable y escala de Medición		
B) Técnica y procedimiento		
C) Análisis de Datos		
LOGÍSTICA		25
A) Recursos Humanos		
B) Recursos Materiales		
C) Recursos Financieros		
CONSIDERACIONES ÉTICAS		27
RESULTADOS		28
DISCUSIÓN		38
CONCLUSIONES		40
BIBLIOGRAFÍA		41

# “DETERMINACIÓN DE LAS POBLACIONES CELULARES NK, Tc y MACRÓFAGOS EN EL INFILTRADO INFLAMATORIO INDUCIDO EN RATONES BALB C INMUNIZADOS CON EL ANTICUERPO POLICLONAL ANTI –CGA-5 E IMPLANTADOS CON CÉLULAS TUMORALES GÁSTRICAS”

Silvia Sánchez Alonso, María Alicia Díaz y Orea, Eduardo Gómez Conde.

## RESÚMEN

**ANTECEDENTES:** El cáncer es uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, entre ellos el Cáncer gástrico ocupa el 4º lugar en incidencia y es la segunda causa de muerte. Se han identificado diversos factores de riesgo para la presentación de la enfermedad entre ellos la infección por *Helicobacter pylori*, edad y asociación con alimentos. La aparición de las neoplasias involucra múltiples mecanismos celulares y moleculares, además de alteraciones en la inmunovigilancia, alteraciones genéticas y con ello cambios en el microambiente tumoral. Se han estudiado múltiples expresiones de las células tumorales, sin embargo pocos estudios han evaluado las proteínas de secreción excreción del microambiente tumoral, el efecto de los anticuerpos contra estos antígenos y la participación de células de la respuesta inmunológica humoral y celular. En el laboratorio Inmunología Experimental se están evaluando las propiedades inmunogénicas de proteínas de secreción-excreción obtenidas a partir de biopsias incisionales de pacientes con Cáncer gástricos, se han obtenido anticuerpos policlonales contra las proteínas reconocidas por los sueros de los pacientes con esta patología. En este proyecto, se evaluó la eficacia de uno de estos anticuerpos sobre tumores implantados en ratones Balb/C y la presencia de células inmunológicamente involucradas en la respuesta inflamatoria inducida por las células tumorales implantadas.

**OBJETIVO:** Determinar las poblaciones celulares NK, Tc y macrófagos en el infiltrado inflamatorio inducido en ratones Balb/C inmunizados con el anticuerpo policlonal anti –CGA-5 e implantados con células tumorales gástricas

**MATERIAL Y MÉTODO:** Estudio comparativo, experimental, transversal. Se emplearon ratones machos Balb/C, siguiendo todas las normas técnicas de manejo y mantenimiento de animales de laboratorio (NOM-033-ZOO-1999). Los ratones fueron asignados en forma aleatoria en 2 grupos control y problema 1 (anti CGA-5) se indujo inmunosupresión y posteriormente se implantaron células tumorales provenientes de tumores de pacientes con adenocarcinoma gástrico, los anticuerpos obtenidos en el laboratorio contra las proteínas identificadas por los pacientes se aplicaron a los ratones del grupo problema en 3 ocasiones. Los ratones fueron sacrificados al día 48, se obtuvieron los sueros de los ratones de todos los grupos, se realizó disección y toma de muestra de sitios con crecimientos nodulares o sospecha de ellos. Los fragmentos extraídos se incluyeron en parafina para después obtener los cortes de 4µm en laminillas cubiertas con poli.L lisina. Se determinaron las poblaciones celulares presentes utilizando anticuerpos monoclonales contra los marcadores de superficie CD16, CD68 y CD8 por inmunofluorescencia directa e indirecta. Los cortes se evaluaron en un microscopio invertido marca Zeiss, modelo AxioObserver, equipado con epifluorescencia y utilizando filtros de excitación 488 y 633 nm. Las imágenes fueron tomadas utilizando el software Axiovision SE64

RESULTADOS: En la necropsia se observaron nódulos tumorales encontrando cambios histológicos en los cortes obtenidos de las biopsias de los modelos murinos empleados desde hiperplasia linfoide hasta displasia. Las inmunofluorescencias de las poblaciones celulares reportaron el contenido de células CD 16 (NK) en el 57.9% de los modelos y 35.7% para CD68 (macrófagos). No Hubo expresión de CD8 esto probable a falta de reconocimiento del receptor para Tc y o mecanismos de evasión tumoral.

Conclusión: este experimento demuestra que la aplicación de células tumorales induce una respuesta inflamatoria con la participación de poblaciones celulares que pueden generar una respuesta de citotoxicidad mediada por anticuerpos.

## INTRODUCCIÓN

A pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento del cáncer, sigue siendo una importante enfermedad, que amenaza la vida. De acuerdo al reporte del 2008 de la OMS, 7.6 millones mueren al año por cáncer y en el 2030 aumentaran a 11 millones (Parkin., *et al* 2000, 2004). El cáncer gástrico es el 4º. Tipo de cáncer y la 2ª. Causa de mortalidad (740,000 defunciones en el 2008), con cerca de un millón de nuevos por año (Parkin *at al* 2000). Un número elevado de factores de riesgo están asociados a esta enfermedad tales como: alimentos ricos en nitratos o nitritos (alimentos a la parrilla, salados o en escabeche (Crew *et al* 2006), infección por *Helicobacter pylori* (Fuentes., *et al* 2009), la Edad (mayores de 60 años), con antecedentes de desórdenes de estómago o cáncer gástrico (Yamamoto *et al* 2001). Patológicamente, hay 2 tipos de cáncer gástrico: difuso e intestinal. El cáncer gástrico tipo difuso resulta de precursores o mecanismos genéticos o epigenéticos en las células stem epiteliales gástricas. El cáncer gástrico tipo intestinal está asociado con infección por *H. pylori*, gastritis, metaplasia intestinal y adenocarcinoma (Alterkruse., *et al* 2010).

### Clasificación de Lauren

PROFUNDIDAD DE LA INVASIÓN	PATRÓN DE CRECIMIENTO MACROSCÓPICO	SUBTIPO HISTOLOGICO
<b>Cáncer gástrico in situ</b>	Exofítico	INTESTINAL
<b>Cáncer gástrico precoz</b>	Plano o deprimido	DIFUSO
<b>Cáncer gástrico avanzado</b>	Excavado	

En estadios tempranos, muchos pacientes con cáncer gástrico (CaGas), son asintomáticos, lo que hace difícil, el diagnóstico, tratamiento y control de esta malignidad. Aunque hay algunas herramientas para el diagnóstico clínico, tales como la tomografía computarizada, el ultrasonido endoscópico, la resonancia magnética y la tomografía de emisión de positrones, las opciones de tratamiento, para cáncer gástrico, son muy limitadas. La cirugía o resección endoscópica son considerados los tratamientos predominantes para CaGas. Si el CaGas es detectado en estadios tempranos, la sobrevivida a 5 años es aproximadamente del 90% (Wanebo., *at al* 1993). En contraste, la sobrevivida a 5 años de pacientes con CaGas en estadio avanzado es menos del 10% (Hamashima., *et al* 2008). Son comunes, el pobre pronóstico asociado a la agresividad de la enfermedad. En los 15 años de historia del descubrimiento de los biomarcadores, un creciente número de proteínas se han utilizado como herramientas, para el diagnóstico clínico, en forma de potenciales biomarcadores de cáncer, por ejemplo el antígeno carcinoembrionario (CEA) para cáncer de colon, el antígeno CA-125 para cáncer de ovario, alfa fetoproteína para cáncer de hígado, antígeno específico de próstata (PSA)

para cáncer de próstata y el antígeno CA-19.9 para cáncer pancreático (Pounder., *et al* 2005, Jackson., *et al* 2008, Zabaleta.,*et al* 2010, Shimoyama., *et al* 2003, Ahmed., *et al* 2005, McClain., *et al* 2009). Desafortunadamente biomarcadores diagnósticos en CaGas, tales como el antígeno carcinoembrionario (CEA), el antígeno carbohidrato 19.9 (CA-19.9), y el antígeno carbohidrato 72-4 (CA 72.4), no son específicos ni sensibles, con una sensibilidad del rango del 18-57% (Khan., *et al* 2006). Consideramos, que estudios como western blotting e inmunohistoquímica, pueden ayudar a descubrir algunos biomarcadores potenciales, que jueguen un papel crucial en el manejo del cáncer. Hemos detectado 7 antígenos de secreción/excreción tumoral y hemos obtenido anticuerpos contra ellos. Nombrándolos como CGA-1, CGA-2, CGA-3 CGA-4, CGA-5 etc. (de cáncer gástrico proteína según PM). El anticuerpo anti-CGA-5 ha mostrado gran especificidad para detectar CGA tipo difuso por Inmunohistoquímica y CGA difuso e intestinal por la técnica de ELISA, por tal motivo, creemos que pueden ayudar en la detección temprana de la enfermedad y en el establecimiento de una nueva terapia para el cáncer gástrico con mayor especificidad y sensibilidad. En este proyecto, se estudiara el efecto del anticuerpo policlonal anti-CGA-5, que es reconocido por la mayoría de los sueros de los pacientes con cáncer gástrico difuso e intestinal, *in vivo* en ratones Balb/C

## ANTECEDENTES

### Generales

El cáncer es uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial; en este contexto el cáncer gástrico destaca como la segunda causa de mortalidad en el mundo con cifras de hasta 10.4% y es el tercero más frecuente (Parkin, *et al.*, 2004) Se han dirigido numerosos estudios de Investigación a fin de comprender su naturaleza y encontrar nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas que den solución a este problema. Se reportan 900,000 casos nuevos por año y 700,000 muertes por esta causa (Parkin., *et al* 2004). Sin embargo su incidencia parece incrementar cada año principalmente en países occidentales (Crew., *et al* 2006).

### EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER GÁSTRICO.

A pesar de que la incidencia del Cáncer gástrico ha ido descendiendo éste sigue siendo uno de los cánceres que más muertes provocan. La Incidencia es variable en todos los países. En México la incidencia es de 7859 casos por cada 100,000. Las variaciones respecto al género son escasas, siendo en los hombres dos veces más frecuente que en las mujeres. La mayor incidencia por edad se encuentra entre los 50 y 70 años de edad, con un pico máximo alrededor de los 60 años y es muy infrecuente antes de los 30 años. La región anatómica más afectada es el cardias y la menos frecuente es la de la región antral. En Estados Unidos se presenta una mortalidad de 11.1, en Inglaterra de 22.1 y en Japón de 100.2 por cada 100,000 habitantes.



Fuente: <https://deisyvb.wordpress.com/>

La mortalidad en México por tumores malignos se ha incrementado de 9.7% en 1990 a 12.9% en 2006. Debido al proceso de transición demográfica y epidemiológica actual, se prevé un predominio en adultos mayores, con el consecuente incremento del número de casos de cáncer y una mayor presión económica y demanda de servicios médicos (Fuentes., *et al* 2009).

En México el cáncer gástrico ocupa segundo lugar como causa de mortalidad por cáncer y es la primera causa de mortalidad dentro de las neoplasias de tubo digestivo. Nuestro país se considera un área de bajo riesgo con una tasa de mortalidad de 5 por cada 100,000. La incidencia en el país tiene gran variabilidad geográfica siendo Chiapas la mayor con 6.4 por cada 100,000 y el Estado de México de 2.5. (Fuentes., *et al* 2009).

#### VARIABILIDAD GEOGRÁFICA.

Las tasas de incidencia de cáncer gástrico varían hasta 10 veces en todo el mundo, casi dos terceras partes de cánceres de estómago se producen en países desarrollados y son Japón y Corea los países con las tasas más altas de incidencia, de manera contraria las tasas más bajas se encuentran en África del Norte, Norteamérica, el sur de Asia, Australia y Nueva Zelanda.

#### GÉNERO, ETNIA Y EDAD DE DISTRIBUCIÓN

Los carcinomas que no son del cardias tienen una proporción hombre-mujer de 2:1, las tasas de incidencia más altas son en la etnia negra y en grupos de nivel socioeconómico bajo. El pico de incidencia respecto al grupo etario es la quinta y séptima década de la

vida, siendo el mismo grupo de edad afectado en la mayoría de los reportes mundiales (Yamamoto., *et al* 2001).

El adenocarcinoma gástrico es el más frecuentemente de los cánceres de tubo digestivo y es reportado hasta en el 90%; de éste se distinguen dos tipos histológicos (de acuerdo a la clasificación de Lauren): el intestinal (bien diferenciado -50%) y el difuso (indiferenciado -33%), tienen distinta apariencia morfológica, patogénesis y perfil genético, el 17% restante es tipo mixto o no clasificado (Lauren 1965)

Debido a que en las etapas iniciales suele ser asintomático, éste no es detectado sino en sus estadios avanzados en relación con síntomas como dolor abdominal y pérdida de peso y con una sobrevida global desde el momento del diagnóstico a 5 años entre 10-20% (Altekruse., *et al* 2009; Hamashima., *et al* 2008). En países con alta incidencia de adenocarcinoma gástrico como es el caso de los países orientales, están indicados los métodos de cribado como la fotofluorografía y endoscopia para hacer un diagnóstico más temprano, sin embargo tienen un costo elevado (Crew., *et al* 2006) lo que limita su empleo y la realización de estos mismos procedimientos en nuestro medio.

