

75

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO



FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACION DE POBLACIONES INMUNOCELULARES  
EN SANGRE Y LIQUIDO PLEURAL DE PACIENTES  
CON CANCER PULMONAR.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A  
ULISES MORALES CACIQUE

280269



MEXICO, D.F.

2000



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

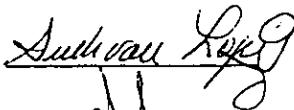
Jurado asignado:

Presidente	Prof. JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ
Vocal	Prof. ANA ESTHER AGUILAR CÁRDENAS
Secretario	Prof. ROSANA PELAYO CAMACHO
1er. Suplente	Prof. JORGE FERNANDO PANIAGUA SOLIS
2do. Suplente	Prof. MÓNICA VIVEROS ROGEL

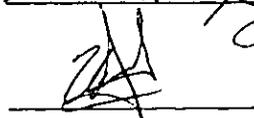
Sitio donde se desarrolló el tema:

LABORATORIO DE CÁNCER PULMONAR DEL DEPARTAMENTO DE ENFERMEDADES CRÓNICO DEGENERATIVAS DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS.

Asesor: Dr. JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ



Sustentante: ULISES MORALES CACIQUE



A Dios, por la vida y todas las oportunidades.

A mi madre, Ma. Guadalupe Cacique Bahena, por su amor, su apoyo incondicional y su comprensión, manifestarme las maravillas de Dios.

A mi padre, Dámaso Morales Sandoval ( ).

A mi abuelita, Petra Bahena Guerrero ( ) y a mi tía Teresa, por todo ese cariño, esa entereza, y ese espíritu humano que me brindaron.

A mis hermanos Lorena, Mireya, Yarmil, Alfonso y Eric, por estar siempre al pendiente de mí, por su valioso apoyo y consejo.

A mis tíos, Alicia y Cándido, por la solidaridad para con mi familia.

A mis cuñados Oscar, Cony, Liz, Marco, José.

A mis sobrinos Cindel, Itzel, Fernando, Rubén, José, Ivonne, Omar, Sergio y el bebé, por todas esas enseñanzas que con el paso del tiempo se olvidan, la sencillez de un niño.

A mis primos César, Wendy, Oscar y Yadira.

A mis amigos Alfredo Díaz, Miriam Galicia, Verónica García, Susana Romero, Patricia Velázquez, Patricia Rangel y Ernestina por tantos momentos tan gratos que hemos compartido, sus palabras, que han construido una sólida amistad.

A mis compañeros de la Facultad de Química María Luisa Mendoza, Alicia Miranda, Alma Torres, Rivelino Flores, Angélica Pablo, Leonila Martínez, Gladys Balcazar, Aurora Lara, Olivia González y Andrés Bobadilla.

A mis compañeros del INER Dolores, Lupita, Mónica, Sandra, Alejandro Nieto y Alejandro Jiménez.

Al Dr. José Sullivan López González, por su paciencia, apoyo e interés en el presente proyecto, por su participación en mi formación profesional y su amistad.

# ÍNDICE

## ABREVIATURAS

1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 CÁNCER	8
1.1.1 Generalidades	8
1.1.2 Factores asociados al cáncer pulmonar	10
1.1.3 Tipos histológicos de cáncer pulmonar	11
1.2 SISTEMA INMUNE	14
1.2.1 Monocitos/macrófagos	15
1.2.2 Linfocitos T	17
1.2.3 Linfocitos B	20
1.2.4 Citocinas	22
2. ANTECEDENTES	28
2.1.1 Citometría de flujo	28
2.1.2 Tinción de citocinas intracelulares	30
2.1.3 Polarización de la respuesta inmune	34
2.1.4 Derrame pleural	37
2.1.5 Poblaciones inmunocelulares en cáncer pulmonar	38
2.1.6 Producción de citocinas tipo Th1 y Th2 en cáncer pulmonar	41
3. JUSTIFICACIÓN	43
4. OBJETIVOS	44
5. HIPÓTESIS	45
6. MATERIALES Y MÉTODOS	46
6.1.1 Reactivos y anticuerpos	46
6.1.2 Recolección y procesamiento de muestras	47
6.1.3 Preparación de reactivos	48
6.1.4 Determinación de linfocitos T y sus subpoblaciones, linfocitos B y monocitos/macrófagos	49
6.1.5 Determinación de subpoblaciones de linfocitos T productoras de IFN- $\gamma$ /IL-4 e IL-10	51
6.1.6 Determinación de monocitos/macrófagos productores de TNF- $\alpha$	54