Los factores de riesgo más importantes relacionados en la carcinogénesis son la dieta (alimentos salados, ahumados y en salmuera, pescado seco y carbohidratos refinados), el tabaquismo también se ha encontrado como un factor de riesgo para cáncer gástrico, así como la obesidad y la infección por *Helicobacter pylori*.

#### *Helicobacter pylori*

El *H. pilory* es una bacteria gram negativa, microaerofílica, que infecta al estómago de más del 50% de la población humana en el mundo y es la mayor causa de gastritis crónica y úlcera péptica. En 1994, la Organización mundial de la salud y la International Agency for Research in Cancer (IARC), clasifico a la infección por *H. pilory* como un carcinógeno definitivo (clase 1). (Pounder, *et al.*, 1995 Jackson C., *et al* 2008, Zabaleta., *et al* 2010)



Fuente: <http://physiology.blog.upv.es/2015/01/09>

El *H pylori* ha sido designado, como un factor de activación para el neutrófilo, porque promueve su adherencia al endotelio y estimula la producción de radicales activos de oxígeno por activación de la nicotin adenin dinucleotido fosfato oxidasa en la membrana plasmática, lo que contribuye a una respuesta inflamatoria (Shimoyama. *et al.*, 2003), que incrementa la infiltración de linfocitos, macrófagos y células plasmáticas dentro de la mucosa gástrica, que condiciona un daño severo a la mucosa con la consecuente atrofia, metaplasia, displasia y cáncer. (McClain., *et al* 2009). Por lo que fue recomendado que todo los pacientes con úlceras en quienes se detectara el microorganismo debería recibir tratamiento de erradicación (Ahmed., *et al* 2005).

El cáncer gástrico, al igual que otros tipos de cáncer es el resultado final de la interacción de muchos factores de riesgo, así como de factores de protección. Los factores genéticos también desempeñan un papel en la etiología de la enfermedad.

La anomalía genética más común en el cáncer gástrico es la pérdida de la heterogeneidad de los genes supresores principalmente el P53 o gen Coli-polipo adenomatoso. El último conduce a la oncogénesis gástrica a través de cambios relacionados con el complejo E-Cadherina-catenina que desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la arquitectura del tejido normal. La mutación de algunos de sus componentes y el resultado de la pérdida de la adhesión célula-célula, contribuye a la formación de la neoplasia. Se han reconocido alteraciones en la línea germinal del gen E-cadherina/CDH1 en familias con predisposición hereditaria al cáncer gástrico de tipo difuso. Amplificaciones o sobre-expresiones de los factores tróficos-adaptativos también se han observado en el cáncer gástrico. El Análisis seriado sobre expresión génica (SAGE) realizado en tejido típico de cáncer gástrico encontró genes sobre y sub regulados, se seleccionaron aproximadamente 60 genes de sus archivos y se examinó la expresión de estos genes en tejidos de humanos normales por PCR (polimerasa en

cadena tiempo real). El polimorfismo de genes cuya expresión está muy alterada en cáncer, pueden ser candidatos como nuevos factores de riesgo y detección y estudio, puede ayudar a la prevención en esta enfermedad (Khan., *et al* 2006)

Se ha encontrado también que las células tumorales muestran además de las alteraciones de sus productos celulares, alteraciones en el empalme de proteínas celulares y modificaciones postranscripcionales. La mucina una proteína altamente glucosilada que se encuentra en muchos cánceres muestra expresiones aberrantes. MUC2 Y MUC5B son dos moléculas de mucinas descubiertas de novo en pacientes con cáncer gástrico, moléculas normales pueden sufrir cambios en su expresión o glucosilación como la MUC 1 y presentar epítopes antigénicos. La detección sérica con 4 pares de anticuerpos monoclonales dirigidos contra diversos epítopes de las moléculas MUC 1 Y MUC5AC tienen una sensibilidad de 75% y una especificidad tan alta del 90% para el diagnóstico de Cáncer Gástrico aun superior al antígeno carcinoembrionario y el marcador CA 19-9 con una sensibilidad de 21.5 y 18.27% respectivamente y una especificidad de 90% para ambos marcadores (Xu., *et al* 2009).

Se ha demostrado que hay niveles séricos incrementados de receptor Fas (Apo-1/CD 95) principalmente en el cáncer gástrico tipo Intestinal, este receptor juega un papel importante en la carcinogénesis y puede ser una herramienta útil para el diagnóstico temprano del cáncer gástrico (Boroumand-Noughabi., *et al* 2010).

Los tumores gástricos muestran cambios en la expresión de enzimas lisosomales que se han identificado en jugo gástrico de pacientes con carcinoma gástrico como son la lisozima  $\beta$ -hexosaminidasa (Graffner., *et al* 1983).

## EVASIÓN TUMORAL

El papel que desempeña el sistema inmune en el control de tumores fue propuesto por Thomas y Burnet en 1957, con la teoría de la vigilancia inmunológica. Esta teoría postula que, dentro de un organismo, continuamente se están generando células malignas, pero que éstas son identificadas y destruidas rápidamente por el sistema inmunológico.

La inmunovigilancia tumoral se basa en los rasgos que pueden ser reconocidos por las células inmunitarias innatas y adaptativas. El estrés oncogénico induce un incremento de la regulación de ligandos para la activación de los receptores de las células NK y otras moléculas de superficie inmunoestimulantes por lo que las células tumorales pueden ser reconocidas y rechazadas por las células NK, esta respuesta innata a su vez puede activar además una respuesta innata adaptativa específica contra antígenos específicamente expresados por las células tumorales lisadas y de ese modo dar lugar al control tumoral dependiente de células T. (Raulet, *et al.*, 2009)

La identificación de antígenos (Ags) tumorales específicos reconocidos por células T y anticuerpos en las últimas décadas ha establecido claramente que el sistema inmune puede reconocer naturalmente las células cancerosas pero, sin embargo, no puede controlar el crecimiento de los tumores. Si bien existen numerosos ejemplos en los cuales

células T CD8+ aisladas de pacientes pueden reconocer a dichos Ags *in vitro* y eliminar células tumorales que los expresan, la falta de eficacia del sistema inmunológico para eliminar los tumores *in vivo* sugiere que, o bien existe una inmunodeficiencia generalizada en los pacientes con cáncer, o que el tumor ejerce alguna modulación sobre los efectores inmunes en el microambiente tumoral.

Hasta ahora algunos de los mecanismos identificados en la evasión inmune son:

- a) La falta de expresión de antígenos tumorales
- b) Una disminución de la expresión de las moléculas de clase I del CMH
- c) La disminución de la expresión de genes que codifican para las proteínas TAP1/TAP2 (proteínas transportadoras de antígenos)
- d) La secreción de bajos niveles de citocinas
- e) La secreción de IL-10, citocina supresora que inhibe la activación de los linfocitos TDC-8 citotóxicos y las células asesinas naturales NK, y/ o la liberación de receptores solubles TNF-alfa.
- f) La falta de respuesta de los linfocitos T citotóxicos a IL2
- g) La inhibición de la expresión de IL-7
- h) La falta de correlación entre la presencia de anticuerpos antitumorales y el desarrollo del tumor

#### ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (CMH).

El éxito en la eliminación de tumores por linfocitos T citotóxicos CD 8+ (CTLs) requiere de la presentación eficiente de los péptidos antigénicos derivados de tumor por las moléculas de clase I de CMH. El efector de células T específicamente reconoce estos péptidos asociados con CMH-I y ejerce su efecto citotóxico por inducción de apoptosis de las células tumorales. Cualquier alteración en la presentación de los antígenos, alterarían la generación de una respuesta inmune adecuada. Las células tumorales han desarrollado múltiples mecanismos que eliminan o al menos debilitan la respuesta inmune. La pérdida de estas moléculas da como resultado una disminución en la capacidad de presentar péptidos derivados de antígenos tumorales, de ahí que esta células se resistan a CTLs. la pérdida completa de MHC clase I o un pérdida simple de alelos han sido vistos frecuentemente y más de la mitad de todos los tumores pueden tener una de estas alteraciones. De hecho la sub regulación de los alelos HLA –A y HLA-B es completamente común en diferentes tumores. La pérdida completa de la expresión de los alelos de HLA clase I en un fenotipo encontrado en carcinomas cervicales, carcinomas de la vejiga y melanomas entre otros. En la mayoría de los casos la pérdida de HLA causa diferentes mutaciones que involucran genes de la  $\beta$ 2-microglobulina.

También se ha establecido que las células que expresan bajos niveles de moléculas HLA-A y HLA-B son susceptibles a lisis por la citotoxicidad ejercida por las células NK. Tal condición revela otro mecanismo de evasión por células cancerígenas involucrando la expresión de moléculas no clásicas de HLA tales como HLA-G y HLA-E los cuales

pertenecen al grupo de MCH clase Ib. Este grupo de moléculas está involucrada en la inmunorregulación, actuando como inhibidores de la señalización de la citotoxicidad de las células NK (Rodgers. *et al.*, 2005).

Se ha mostrado que la expresión de HLA-G por células de melanoma contribuye a la evasión celular de la respuesta inmune por inhibición del reconocimiento de las células NK. Además hay evidencia de que la inhibición de la interacción entre NKG2D y estos ligandos sobre células tumorales (por ejemplo proteínas MICA y MICB) puede dar por resultados la evasión de la respuesta a células de NK. La identificación de diferentes estrategias usadas por los tumores para evitar la inmunovigilancia y el aclaramiento de los mecanismos involucrados en estas estrategias son cruciales para el desarrollo de novedosos blancos terapéuticos dirigidos a restaurar la respuesta inmune efectiva (Scharovsky, *et al.*, 2006).

Los anticuerpos monoclonales que bloquean los mecanismos de amortiguación de la respuesta del hospedero asociado a antígenos tumorales se han convertido recientemente en una realidad práctica. Como los anticuerpos dirigidos contra CTLA-4 una molécula que subregula la activación de linfocitos T a través de un ciclo de retroalimentación homeostática. En condiciones fisiológicas normales, ésta previene la autoinmunidad y permite al cuerpo restablecer la tolerancia de autoantígenos (Kirkwood., *et al* 2012).

## SISTEMA INMUNOLÓGICO

El sistema inmunológico está diseñado para discriminar lo propio de lo no propio tanto que cuando algo es reconocido como no propio el sistema inmunológico intenta eliminarlo, puede ser considerado como un vigilante que reconoce y destruye las células reconocidas como no propias o células transformadas de tal manera que a pesar de que diariamente aparecen células tumorales en individuos sanos, la inmensa mayoría son eliminados de manera eficaz por el sistema inmunológico y por lo tanto no se desarrollan tumores malignos clínicos. (Matsueda., *et al* 2014)

Respecto a la respuesta inmunitaria adaptativa este funciona de modo discriminatorio con un amplio repertorio de receptores específicos que pueden reconocer prácticamente todos los componentes de un invasor extraño. El empleo de moléculas receptoras con elevada especificidad ha permitido reconocer microorganismos patógenos que carecen de patrones estereotipados, que sean muy específicas frente a un microorganismo patógeno determinado. La Especificidad de la respuesta permite que se genere la memoria inmunológica, debido a esta característica es que el sistema inmunitario adaptativo tiene la capacidad de “recordar” a un microorganismo patógeno. (Playfair., *et al* 2009).

La principal característica de la respuesta inmunológica adaptativa es el reconocimiento muy especializado del antígeno. Se reconocen dos moléculas principales que participan en este proceso:

- a) Las inmunoglobulinas (anticuerpos)

## b) Los receptores para los linfocitos T (TCR)

Está bien establecido que la respuesta mediada por la Célula T juega un papel muy importante en la inmunidad antitumoral. Una respuesta efectiva de células T puede destruir células tumorales solo después de que recibe dos señales desde los TCR y moléculas de coestimulación. De manera inicial la célula T antígeno específica recibe una señal después de la unión de la TCR a la célula presentadora de antígeno (APC) expresando una unión de sus moléculas co-estimuladores al correspondiente par de sus células presentadoras de antígenos y entonces la célula T es activada. Sin la coestimulación la célula T es sometida a apoptosis o entrar en anergia. El hecho de que las células tumorales expresen una baja co-estimulación molecular puede explicar cómo es que las células tumorales evaden el sistema inmune. (Li., *et al* 2008)

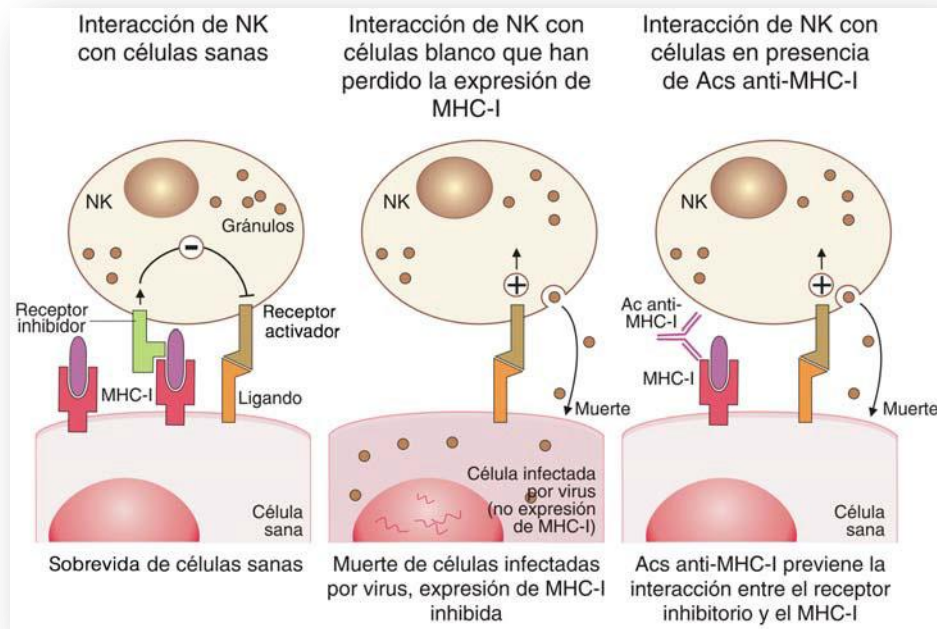
Los anticuerpos actúan como receptores para el antígeno ligados a la membrana de los linfocitos B y como anticuerpos circulantes. Los anticuerpos son glucoproteínas que se expresan como: Receptores ligados a la membrana en la superficie de los linfocitos B o moléculas solubles que se encuentran en el suero y los líquidos tisulares. (Male., *et al* 2014)

Las células que constituyen el sistema inmunitario innato incluyen a monocitos/macrófagos, los granulocitos polimorfonucleares, los linfocitos NK, los mastocitos y las plaquetas. Las células fagocíticas del sistema inmunitario innato pertenecen al linaje mielocítico.

Es de vital importancia conocer que los linfocitos citolíticos naturales (NK) participan fundamentalmente en la defensa frente a microbios intracelulares y son responsables de la muerte de las células infectadas por virus, constituyen el 15% de los linfocitos sanguíneos y no expresan los receptores para el antígeno de los linfocitos T ni B. Los linfocitos NK funcionales se encuentran en el bazo y los NK ganglionares que expresan CD 56, pero no CD16 podrían representar linfocitos NK inmaduros. Los linfocitos NK comparten marcadores de superficie con los linfocitos T, monocitos/ macrófagos o los neutrófilos.

Los linfocitos NK, se identifican en las poblaciones linfocíticas por medio de la presencia de CD 16 (FcγRIII).

La función efectora de las NK contra tumores y células infectadas con virus está más relacionada con su actividad citolítica, además por la secreción de varias citocinas y quimiocinas. Las Células NK promueven respuestas inflamatorias y ejercen una regulación de control sobre la respuesta inmune adaptativa por influencia no solo de la fuerza sino también de la calidad de la respuesta de las células T. La función de las células NK está regulada por citocinas, incluida IL-15, IL-2 e IL-8, así como la interacción célula-célula que involucra diferentes tipos de células dendríticas primarias (DC) macrófagos y células del estroma mesenquimatoso. Las células NK migran hacia el tejido inflamado y a órganos linfoides secundarios donde ellos pueden encontrar células tumorales y participan en la primera línea de defensa de contra patógenos.



Se conoce que el ambiente de las células NK puede estar regulado por señales positivas y negativas. Son dos los principales sistemas de regulación que son expresados en las células NK, la primera está representada por el receptor invariante de las células NK que es HLA-I y el segundo compuesto es por varios receptores que no se encuentran unidos a HLA-I. (Moretta., *et al* 2014)

Las características moleculares y funcionales de los receptores HLA-I para células NK son: los receptores inhibitorios asesinos parecidos a inmunoglobulinas (KIRs) y los receptores inhibitorios tipo Lecitina C (CLIRs) pueden reconocer no o varios alelos HLA-I bloqueando la función de NK. (Poggi., *et al* 2014)

Todos los días hay no menos de una millón de lesiones moleculares que ocurren en el DNA de una simple célula, muchas de ellas son reparadas de forma instantánea lo que indica que los mecanismos de control son suficientemente efectivos para prevenir tumores o células mutantes. De hecho estos mecanismos incluyen factores intrínsecos tales como la reparación enzimática de DNA y genes supresores de tumor así como el control de funciones extrínsecas del sistema inmunológico. (Bruttel., *et al* 2014).

La historia natural de la mayor parte de los tipos de cáncer sugiere que el desarrollo de las características anormales que estos exhiben este ocurre de manera progresiva como resultado de la pérdida de la regulación de los aspectos críticos de la función celular, una de estas neoplasias es el cáncer gástrico.

## ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Cáncer gástrico es un tipo de crecimiento celular maligno producido con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos y órganos, en particular el esófago y el intestino delgado, causando cerca de un millón de muertes en el mundo anualmente. En las formas metastásicas, las células tumorales pueden infiltrar los vasos linfáticos de los tejidos, diseminarse a los ganglios linfáticos y, sobrepasando esta barrera, penetrar en la circulación sanguínea. Muchos pacientes no desarrollan una adecuada respuesta antitumoral debido a la implicación de estrategias de evasión específicas del tumor. Los crecimientos metastásicos han mostrado su asociación con una pérdida de la expresión del MHC-I y de otras proteínas involucradas en el proceso de reconocimiento antigénico de ahí la pobre presentación de epitopes a la célula T. Otras estrategias de evasión inmunológica son la secreción de factores inmunosupresores inducido por el tumor tales como IL-10 y TGF $\beta$  o la inmunotolerancia contra antígenos derivados del mismo. (Wolf., *et al* 2003)

La respuesta celular natural contra las células tumorales fue descrita en ratones y en humanos en 1970. Inicialmente se reconoció una novedosa población de linfocitos llamados células Natural Killer (NK) estas células tienen la capacidad natural y espontánea, para eliminar linfomas y leucemias en animales no inmunizados. Actualmente las células NK son reconocidas como un subgrupo de células linfocíticas las cuales son capaces de eliminar directamente a células infectadas por virus y/o células tumorales, participan tanto en la inmunidad innata, como en la inmunidad adaptativa.

Se ha comprobado la función de las células NK en las células cancerosas e infectadas por virus, ya que concentraciones bajas de estas células en sangre periférica incrementan el riesgo de cáncer. La presencia de las células NK en el infiltrado tumoral ha mostrado un mejor pronóstico en varias malignidades. Las células NK fueron definidas por su fenotipo CD16, CD56, lo que les permite inducir una citotoxicidad celular debida a anticuerpos (ADCC). Las células NK comprende entre el 5 a 15% de todos los linfocitos circulantes. (Seidel., *et al* 2013).

La citotoxicidad celular debida a anticuerpos (ADCC) es proceso inducido por el reconocimiento de la fracción Fc de un anticuerpo por la célula NK, adherido sobre la célula diana. (Ahmad., *et al* 1996)

Para que se realice ADCC es necesario:

- a) Que las Células blanco expresen antígenos de superficie de patógenos
- b) Anticuerpos de isotipo IgG que reconozcan los antígeno de superficie en la blanco
- c) Células efectoras que expresen un receptor FC gamma (Fc $\gamma$ R), funcional.

Sólo los anticuerpos de isotipos IgG han mostrado inducir ADCC, debido a que CD 16 es el receptor para la fracción Fc y reconoce y une a la fracción Fc de los isotipos IgG1 e IgG3, promoviendo la ADCC en las células diana.

Desde que Rudolf Virchow, fundador de la patología Moderna observó la conexión entre las células tumorales y el microambiente tumoral que lo rodea, se ha sospechado fuertemente que este juega un papel importante en el inicio y la progresión del tumor. Se ha pensado que el microambiente tumoral determina el comportamiento del cáncer no solo por sus características genéticas y epigenéticas de las células tumorales. El microambiente tumoral está compuesto por diferentes poblaciones celulares tales como células endoteliales, fibroblastos, linfocitos y macrófagos, también tiene un numeroso contenido de moléculas solubles, como el factor de crecimiento, citocinas, quimocinas, anticuerpos, proteasas, varios tipos de enzimas y metabolitos como si fuera la matriz extracelular: cuando el tumor progresa los estados de hipoxia y acidosis son desarrollados en el microambiente y se ha encontrado una amplia relación entre las células tumorales y el microambiente, los cuales juegan un papel muy importante en la iniciación, crecimiento y metástasis. Se ha estudiado bien que entre los numerosos factores que se encuentran en el microambiente existen mediadores de la inflamación y que han despertado un gran interés científico en los últimos años debido a que existe una asociación con infección o inflamación crónica en paciente con cáncer de entre el 15 al 20%. (Hye., *et al* 2014, Xing., *et al* 2010)

En el caso del cáncer Gástrico los estados de inflamación crónica causados por la infección con *Helicobacter pylori*, así como la producción de mediadores de la inflamación, tales como citocinas y quimiocinas con el tejido gástrico, juegan un papel importante en la iniciación y progresión de la enfermedad. Un mejor entendimiento de lo que ocurre en el microambiente y la interrelación de las células del cáncer gástrico pueden ser de utilidad para el reconocimiento del mecanismo por el cual y bajo qué condiciones el tumor crece, progresa y para el desarrollo de nuevos blancos terapéuticos que ayuden en el tratamiento. (De Wever., *et al* 2010)

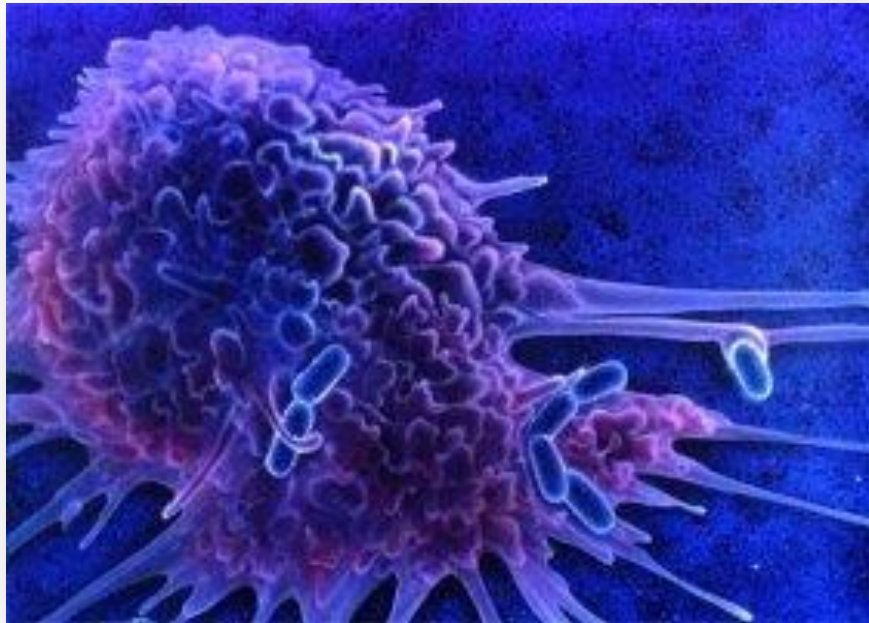
La Inflamación relacionada al cáncer gástrico activa factores de transcripción principalmente NF- $\kappa$ B, factor inductor de Hipoxia 1 $\alpha$  y señales de transducción y activación o transcripción (STAT-3) los cuales con clave para la inducción de mediadores de la inflamación tales como citocinas, quimiocinas, prostaglandinas y óxido nítrico. (Karin., *et al* 2006, Gretten., *et al* 2004, Ditsworth., *et al* 2004)

## MACRÓFAGOS.

Son una población heterogénea de células mieloides innatas involucradas tanto en estados de salud como de enfermedad. Los macrófagos se originan a partir de precursores monocitos en la sangre y experimentan diferenciación específica en función de las señales locales los tejidos.

Se reconocen dos tipos de macrófagos los M1 (clásicamente activados) y los tipos M2. Las características importantes de los macrófagos M1 son la expresión de iNOS, ROS y la producción de NK y el tipo 1 de citoquinas de células T estimulando IL-12. Macrófagos M1 pueden fagocitar y matar células diana. Macrófagos M2 pueden desarrollar en respuesta a

por ejemplo IL-4 o IL-13 expresar abundantes receptores abundantes y están asociados con una alta producción de IL-10, IL-1b, VEGF y metaloproteinasas de la matriz (MMP).



Fuente: <https://www.flickr.com/photos>

Los macrófagos reclutados en el estroma del tumor están implicados en la progresión en un amplio margen. Aunque los macrófagos pueden tener una actividad antitumoral, también se ha encontrado que algunas células tumorales evaden la actividad antitumoral de los mismos. De hecho la eliminación de los macrófagos por mutación genética reduce la progresión tumoral y las metástasis. La infiltración de macrófagos dentro del tejido tumoral correlaciona significativamente con la vascularidad tumoral en cáncer de esófago y cáncer gástrico. Existe una asociación directa entre el grado de infiltración de macrófagos y la profundidad de la invasión tumoral, estado de los nódulos y la etapa clínica del cáncer gástrico. (Ohta., *et al* 2002, Ohta., *et al* 2003)

El reclutamiento de los macrófagos es mediado por una variedad de quimiocinas que incluye proteína 1 del monocito (MCP-1/CCL2) proteína-1 $\alpha$  macrófago inflamatoria (MIP-1 $\alpha$ /CCL3) y reguladores de la sobre activación, así como una secreción normal de la expresión de células T.

Dado que el cáncer gástrico tiene un gran impacto en la sobrevida pronóstico de los pacientes se han realizado múltiples estudios en modelos murinos principalmente roedores a fin de poder replicar los factores patogénicos del cáncer gástrico. Se han estudiado algunas cepas de roedores que desarrollan en forma espontánea cáncer

gástrico de los cuales se identificó a la Cepa Z africana *Mastomys natalensis* por desarrollar adenocarcinoma gástrico.