6.1.7	Análisis por citometría de flujo	56
6.1.8	Análisis estadístico	56
7.	RESULTADOS	57
7.1.1	Determinación de linfocitos CD45 <sup>+</sup> , CD3 <sup>+</sup> y CD19 <sup>+</sup>	57
7.1.2	Determinación de linfocitos T y sus subpoblaciones	57
7.1.3	Detección de monocitos/macrófagos	59
7.1.4	Determinación de los niveles basales y máximo de activación de linfocitos T en base a la expresión de la molécula CD69	60
7.1.5	Determinación del perfil de citocinas (IFN- $\gamma$ /IL-4 e IL-10) por linfocitos T	61
7.1.6	Producción de TNF- $\alpha$ a partir de monocitos/macrófagos	61
7.2	TABLAS	63
7.3	FIGURAS	66
8.	DISCUSIÓN	80
9.	CONCLUSIONES	89
10.	BIBLIOGRAFÍA	90

## ABREVIATURAS

APC	Célula presentadora de antígeno
BCR	Receptor de la célula B
BFA	Brefeldina A
BSA	Albúmina sérica bovina
CMN	Células mononucleares
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente unido a enzima
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GM-SCF	Factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos
G-SCF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
IFN- $\gamma$	Interferón gama
IL	Interleucina
LPS	Lipopolisacárido
LT	Linfotoxina
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
M-SCF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
NK	Células asesinas naturales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina
PerCP	Perinilclorofil proteína

PHA	Fitohemaglutinina
PMA	Forbol miristato acetato
RIA	Radioinmunoanálisis
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
Tc	Linfocito T citotóxico
TCR	Receptor de la célula T
TGF- $\beta$	Factor transformante de crecimiento beta
Th	Linfocito T cooperador
TIL	Linfocitos infiltrantes al tumor
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 CÁNCER

### 1.1.1 GENERALIDADES

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, superado sólo por las enfermedades cardiovasculares<sup>1</sup> y se caracteriza por el crecimiento no controlado de un conjunto de células. El crecimiento neoplásico es ocasionado por la falla en alguno de los mecanismos que regulan el ciclo celular, como pueden ser mutaciones en los genes que codifican receptores de membrana cuyos ligandos tienen la función de inhibir la proliferación celular, o en los genes que codifican las proteínas que transducen la señal de no proliferación hacia el núcleo o proteínas mutadas que proporcionen a la célula señales permanentes de proliferación e inclusive por la falla en los sistemas tanto de revisión de integridad como de reparación del material genético<sup>2,3</sup>.

Se ha propuesto un mecanismo de carcinogénesis que involucra tres fases: iniciación, promoción y progresión<sup>4,5,6</sup>. La iniciación se lleva a cabo cuando la célula es agredida por algún agente genotóxico, que puede ser químico, físico o biológico<sup>6</sup>, ocasionando una mutación en alguna secuencia del DNA; esta mutación crea sitios frágiles o sensibles que conllevan a mutaciones posteriores y en este caso se dice que la célula está iniciada<sup>4,6</sup>.

La promoción consiste en el incremento de mutaciones en una célula, cuando hay algún factor que favorezca la acción de los carcinógenos. Cabe mencionar, que ni el agente promotor ni sus metabolitos producen mutaciones *per se*. Si el mismo u otro carcinógeno sigue en contacto con la célula iniciada, pueden producirse en ella mayor número de mutaciones, originándose cada vez

más sitios sensibles a mutaciones de forma tal que la célula puede ganar autonomía al no depender de las señales del microambiente para proliferar; cada nueva célula va sufriendo alteraciones en su material genético contribuyendo esto a la heterogeneidad entre las células tumorales<sup>4,6</sup>.