De entre algunas de la cepas de roedores empleadas para la replicación de enfermedad gástrica se encuentran los Balb/C, esta cepa tiene la característica de una fuerte sensibilidad a la colonización bacteriana gástrica antral (principalmente para los estudios en los que se emplea *H pylori*). (Pritchard., *et al* 2004)

En la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos implicados en la formación de los tumores, Min Li y Cols, investigaron la generación de un anticuerpo monoclonales contra antígenos de células cancerígenas de superficie empleando cribado de células y clasificadas por inmunofluorescencia. En el estudio se encontró que el anticuerpo monoclonal MS17-57 podía identificar fosfatasa alcalina placentaria e intestinal de blancos expresados en la superficie de células cancerígenas. En la realización de este estudio se emplearon 6 líneas celulares de cáncer gástrico, y se obtuvo tumor gástrico fresco de 7 pacientes; y se obtuvo el anticuerpo monoclonal MS17-57. Las líneas celulares fueron empleadas en ratones desnudos machos A/J de 6 -8 semanas de edad, los ratones fueron inyectados en sitios diferentes con las líneas celulares y posteriormente se les realizaron tres inmunizaciones con el anticuerpo MS17-57. El resultado de este estudio permitió demostrar que el anticuerpo monoclonal MS17-57 cultivado con células de cáncer gástrico, inhibió el crecimiento tumoral en un 32.8%. En este estudio se emplearon tanto ratones desnudos como ratones Balb/C. (Li., *et al* 2013)

La literatura mundial reporta un gran número de sustancias de secreción elaboradas por células tumorales que sirven como biomarcadores, para el seguimiento de pacientes con enfermedad neoplásica o bien como un factor pronóstico. (Ruibal., *et al* 2002)

Hong-Kai y cols reportaron de su estudio en 94 pacientes con cáncer gástrico para evaluar la expresión con tres tipo de Mucinas (MUC 1,2 y 5AC glicoproteínas de alto peso molecular) y E-caderinas en carcinoma gástrico, que estas tuvieron tasas de expresión positiva en el 82% (77/94), 84% (79/94), 40% (38/94) y 56% (53/94) respectivamente. La expresión de MUC1 correlacionó significativamente con el tipo de cáncer (la tasa positiva de MUC1 en adenocarcinoma bien y moderadamente diferenciado, adenocarcinoma pobremente diferenciado, carcinoma en anillo de sello y carcinoma mucinoso) y fue de 91%, 87%, 71%, 71%, respectivamente,  $P < 0.05$ ), la edad del paciente (la tasa positiva entre quienes fueron más jóvenes como 40 años, entre 40-60 años y mayores de 60 años fueron 74%, 81%, 89%,  $P < 0.05$ ), afección de nódulos linfáticos ( las tasas positivas entre el grupo no intervenido y el intervenido fue 78%, 85%,  $P < 0.05$ ) y el tamaño del tumor ( las tasas positivas en los tumores con tamaño menor de 3 cm, 3-6 cm y mayores de 6 cm fue de 69%, 92%, 69%,  $P < 0.05$ ); La expresión de MUC2 se asoció significativamente con el tipo de cáncer ya tuvo una expresión muy alta en los carcinomas mucinosos. Por lo tanto se consideró como buenos marcadores de diferentes tipos de cáncer.(Hong-Kai., *et al*, 2004)

Lhan Ô, Han U y cols, estudiaron la expresión de MUC 1, 2 y MUC5AC en carcinoma gástrico para evaluar su valor pronóstico y su relación con características clínico patológicas, ellos estudiaron a 257 pacientes con diagnóstico de carcinoma gástrico entre enero 2000 y diciembre 2007, la clasificación histológica fue de acuerdo a la clasificación de Lauren teniendo como resultado que MUC 1 se expresa fuertemente en el epitelio sano, pero su expresión disminuyó con la pérdida de diferenciación del tumor (96.2% en los bien diferenciados y 83.7 en los pobremente diferenciados, con un incremento en el número de nódulos linfáticos metastásicos y la progresión en el estadio del tumor (100% en etapa 1 y 75.6% en etapa 4) La expresión de MUC1 fue menor en los tumores metastásicos a distancia (83,3 % en los tumores metastásicos distantes y 90,8 % en los tumores no metastásicos). En carcinoma gástrico difuso (carcinomas mucinosos y células en anillo de sello) la expresión de MUC2 fue mayor (97,5 % en el tipo difuso y el 89,4 % en el tipo intestinal). Todos los carcinomas mucinosos eran MUC2 positivo. La tasa de expresión disminuyó con un aumento en el número de ganglios linfáticos metastásicos y con la progresión en los estadios TNM en todos los casos. Todos los tumores con metaplasia intestinal eran MUC2-positivo. La expresión de MUC5AC fue muy fuerte en el epitelio gástrico normal, sin embargo, la tasa de expresión disminuyó con la pérdida de diferenciación del tumor, con un incremento en la profundidad de la invasión tumoral, y con un aumento en el número de ganglios linfáticos metastásicos. La expresión de MUC5AC fue mayor en el carcinoma de tipo intestinal (48.4 %) que en el tipo difuso (10 %). La tasa de expresión era más bajo en el tipo difuso de acuerdo con la clasificación macroscópica del Borrmann. Todos los resultados fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) Se concluyó de MUC1 y MUC5AC pueden ser aceptados como parámetros con significado pronóstico en la progresión tumoral. (Lhan., *et al*, 2010)

Gui-Fen Ma y Cols, estudiaron la proteína TGF- $\beta$  (1 y 2) , la cual es una fuerte citocina inmunosupresora y que promueve el crecimiento tumoral por inducción de células epiteliales y su transformación a células epitelio-mesenquimatosas, se incluyeron 93 pacientes 20 de controles sanos, 21 con lesiones precancerosas, 22 con lesiones tempranas y 30 con cáncer avanzado; el resultado reportó tinción positiva de TGF-b1 en 20% de los controles and 66.7% de los pacientes con GC avanzado, correlacionando con progresión de la lesión ( $\chi^2 = 9.487$ ,  $P = 0.002$ ) (Ma., *et al*, 2013)

Aunque ya existen muchas opciones de tratamiento para pacientes con cáncer gástrico y proteínas que pueden ayudar al diagnóstico temprano no existen aún marcadores biológicos que puedan ayudar a su detección temprana.

No existe un marcador tumoral específico de Cáncer Gástrico, se ha estudiado con marcadores presentes en otros tumores, principalmente digestivos como es el CEA (sensibilidad 31-67%), el CA19.9 (sensibilidad 28-70%) y el TAG 72 (sensibilidad 18 a 60) De forma individual ninguno de ellos presenta la sensibilidad y especificidad necesaria, por lo que suelen evaluarse en forma conjunta.

Aunque se ha sugerido que a determinación de CEA, CA 19.9 y TAG72 pueden ser de utilidad en la detección de enfermedad en estadios tempranos en población de riesgo, la

baja sensibilidad encontrada de estos marcadores hace que ejerzan un papel secundario en el diagnóstico.

En los últimos años, varios autores han evaluado nuevos marcadores potenciales, entre ellos destacan la piruvatocinasa M2 específica de tumor (M2-PK) el inhibidor tisular de la metaloproteasa 1 (TIMP-1) la metaloproteasa 9(MP-9) la  $\alpha$ -1-antitripsina y una glucosfosfoproteína de membrana implicada en el crecimiento de tumores sólidos llamada osteopontina. Los resultados preliminares en cuanto a su utilidad pronostica parecen prometedores sin embargo ninguno de ellos se ha establecido en la práctica diaria (Hartd., *et al*, 2000; Wang., *et al*, 2006; Higashivama., *et al*, 2007).

En el departamento de Inmunología Experimental se han estudiado las proteínas de secreción/excreción provenientes de células tumorales de pacientes con adenocarcinoma gástrico y se han desarrollado anticuerpos policlonales en conejo contra 7 de estas proteínas de secreción, detectando 3 que podrían actuar contra blancos inmunológicos por reconocimiento de la célula tumoral, encontrando que la proteína denominada CGA 5 resultó ser la más inmunogénica, por inducir una elevada concentración de anticuerpo anti-CGA-5. Al realizar IFI con este anticuerpo anti-CGA-5, mostró ser muy específico para identificar células tumorales de pacientes con adenocarcinoma de tipo difuso, (Diaz-Orea, en proceso), y detecta niveles medibles del antígeno de secreción CGA-5 en el suero de pacientes con Ca Gástrico tanto difuso como intestinal al utilizarlo para montar una técnica de ELISA tipo sándwich. Por los avances obtenidos con este anticuerpo para la detección de cáncer gástrico surge la hipótesis de verificar, si este anticuerpo, que ha mostrado gran sensibilidad y especificidad para diagnóstico por serología e inmunohistoquímica puede actuar sobre las células tumorales *in vivo* al ser implantadas en ratones inmunizados con el anticuerpo anti-CGA-5, activando diferentes estirpes inmunológicamente involucradas en la destrucción de células tumorales, como los linfocitos Tc, células NK, y macrófagos. Con las nuevas proteínas mencionadas, se ha contribuido al descubrimiento de potentes herramientas para el diagnóstico de muchas patologías.

## JUSTIFICACIÓN

El Cáncer Gástrico sigue teniendo un elevado índice de mortalidad a pesar de la tecnología actual y acceso a los servicios de salud, esto debido a que los pacientes son detectados en estadios avanzados de la enfermedad y con pocas o nulas opciones de tratamiento tanto farmacológico, quirúrgico o paliativo. Es de vital importancia poder detectar la enfermedad en etapas tempranas, sin embargo no se cuenta hasta el día de hoy con ningún biomarcador que ayude a la detección en forma oportuna y así poder incidir en el pronóstico de la enfermedad, se han realizado múltiples esfuerzos a nivel mundial por poder detectar patrones proteicos y/o proteínas del metabolismo de las células cancerosas que a la vez permitan ser blancos o marcadores específicos de esta enfermedad.

Con la finalidad de contribuir en la búsqueda de un nuevo biomarcador en cáncer gástrico, en el laboratorio de Inmunología Experimental de la Facultad de Medicina, se han estudiado los antígenos de secreción/excreción de células tumorales de adenocarcinoma gástrico humano y se han desarrollado anticuerpos policlonales contra 7 proteínas encontradas de las cuales 3 podrían actuar contra blancos específicos. Dentro de estas proteínas, la proteína denominada CGA-5, resultó ser la más inmunogénica por inducir una concentración elevada de anticuerpo y ser detectada por células tumorales de adenocarcinoma tipo difuso.

Con la obtención del anticuerpo policlonal anti-CGA-5, en este proyecto se evaluó su efecto *in vivo*, para lo cual, se inmunizarán ratones BALB/c con el anticuerpo CGA-5 y se les implantaron células tumorales y se verificó la presencia de las estirpes celulares inmunológicamente involucradas en la destrucción y eliminación de células tumorales.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El reconocimiento de antígenos específicos del cáncer gástrico puede dar lugar al desarrollo de anticuerpos que pudieran ser de utilidad diagnóstica y/o terapéutica con el beneficio secundario de una detección más pronta y/o un tratamiento más eficaz, con la consecuente mejoría en el pronóstico de estos pacientes.

Se cuenta con un anticuerpo policlonal que se denominó CGA-5 (Cáncer Gástrico-5) que ha demostrado ser específico y sensible para la detección de este tipo de Malignidad por tal razón en este proyecto queremos determinar si estimula las células inmunológicas involucradas en la destrucción de células tumorales.

¿Existen diferencias en las poblaciones celulares presentes en el infiltrado inflamatorio inducido por la implantación de células tumorales en ratones Balb/C inmunizados con el anticuerpo anti CGA-5 y los ratones control?

## HIPÓTESIS DE TRABAJO

Hay poblaciones celulares involucradas en detección y destrucción de células tumorales presentes en el infiltrado inflamatorio inducido por la implantación de células tumorales en ratones Balb/C inmunizados con el anticuerpo anti CGA-5

## OBJETIVO GENERAL

Determinar las poblaciones celulares NK, Tc y Macrófagos en el infiltrado inflamatorio inducido en ratones Balb/C inmunizados con el anticuerpo policlonal anti-CGA-5 e implantados con células tumorales gástricas

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1.- Evaluar la presencia de células Tc, NK y macrófagos en ratones Balb/C inmunizados con el anticuerpo anti CGA-5 e implantados con células obtenidas de las biopsias incisionales de pacientes con cáncer gástrico.
- 2.- Evaluar la presencia de células Tc, NK y macrófagos en ratones Balb/C implantados con células obtenidas de las biopsias incisionales de pacientes con cáncer gástrico.
- 3.- Determinar si hubo implantación tumoral, por la presencia de anticuerpos contra los antígenos tumorales de secreción en los sueros de los ratones problema y control.

## **MATERIAL Y MÉTODO**

Estudio Comparativo, experimental, transversal, prolectivo y homodémico.

### ***Modelos Murinos***

Se emplearon ratones machos Balb/C, machos, de 6-8 semanas de edad, proporcionados por el bioterio central Claude Bernard de la BUAP y fueron mantenidos durante todo el experimento en el bioterio de la Facultad de medicina, siguiendo todas las normas técnicas de manejo y mantenimiento de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

Los ratones Balb/C enviados del Bioterio Central permanecieron una semana en el vivario de la Facultad de Medicina de BUAP para su readaptación al área y fueron aislados en cajas de acrílico con filtros EPA (Efficient, Pathogenic, Aisland) para evitar contaminación o infección, cada uno fue pesado. Se conformaron 2 grupos de 6 ratones cada uno a los cuales se les identificó con las etiquetas en cada caja con "control" y "problema 1" cada uno de los ratones se identificó mediante muesqueo en orejas y fue tomado el peso de cada uno de ellos.

### ***Células tumorales***

Para la obtención de las células tumorales se nos proporcionó un fragmento de tumor por el cirujano del Servicio de Gastrocirugía del Hospital de Especialidades Puebla obtenido de la gastrectomía total de pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma gástrico tipo difuso estadios III o IV. El fragmento de tumor para su transporte se colocó en un tubo estéril con medio enriquecido PBS con Suero fetal Bovino que a su vez se colocó en una hielera portátil para su traslado al Laboratorio de Inmunología Experimental. En el Laboratorio en el cuarto de cultivos el manejo del fragmento de tumor se realizó bajo condiciones de esterilidad y con empleo de campana con flujo laminar, previamente esterilizado con luz UV, se procedió al corte del tumor en fragmentos más pequeños los cuales fueron depositados en un Matraz Erlenmeyer con tripsina 1X 15 ml, se colocó en el agitador durante 15 minutos, el procedimiento de digestión se realizó dos veces en la forma , después de la digestión enzimática el sobrenadante obtenido de cada uno de los procedimientos se centrifugó y se obtuvieron las células tumorales. Las células se contaron empleando una cámara de Neubauer. Se ajustaron a una densidad celular de  $1 \times 10^6$  células /ml.

### ***Procedimiento de Inmunosupresión e implantación de Células Tumorales***

Para la inmunosupresión cada uno de los modelos murinos de ambos grupos fue pesado y se aplicó dexametasona intraperitoneal dosis de 200mg/kg de peso, al siguiente día de la inmunosupresión se aplicaron las células tumorales provenientes de la digestión enzimática aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/ratón.

Un día después de la aplicación de las células tumorales se inmunizaron a los modelos murinos identificados como “problema” con el anticuerpo anti-CGA-5 el cual se aplicó en tres tiempos llamados día 0, 15 y 30 (tabla 1).

**Necropsias de los ratones problema y control.** Los ratones fueron sacrificados al día 48 con inducción de anestesia con Xilazina/lidocaína a dosis de 0.10mg/10g de Peso vivo para la obtención de sangre a través del seno retroorbitario y finalmente la eutanasia fue por sobredosis con el mismo anestésico. Tras el sacrificio se procedió a la disección de cada uno de ellos con incisión media abdominal y se examinó en forma macroscópica el contenido intraabdominal de los modelos tanto de los controles como del grupo problema y se tomó un fragmento de intestino elegida por patóloga experta para su evaluación microscópica. Los fragmentos de intestino fueron colocados en una rejilla para biopsia e identificada con el número de experimento, ratón y grupo al que pertenecía, dicha rejilla era colocada para su conservación en formaldehído, posteriormente cada una de las muestras fue manejada por histotecnólogo experto quien incluyó en parafina para después obtener los cortes. El experimento se realizará en 3 ocasiones. El anticuerpo policlonal anti-CGA-5 fue proporcionado por el laboratorio de inmunología experimental de la BUAP.

**Tabla 1**

Ratones	Control 6	Problema 1 6
Inmunosupresión	Dexametasona 200 mg/kg en 200 ul de SSI	
Implante tumor	1x10 <sup>6</sup> células en 1 ml./ratón	
Aplicación de anticuerpo tiempo días 0, 15, 30	Solución isotónica 200ul	salina 75ug en 200 ul.
Día 30	Evaluación clínica de los modelos	
Día 48	Sacrificio y obtención de muestras de tejido para histología y sangre para determinación de anticuerpos	

**Estudio Histológico de las biopsias intestinales.** Las biopsias intestinales obtenidas de los ratones problemas y controles, se incluyeron en parafina y se obtuvieron cortes de 4um en laminillas cubiertas con poli.L lisina.

**Determinación de poblaciones celulares por IFI.** Los cortes de las biopsias intestinales, se desparafinaron y se hidrataron por baños decrecientes de alcohol hasta llegar a PBS, para realizar una inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando como primer anticuerpo un

panel de anticuerpos monoclonales, contra NK (CD16), Tc (CD8), Macrófagos (CD68), como segundo anticuerpo se utilizó una anti IgG de ratón en chivo acoplada a fluoresceína o ficoeritrina. Las preparaciones se montaron en medio de montaje sellando con barniz y se evaluaron en un microscopio invertido marca Zeiss, modelo AxioObserver, equipado con epifluorescencia y utilizando filtros de excitación 488 y 633 nm. Las imágenes fueron tomadas utilizando el software Axiovision SE64.

**Determinación de anticuerpos.** Los sobrenadantes de los cultivos celulares fueron corridos en geles de poliacrilamida SDS y se transfirieron a membranas de nitro celulosa y se revelaron con los sueros de los ratones problemas y controles, como primer anticuerpo y una anti IgG de ratón acoplada a peroxidasa como segundo anticuerpo, el complejo antígeno anticuerpo fue revelado con tetrametil bencidina, como sustrato la reacción fue detenida con agua con azida de sodio. Las membranas fueron analizadas en un fotodocumentador BioRad y las densidades ópticas fueron dadas por un espectofotometro Coleman II.

## VARIABLES DEL EXPERIMENTO

VARIABLE	TIPO	ESCALA	UNIDAD MEDICION
<b>DETERMINACIÓN DE CELULAS NK (CD16)</b>	Nominal Dicotomica	Cualitativa	Positivo (presencia de luz verde-amarillento fluorescente) Negativo (ausencia de luz verde u opacidad de la misma)
<b>DETERMINACIÓN DE Tc (CD 8)</b>	Nominal Dicotómica	Cualitativa	Positivo (presencia de luz verde-amarillento fluorescente) Negativo (ausencia de luz verde u opacidad de la misma)
<b>DETERMINACIÓN DE MACROFAGOS (CD 68)</b>	Nominal Dicotómica	Cualitativa	Positivo (presencia de luz verde amarillento fluorescente) Negativo (ausencia de luz verde u opacidad de la misma)

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se realizó análisis descriptivo para cada una de las variables.

## RECURSOS MATERIALES

Ratones fueron proporcionados por el bioterio central "Claude Bernard" bajo la autorización de la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP) para ser utilizados en las instalaciones del laboratorio de Inmunología experimental de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Material biológico: Fragmentos de tumor de las gastrectomías totales o subtotales de pacientes con adenocarcinoma gástrico del servicio de gastrocirugía del Hospital de Especialidades Puebla del Centro Médico Nacional Gral de División "Manuel Ávila Camacho" IMSS.

Los anticuerpos fueron proporcionados por la coordinación de la Maestría en Ciencias Médicas e Investigación, por la alumna y por el Laboratorio de Inmunología Experimental de la FMBUAP

## **RECURSOS FINANCIEROS**

Apoyo por la VIEP

Secretaria de Posgrado de la Maestría en Ciencias Médicas e Investigación  
CONACYT

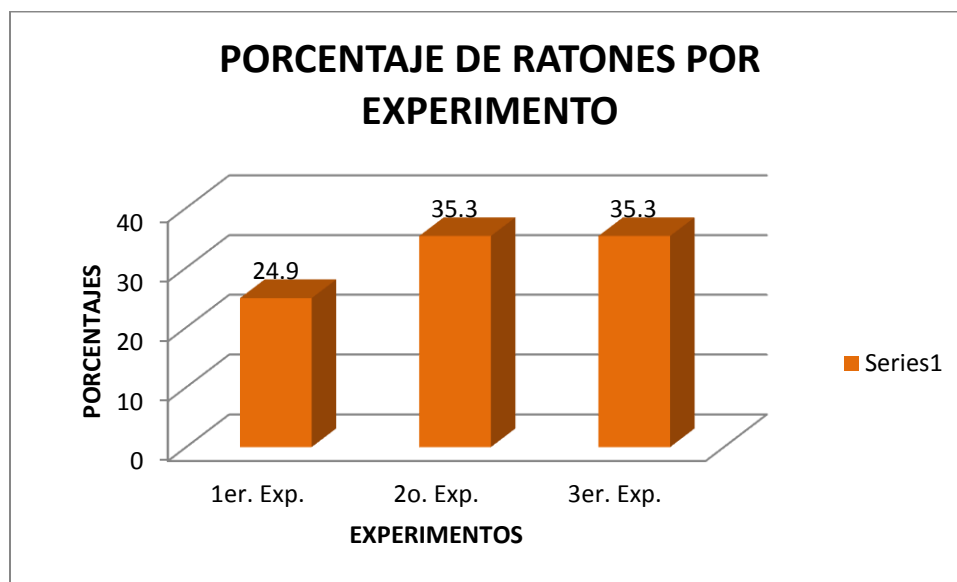
## **CONSIDERACIONES ÉTICAS**

Debido al empleo de animales de bioterio, esta investigación se ajusta a los lineamientos de la NOM-062-ZOO-1999 respecto a las especificaciones técnicas para el cuidado y uso de animales de experimentación de acuerdo con el apartado 5 de esta norma que comprende el empleo de roedores específicamente en el 5.1 y de acuerdo a esta Norma en el apartado 4 que comprende las disposiciones generales que todo bioterio debe cumplir, 4.2 sobre lineamientos respecto al personal al cuidados de las instalaciones y de acuerdo al apartado 4.2.2 que se refiere al Establecimiento del Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), el cual establece las disposiciones para la obtención de animales, Certificado de Salud del establecimiento, Identificación y Registro, Alimentación, Instalaciones, Técnicas experimentales, movilización, Eutanasia, Bioseguridad y Salud Ocupacional, Verificación y sanciones, todos estos lineamientos cumplidos en el Bioterio de la BUAP de donde se obtienen los modelos murinos.

## RESULTADOS

El experimento proyectado se realizó en tres ocasiones, se emplearon en total 34 ratones Balb/C machos de 6-8 semanas de edad (tabla 1), los cuales fueron manejados de acuerdo con los lineamientos establecidos en la NOM y de las CICUAL del Bioterio de la BUAP.

La distribución de los ratones fue: 10 para el primer experimento 4 control y 6 problema, 12 para el segundo 6 control y 6 problema y para el tercer experimento 12 ratones distribuidos 6 control y 6 problema, los porcentajes en la distribución de los grupos por experimento se observa en la siguiente gráfica 1.



**Gráfica 1.** En esta gráfica, se presenta la distribución en porcentaje de los modelos murinos empleados en cada experimento, siendo 29.4% para el experimento uno, en tanto para los experimentos 2 y 3 el porcentaje de modelos fue de 35.3% para cada uno, la distribución entre cada uno de los grupos fue similar.

En la Tabla 2 se muestra la distribución y frecuencia esperada en cada uno de los experimentos, así como el porcentaje para cada uno de los grupos estudiados y la distribución de los modelos para cada uno de los grupos tanto problema como control

Tabla 2 distribución de Ratones por Experimento. Grupos Control y Problema					
			Ratones		Total
			Control	problema	
E X P E R I M E N T O	1	Recuento	4	6	10
		Frecuencia esperada	4.7	5.3	10.0
		%	25.0%	33.3%	29.4%
	2	Recuento	6	6	12
		Frecuencia esperada	5.6	6.4	12.0
		%	37.5%	33.3%	35.3%
	3	Recuento	6	6	12
		Frecuencia esperada	5.6	6.4	12.0
		%	37.5%	33.3%	35.3%
Total		Recuento	16	18	34
		Frecuencia esperada	16.0	18.0	34.0
		%	100.0%	100.0%	100.0%

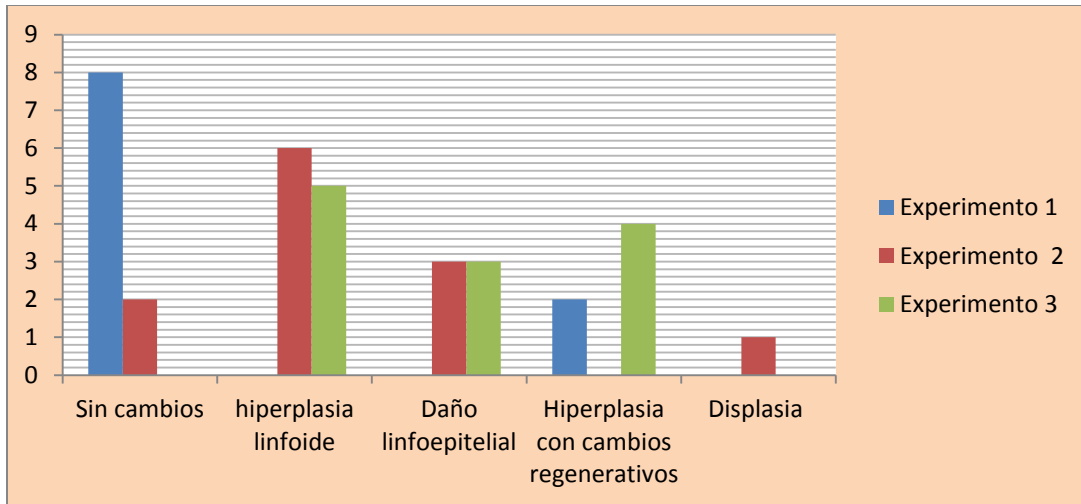
En la **tabla 2** muestra la distribución por grupos tanto control como problema para cada uno de los experimentos.

**Sacrificio de ratones.** A los 48 días post-inmunización, Los modelos murinos fueron sacrificados por sobredosis de anestésico, siguiendo las normas de manejo y control de animales de laboratorio (anexo), se obtuvieron las muestras sanguíneas de cada ratón y procedió hacer la disección, evaluando el contenido intraabdominal, tomando muestras.. La toma de muestras se realizó del intestino con crecimientos nodulares como se observa en la Figura 1.

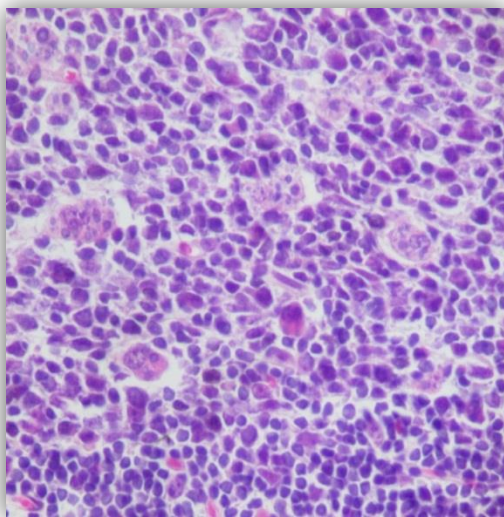


Figura 1. Nódulo intestinal observado durante la disección de los modelos murinos y de los cuales se obtuvo el fragmento intestinal

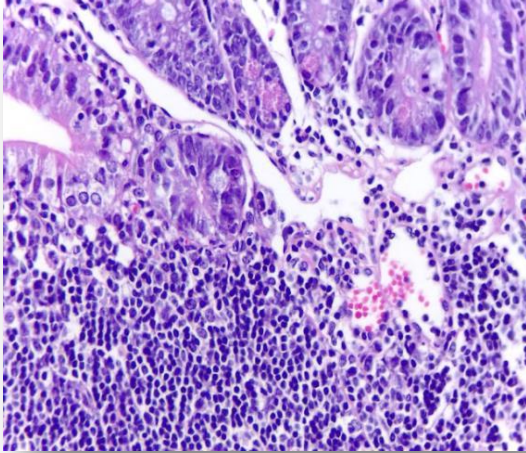
Las biopsias de intestino fueron incluidos en bloques de parafina para obtener cortes para su evaluación microscópica. Los primeros cortes obtenidos, de los bloques fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina para su observación e identificación de células malignas. Los resultados histológicos obtenidos se muestran en la gráfica 2 (Figs. 2,3,4,5,6).



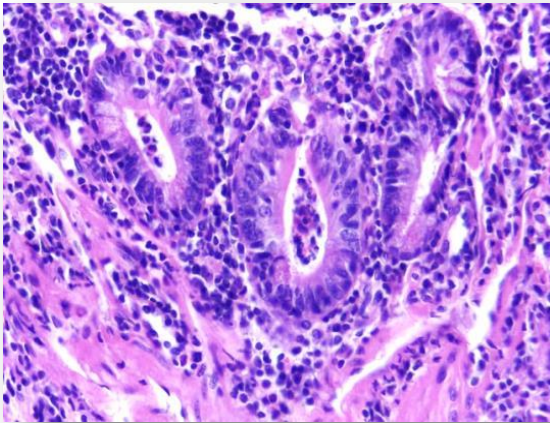
**Grafico 2.** Se observa la distribución por experimento y por tipo histológico descrito. En el eje de las abscisas se describen los hallazgos histológicos y en el eje de las ordenadas el número de modelos murinos que los presentaron.



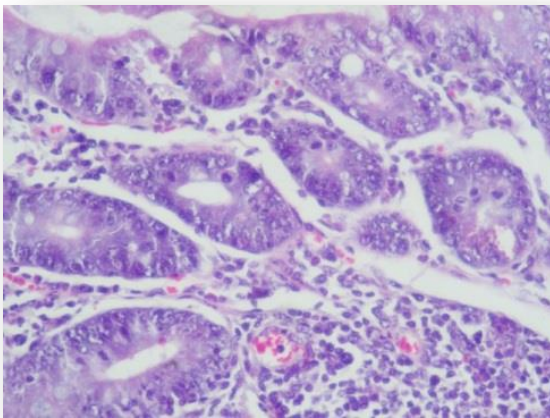
**Figura 2.** Fotomicrografía teñida con H&E, acercamiento al folículo linfoide secundario donde se muestran macrófagos con cuerpo teñibles, linfocitos y algunas células plasmáticas.



**Figura 3.** Fotomicrografía teñida con H&E, en donde se muestra glándulas intestinales con trans migración de linfocitos a través del epitelio y proliferación reactiva de linfocitos.



**Figura 4.** Fotomicrografía teñida con H&E que muestra infiltrado inflamatorio agudo y crónico compuesto por linfocitos y neutrófilos, que infiltran el intersticio y las glándulas.



**Figura 5.** Fotomicrografía teñida con H&E con displasia moderada. Las glándulas muestran células con pérdida de la relación núcleo citoplasma, núcleos vesiculosos y mitosis atípicas. Tinción H&E Displasia Moderada, lesión linfoepitelial. Células en mitosis

El 58% de los modelos murinos empleados en los experimentos tuvieron cambios histológicos Cabe resaltar que fue la hiperplasia linfoide, fue el cambio histológico que más se observó en los cortes realizados.

### ***Detección de linfocitos CD8, Macrófagos y células NK.***

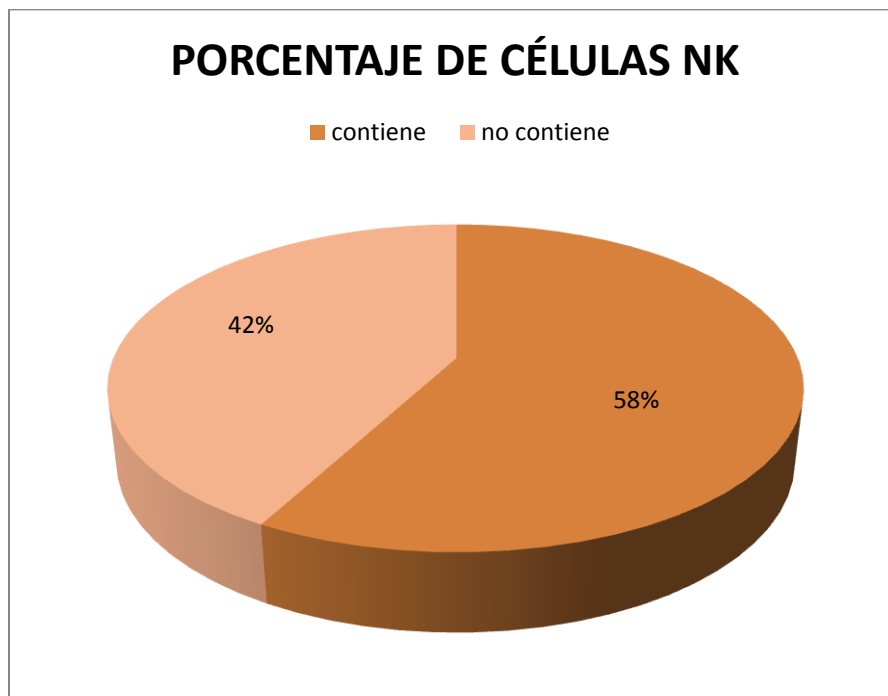
De cada bloque de parafina obtenido de las biopsias de los modelos murinos se sacaron tres cortes más, para la determinación por inmunofluorescencia de cada una de las poblaciones celulares en estudio Linfocitos T citotóxicos (CD8), Células Natural Killer (CD16) y macrófagos (CD68). Los resultados de las poblaciones se muestran en la tabla 3.

POBLACIONES CELULARES	EXPERIMENTO 1					EXPERIMENTO 2				
	CONTROL		P 5		% SI	CONTROL		P 5		SI %
	NO	SI	NO	SI		NO	SI	NO	SI	
CD 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD68	-	<b>0</b>	-	<b>1</b>	4.5%	2	<b>1</b>	2	<b>2</b>	13.7 %
CD 16	-	<b>1</b>	-	<b>1</b>	9.1%	1	<b>3</b>	-	<b>3</b>	27.3 %
TOTAL		<b>1</b>		<b>2</b>	13.5	3	<b>4</b>	2	<b>5</b>	
TOTAL NO %	0		0			13.7 %		9.1 %		

**TABLA 3.** Porcentajes de células Tc, Macrófagos y NK, detectadas en los cortes de biopsias de ratón, problema y control por IF.

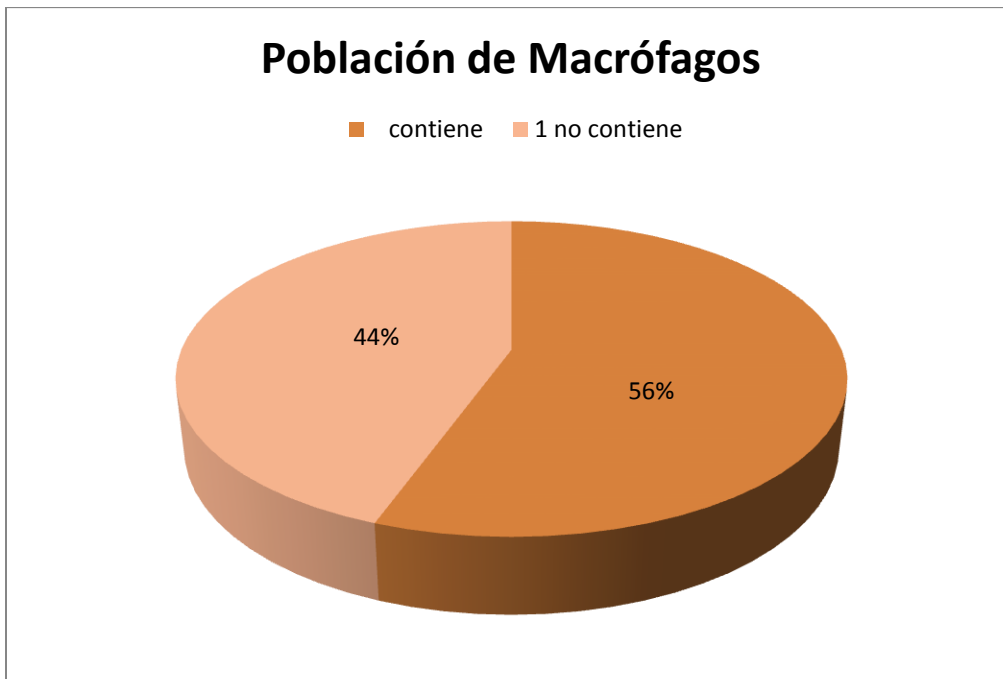
Los siguientes gráficos muestran las frecuencias de cada una de las poblaciones celulares TC, Macrófagos y NK.

En la gráfica 3 se muestran los porcentajes de la población células de NK encontrada en los ratones problema y control



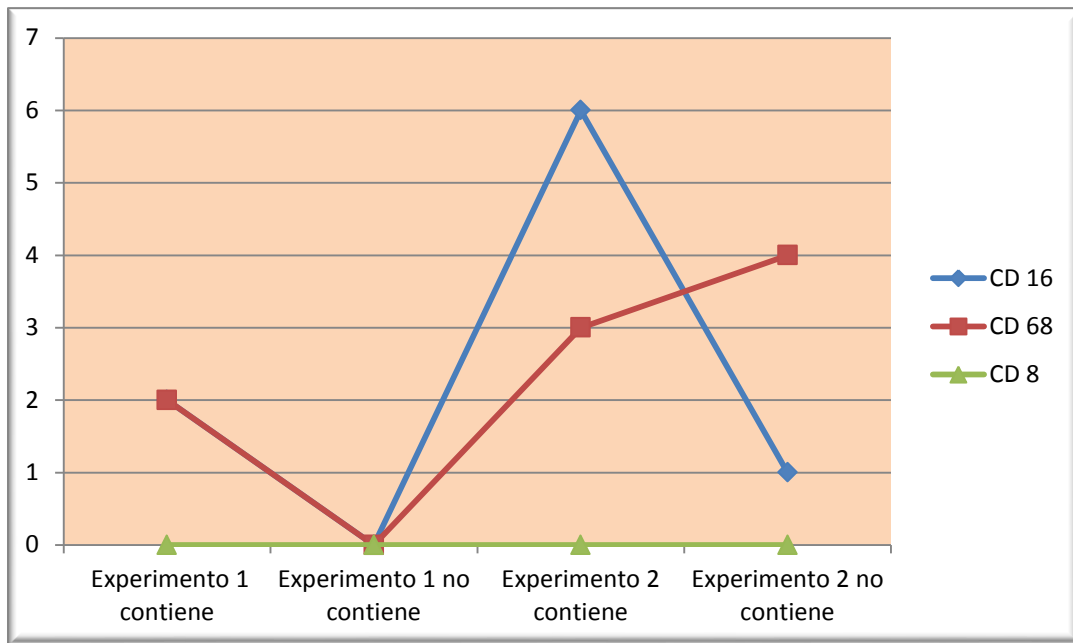
**Gráfica 3.** En este gráfico se muestra la frecuencia de poblaciones celulares CD 16+ determinada por inmunofluorescencia, el color naranja representa el número de modelos en los que se observó NK el cual fue de 58%.

En la siguiente gráfica se muestran los porcentajes de la población macrófagos encontrada en los ratones problema y control de los experimentos



**Gráfico 4** En este grafico se observa el porcentaje de la población Celular identificada con CD 68 por inmunofluorescencia y observada en los experimentos 1 y 2. En color naranja pálido se observa el porcentaje observado que fue para esta población de 44%.

Las laminillas de los cortes de cada uno de los bloques fueron analizadas en forma conjunta, las poblaciones celulares encontradas en los experimentos 1 y 2 se muestran en el gráfico 5.

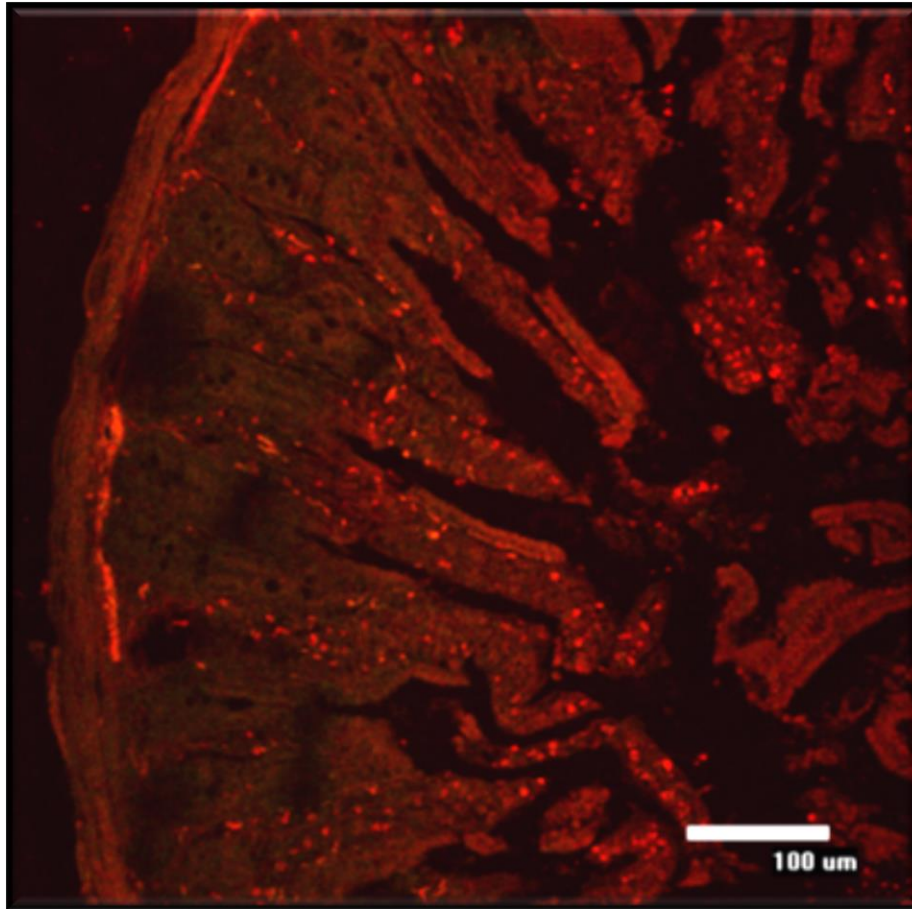


**Gráfico 5.** En este se muestra el contenido de cada una de las poblaciones celulares entre los que si expresaron y los que no se expresaron en los experimentos 1 y 2. Llama la atención que en la población celular CD 8 no se encontró en ninguno de los experimentos realizados. Se observa demás que fue la población celular de CD 16, la que tuvo mayor contenido se reportó en los experimentos en relación con que el resto de las poblaciones celulares de estudio.

## IDENTIFICACIÓN DE POBLACIONES CELULARES

La observación de las poblaciones celulares se realizó de los cortes histológicos que se tomaron a las biopsias de cada uno de los modelos murinos. Se empleó para ello un microscopio invertido marca Zeiss, modelo AxioObserver, equipado con epifluorescencia y utilizando filtros de excitación 488 y 633 nm. Las imágenes fueron tomadas utilizando el software Axiovision SE64 y son las que a continuación se muestran en las figuras 6 y 7, en donde se puede observar con claridad las poblaciones de Macrófagos y de poblaciones celulares NK.

Se realizaron fotomicrografías de los cortes histológicos para su observación con inmunofluorescencia.



**Figura 6.** Fotomicrografía con inmunofluorescencia de mucosa intestinal de modelos con CD68. El punteado rojo fluorescente hace evidente la presencia de macrófagos en los cortes.

Se realizaron fotomicrografías en los cortes histológicos con inmunofluorescencia y utilizando CD16 (NK). Las imágenes logradas indican la presencia de este grupo celular encontrado en los modelos murinos.

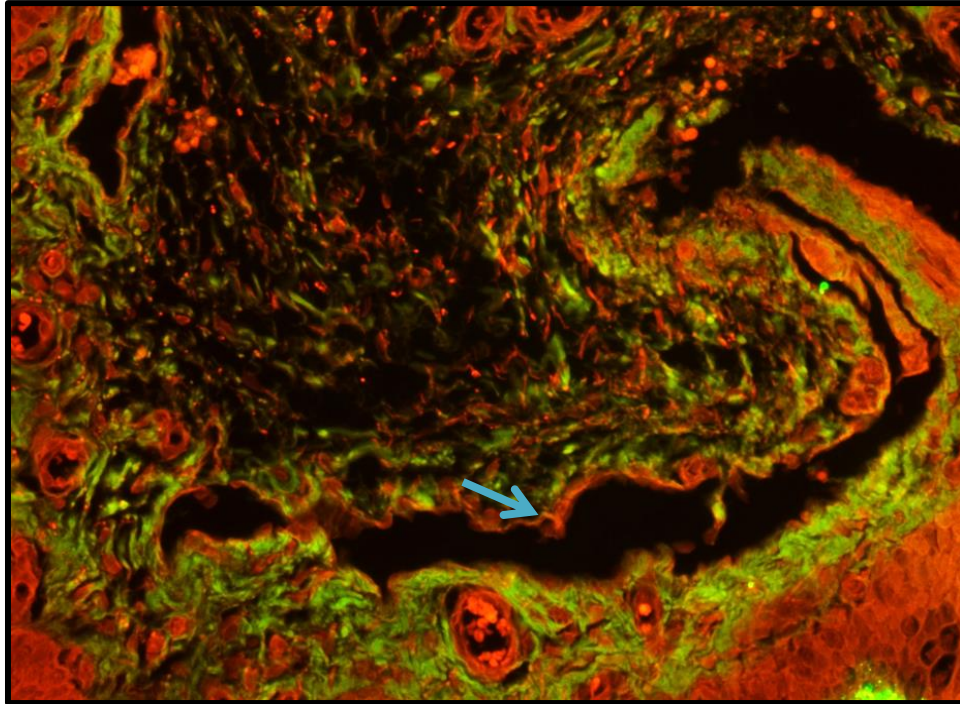
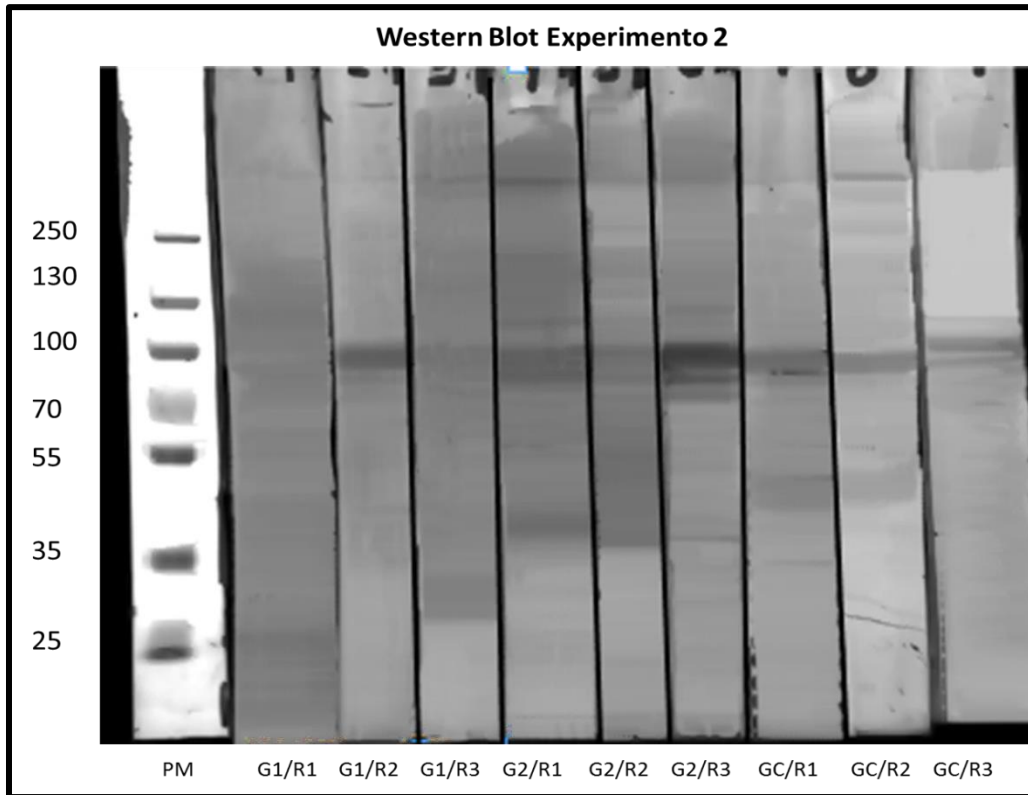


Figura 7. Fotomicrografía con inmunofluorescencia, biopsia mucosa intestinal de ratón tratado con el anticuerpo anti CGA-5 Y células tumorales. IFD con CD16. Células NK (flecha)

#### *DETECCIÓN DE ANTICUERPOS EN EL SUERO DE LOS RATONES.*

Se realizó Western Blot con los sueros de los modelos murinos empleados en todos los experimentos, obteniendo de ellos reconocimiento contra antígenos tumorales contenidos en el sobrenadante del cultivo primario de la biopsia incisional de tumores con cáncer gástrico.

La siguiente imagen muestra de manera evidente el reconocimiento de las proteínas altamente inmunogénicas del sobrenadante con el suero de los modelos.



**Figura 8.** Se observa en primer lugar el marcador de pesos moleculares y después cada carril representa el suero de los modelos murinos empleados en donde se aprecia el reconocimiento de antígenos por anticuerpos formados en los modelos. La banda horizontal más oscura identificada se encuentra en el marcador de pesos moleculares entre 70 y 100 kDa.

## DISCUSIÓN

La disfunción del sistema inmunológico, puede contribuir a la progresión del tumor en cáncer gástrico. La alteración de la función de células inmunológicas, tales como linfocitos CD8, macrófagos y células NK, resulta en la progresión del tumor en pacientes con cáncer. En este proyecto, nosotros estudiamos el papel de un anticuerpo policlonal anti-CGA-5 para estimular cierto tipo de células, tales, como: macrófagos, linfocitos y células NK, incluyendo, producción de anticuerpos. Para lo cual, en este experimento se aplicaron células obtenidas de la digestión de biopsias de tumores gástricos y se evaluó, la función de un anticuerpo contra un antígeno de secreción tumoral, en la inducción de ADCC, por la presencia de poblaciones celulares inmunológicamente involucradas, como macrófagos y células NK, ya que se conoce que la respuesta del organismo al cáncer no es un mecanismo único sino tiene similitudes con la inflamación y la cicatrización de heridas, se conoce ya la estrecha relación entre cáncer y la inflamación preexistente así como el papel inmune en la patogénesis del tumor. Recientes hallazgos sobre el microambiente tumoral han ilustrado los mecanismos bajo los cuales la inflamación promueve el tumor y tiene grandes similitudes con heridas que no sanan. Cuando un proceso inflamatorio no se resuelve genera un microambiente que facilita la transformación celular y la propagación e invasión de la enfermedad. Los tejidos con daño crónico activan una respuesta inicial de reparación que incluye factores de crecimiento y supervivencia, citocinas proangiogénicas y redes de regulación inmune (Amedei , *et al.*, 2012).

Muchas investigaciones apoyan que la inflamación aguda generada por los leucocitos que infiltran un tumor no ejercen un mecanismo de inmunoprotección que permita la erradicación y evolución del cáncer (inmunidad antitumoral), los mediadores proinflamatorios producidos en forma crónica y excesiva contribuyen a la promoción y progresión del tumor. (Balkwill F, *et al* 2005), Jiang *et al*, reporto, que las células NK, se encuentran disminuidas en el tejido de biopsias de pacientes con cáncer, sin embargo, en nuestro modelo experimental, observamos un ligero aumento, comparado con los controles (Jiang J, *et al.*, 2013)

Cuando un proceso inflamatorio es inducido redes celulares, citocinas y otras moléculas son activadas, sin embargo cada proceso puede diferir en número y participación de células. En la inflamación uno de los componentes fundamentales son los macrófagos que incluye a los subtipos M1 y M2, siendo los M1 los que facilitan la actividad antitumoral. En este experimento se observan en las inmunofluorescencias una gran cantidad de macrófagos, que aunque no se puede definir exactamente a que subtipo corresponde, sí se ha reportado en la literatura que la presencia de altos porcentajes de macrófagos identificados a través de CD 68 en pacientes con tumores están estrechamente relacionados con un pobre pronóstico particularmente en pacientes con cáncer gástrico. (Kawara. *et al.*,2010). En este proyecto tampoco se puede evaluar si los macrófagos que se expresaron son los asociados a tumor conocidos como TAM, este último tipo de macrófagos son reclutados desde los monocitos circulantes dentro del tejido en respuesta a quimioatrayentes e interactúan con células tumorales, para crear el estroma del cáncer. Los macrófagos que infiltran el tumor correlacionan

significativamente con la vascularidad tanto en cáncer esofágico y cáncer gástrico. Hay una asociación directa entre el grado de infiltración de macrófagos asociados a tumor y la profundidad de invasión, el estado de los ganglios y la etapa clínica del cáncer gástrico, sin embargo para poder definir el tipo de macrófagos que están presentes se requeriría de otros mediadores que están asociados tales como el monocito quimioatrayente de proteína 1. (Ohta, *et al.*, 2003).

En las inmunofluorescencias realizadas en los cortes de los modelos murinos que utilizamos en nuestro experimento las células que se encontraron con mayor expresión fueron la CD 16 que son marcadores células NK y es que los mecanismos efectores de la células NK pueden ser de dos tipos, los mecanismos líticos incluye la destrucción directa de las células blanco como el fenómeno de Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la citotoxicidad directa puede ser mediada además por perforinas y granzimas o por una apoptosis independiente de estas dos proteínas. Cuando esto ocurre es debido a que la molécula CD16 o FcRγIII es expresada densamente en la mayoría de las células NK y se une con baja afinidad a la fracción Fc de la inmunoglobulina (Ig) G que se encuentra unida a epítopes localizados en la superficie de una célula, pero no a las moléculas de IgG libre.

Las Células NK son parte importante de los mecanismos efectores de la inmunidad innata, contribuyendo activamente el control de las células tumorales e infectadas con microorganismos intracelulares, algunos de los mecanismos efectores adicionales de la NK es la producción de IFN-γ.

Los efectos directos citotóxicos de las células NK están determinados por su expresión en los receptores de superficie y de gránulos citotóxicos.

En este trabajo no se encontró expresión de CD8 marcador de linfocitos T citotóxicos y es que ya está bien identificado que existen múltiples mecanismos de escape inmune propuestos que pueden contribuir a la ausencia, depleción, y disfunción de linfocitos T en tumores sólidos. (Mantovani A, *et al.*, 2008). Algunos tipos de neoplasias son capaces limitar o hacer perder la expresión de MCH-I lo que los hace invisibles a los linfocitos (CD8) con lo cual pierden su capacidad de reconocimiento, este tipo de escape a la inmunovigilancia del linfocito se ha relacionado con un mal pronóstico, los linfocitos CD8+ que producen IL-17 promueven la progresión de la inflamación y se asocia a peor pronóstico. (Liu T *et al.*, 2012)

Independientemente del empleo de las líneas celulares para la inducción de diversos tipos de neoplasias en modelos murinos, en este trabajo se pudo lograr la inducción de respuestas celulares de carácter inflamatorio a través de la inyección intraperitoneal de células tumorales provenientes de tumores de pacientes con cáncer gástrico. La respuesta inmune inducida en los modelos empleados corrobora la efectividad del método empleado para inducción de la respuesta inmune humoral y celular.

## CONCLUSIONES

En este proyecto se demostró que a pesar de no emplear líneas celulares de neoplasia es factible emplear células tumorales obtenidas de biopsias incisionales y lograr la inducción de expresión y activación de grupos celulares. Se comprobó además que las células obtenidas de pacientes con cáncer y cultivadas in vitro generan nuevamente la formación de tumor a pesar de no contar con líneas celulares y emplear células de digestión que aunque son heterogéneas inducen una respuesta celular y corroborando además que el microambiente tumoral juega un papel importante en la obtención de proteínas y moléculas que pudieran servir como blancos terapéuticos.

Las limitantes para este estudio fue no contar con modelos murinos especiales (Nock out, o nude) para poder evaluar si las células tumorales obtenidas en este tipo de modelos si fueran capaces de inducir la formación de neoplasias. Es también de vital importancia poder lograr que otros modelos murinos tuvieran más tiempo de estímulo con las células tumorales, tal como se ha descrito en otros grupos de investigación entre 6 y 8 meses.

Los resultados obtenidos hasta el momento son buenos e impulsan a continuar la investigación y mejorarla empleando además otras citocinas que nos apoyen en la búsqueda de otras expresiones de inducción y o formación tumoral, así como la posibilidad de obtener proteínas de valor diagnóstico.

## BIBLIOGRAFÍA.

Ahmad A, Menezes J. *FASEB Journal* 1996;10:258-266

Ahmed N. 23 years of the discovery of *Helicobacter pylori*. Is the debate over?. *Ann Clin Microbiol Antimicrobials* 2005; 4: 17

Altekruse SF, Kosary CL, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2007/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/), based on November 2009 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2010.

Amedei A, Della Bella C, Silvestri E, Prisco D, et al. T cell in Gastric Cancer: Friends or foes. *Clin Dev Immunol.* 2012; 690571

Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 2005;7:211-217.

Boroumand-Noughabi S, Sima HR, Ghaffarzadehgan K, Jafarzadeh M, Raziee HR, Hosseinnezhad H et al. Soluble Fas might serve as a diagnostic tool for gastric adenocarcinoma. *BMC Cancer.* 2010; 10: 275

Bruttel VS, Wischhusen J. *Frontiers In immunology* .2014;5:1-13

Crew KD, Neugut AI. Epidemiology of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12(3): 354-362.

De Wever O, Demetter P, Mareel M, Bracke M. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer* 2008; 123: 2229-2238

Díaz y Orea MA, Abascal Arias A, Gómez Conde E, Castellanos Sánchez O, Díaz HA, identificación y evaluación in vitro de proteínas inmunogénicas secretadas por células tumorales obtenidas de biopsias incisionales gástricas de pacientes con adenocarcinoma gástrico, para ser utilizadas en el diagnóstico y terapéutica (en proceso)

Ditsworth D, Zong WX. NF-kappaB: key mediator of inflammation-associated cancer. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 1214-1216

Fuentes-Pananá E, Camorlinga-Ponce M, Maldonado-Bernal C. Infección, inflamación Y Cáncer Gástrico. *Salud Pública de México* 2009; 51:5

Graffner H, Hultberg B. Carcinoembryogenic antigen and lysosomal enzymes in gastric juice as an aid in the diagnosis of gastric cancer. *J Surg Oncol.* 1983; 24(3): 233-5.)

Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, Karin M. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 2004; 118: 285-296

Hamashima C, Shibuya D, Yamazaki H, Inoue K, Fukao A, Saito H et al. The Japanese Guidelines for Gastric Cancer Screening. *Jpn J Clin Oncol.* 2008; 38(4): 259-267.

Hardt PD, Ngoumou BK, Rupp J, Schnell-Kretschmer H, Kloer HU. Tumour M2-pyruvate kinase: A promising tumor marker in the diagnosis of gastro-intestinal cancer. *Anticancer Res.* 2000;20:4965-8.

Higashivama M, Ito T, Tanaka E, Shimada Y. Prognostic significance of osteopontin expression in human gastric carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2007;14:3419-27  
Hye Won Chung, Jong-Baeck Lim Role of the tumor microenvironment in the pathogenesis of gastric carcinoma *World J Gastroenterol* 2014;21:1667-1680

Hong-Kai Z, Qiu-Min Z, Tie-Hua Z, Yuan-Yuan Li, et al, Expression of mucins and E-cadherin in gastric carcinoma and their clinical significance *World J Gastroenterol* 2004;10(20):3044-3047

Jackson C, Cunningham D & Oliveira J. Gastric cancer: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2008; 19 (Suppl 2): ii23–ii24.

Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 2006; 441: 431-436

Kawara A, Hattori S, Akiba J, Nakashima K, Taira T, Watari K, Hosoi F et al. Infiltration of thymidine phosphorylase-positive macrophages is closely associated with tumor angiogenesis and survival in intestinal type gastric cancer. *Oncol Rep* 2010;24:405-415

Khan FA, Shukla AN. Pathogenesis and treatment of gastric carcinoma: "An up-date with brief review". *J Can Res Ther* 2006;2:196-9

Kirkwood JM, Butterfiel LH, Tarhini AA. Immunotherapy Of Cancer in 2012. *CA Cancer J Clin* 2012;62: 309-335

Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965; 64: 31-49.

Lhan O, Han Ü, Önal B, Çelk SY. Prognostic significance of MUC1, MUC2 and MUC5AC expressions in gastric carcinoma. *Turk J Gastroenterol* 2010; 21 (4): 345-352

Li Q, Ai J, Song Z, Liu J et al. *Cellular & Molecular Immunology.* 2008;5:379-384

Liu T, Peng L, Yu P, Zhao Y, Shi Y, Mao X, Chen W et al. Increased Circulating Th22 and Th 17 cells are associated with tumor progression and patient survival in human gastric cancer. *J Clin Immunol* 2012;32:1332-1339

Ma GF, Miao Q, Zeng X-Q, Luo T-C, Ma L-L, et al. Transforming Growth Factor-b1 and -b2 in Gastric Precancer and Cancer and Roles in Tumor-Cell Interactions with Peripheral Blood Mononuclear Cells In Vitro. *PLoS ONE* 20138(1):e54249.

Male D, Brostoff J, Roth D. *Inmunologia* 8ava Edn. Elsevier Saunders)

Mantovani A, Romero P, Palucka AK, Marincola FM. Tumor Immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. *Lancet* 2008; 371-83

Matsueda S, Graham D. *World J Gastroenterol* 2014 February 21; 20(7): 1657-166

McClain MS, Schaffer CL, Israel DA, et al. Genome sequence analysis of *Helicobacter pylori* strains associated with gastric ulceration and gastric cancer. *BMC Genomics* 2009; 10: 3

Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000, the global picture. *Eur J Cancer* 2001; 37: S4-S66.

Li M, Gao J, Feng R, Wang Y, et al. Generation Of Monoclonal antibody MS17-57 targeting secreted alkaline phosphatase ectopically expressed on the surface of gastrointestinal cancer cells. *Plos One* 2013;8:e77398.

Moretta L, Pietra G, Montaldo E, Vacca P et al. *Frontiers In Immunology*. 2014; 5: 1-8

Ohta M, Kitadai Y, Tanaka S, Yoshihara M, Yasui W, Mu- kaida N, Haruma K, Chayama K. Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2002; 102: 220-224

Ohta M, Kitadai Y, Tanaka S, Yoshihara M, Yasui W, Mu- kaida N, Haruma K, Chayama K. Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human gastric carcinomas. *Int J Oncol* 2003; 22: 773-778

Parkin DM. International variation. *Oncogene* 2004; 23: 6329-6340.

Playfair JHL, Chain BM. *Immunology at a Glance*. 9th edn. Wiley- BlackWell; 2009

Poggi A, Zocchi MR. *J Frontiers in Immunology*. 2014; 5: Art 27; 1-14

Pounder RE, Ng D. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment Pharmacol Ther* 1995; 9 Suppl 2: 33-39

Pritchard DM, Przemeck. Review article: how useful are the rodent animal models of gastric adenocarcinoma? *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 841–859

Raulet DH, Guerra N. Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural Killer cell receptors. *Nat Rev Immunol* 2009;9:568-580)

Rodgers JR, Cook RG. MHC class Ib molecules bridge innate and acquired immunity. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 459-471.

Ruibal, A. Marcadores tumorales de secreción: situación actual. *Med Clin (Barc)* 2002;118:750-756

Scharovsky, P. Matar, M.Z. Fluck, M.J. Rico, G.A. Rabinovich O.G From immune surveillance to tumor-immune escape: the story of an enemy with multiple strategies of resistance and counterattack. *Inmunología* 2006;25: 101-114

Seidel UJE, Schlegel P, Lang P . Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies. *Frontiers Immunol* 2013;4:76

Serrano A, Hernández MC, De la Garza J, Herrera LA. *Helicobacter pylori* y Cáncer Gástrico. *Cancerología* 4 (2009): 193-204

Shimoyama T, Fukuda S, Liu Q, Nakaji S, Fukuda Y, Sugawara K. *Helicobacter pylori* water soluble surface proteins prime human neutrophils for enhanced production of reactive oxygen species and stimulate chemokine production. *J Clin Pathol* 2003; 56: 348-351

Wanebo HJ, Kennedy BJ, Chmiel J, Steele G Jr, Winchester D, Osteen R. Cancer of the stomach: A patient care study by the American College of Surgeons. *Ann Surg* 1993; 218(5): 583-92.

Wang CS, Wu TL, Tsao KC, Sun CF. Serum TIMP-1 in gastric cancer patients: a potential prognostic biomarker. *Ann Clin LabSci.* 2006;36:23-30

Xu Y, Zhang L, Hu G. Potential application of alternatively glycosylated serum MUC1 and MUC5AC in gastric cancer diagnosis. *Biologicals.* 2009; 37(1): 18-25.

Wolf AM, Wolf D, Steurer M. Increase of Regulatory T Cells in the Peripheral Blood of Cancer *Clin Cancer Research* 2003; 9, 606–612

Xing F, Saidou J, Watabe K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front Biosci* 2010; 15: 166-179

Yamamoto S. Stomach cancer incidence in the world. *Jpn J Clin Oncol* 2001; 31: 471)

Zabaleta J Multifactorial etiology of gastric cancer. *Methods Mol Biol.* 2012;863:411-3  
Compare D, Rocco A, Nardone G. Risk factors in gastric cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2010; 14(4): 302-85)