En la etapa de progresión, la célula adquiere autonomía al proliferar y produce la acumulación de células transformadas, formando un tumor *in situ*<sup>4,6</sup>. Al ir creciendo el tumor algunas de sus células pueden penetrar en los tejidos adyacentes, fenómeno conocido como invasión. Estas células transformadas pueden alterar la expresión de moléculas de adhesión, lo que favorece su separación de las células vecinas y podrían migrar hacia la membrana basal; cuando esto ocurre, y si las células neoplásicas son capaces de sintetizar enzimas proteolíticas como la colagenasa y otras, entonces pueden degradar la membrana basal de los vasos sanguíneos y pasar a la circulación, de donde pueden llegar a cualquier sitio del organismo para establecerse y formar un nuevo desarrollo tumoral. El proceso anterior se denomina metástasis y es una característica de aquellos tumores llamados malignos<sup>6,7</sup>.

Para que una mutación origine una célula iniciada debe producirse en ciertos genes que una vez mutados proporcionen autonomía a la célula<sup>3</sup>. Los protooncogenes son genes dominantes que codifican proteínas que participan como señal positiva en la proliferación celular<sup>4,5</sup>; estos se dividen en cinco grupos que son: factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, transductores intracelulares, factores de transcripción nuclear y proteínas de control del ciclo celular<sup>8</sup>. Se ha reportado gran cantidad de genes que se encuentran mutados en diversos tipos de cáncer, algunos de los más importantes son los genes *c-myc*, *c-src*, *erbB-1* y *ras*, entre otros<sup>2,3,8</sup>. Por otro lado, en general, los genes supresores del tumor son aquellos genes recesivos que

codifican proteínas involucradas en la señal negativa de proliferación celular<sup>3,4,5,8</sup>; una mutación en estos genes conduce a la proliferación de las células dañadas; los mas estudiados son el gen del retinoblastoma (Rb) y la proteína p53<sup>2,3,8</sup>.

### 1.1.2 FACTORES ASOCIADOS AL CÁNCER PULMONAR

El cáncer pulmonar presenta la mayor morbilidad y mortalidad entre todos los tipos de cáncer, siendo el carcinoma epidermoide y el adenocarcinoma los subtipos de mayor incidencia<sup>1</sup>.

Se han descrito gran cantidad de factores ambientales o de exposición que favorecen la aparición o desarrollo del cáncer pulmonar. Los hábitos alimenticios juegan un papel importante pues la presencia de conservadores en alimentos enlatados favorece las mutaciones, ya que actúan como promotores. De igual modo, la ingesta de gran cantidad de calorías se ha relacionado con una mayor tasa de proliferación celular, con lo cual habría mayor frecuencia de mutaciones. Por otro lado, se ha propuesto que la ingesta de ciertos antioxidantes como algunas vitaminas pueden participar en la prevención del cáncer al neutralizar los radicales libres. Con respecto a esto último, se ha observado que los individuos con alta ingesta de  $\beta$ -caroteno y vitamina C presentan menor riesgo de desarrollar cáncer pulmonar a futuro<sup>5,9,10</sup>.

El tabaquismo ha sido relacionado principalmente con el cáncer de pulmón pues se han encontrado gran cantidad de carcinógenos y promotores en el humo del cigarro, además de que las partículas que se aspiran junto con el humo dañan el epitelio que recubre los bronquios y los alvéolos, conduciendo a un daño celular, que junto con los carcinógenos presentes pueden producir mutaciones en las células epiteliales. Aproximadamente el 20% de los

fumadores desarrolla algún tipo de carcinoma pulmonar; este porcentaje depende del tipo de tabaco, el uso de filtros, la edad de inicio de tabaquismo, el índice tabáquico (número de cajetillas consumidas en un año), etc. Se ha encontrado relación entre el desarrollo de cáncer pulmonar y los fumadores pasivos, esto es, personas que están expuestas al humo del cigarro de un fumador<sup>8,10,11</sup>.

El radón, un gas que se produce por el decaimiento radiactivo del uranio, también se ha relacionado con el cáncer pulmonar. Se ha observado gran incidencia de cáncer pulmonar en trabajadores de minas de uranio y/o en personas que viven cerca de éstas. Se sabe que el radón emite partículas alfa que son aspiradas y llegan a los conductos bronquiales, dañando la integridad celular y aumentando por lo tanto la posibilidad de aparición de mutaciones<sup>5,8,10,11</sup>.

El asbesto está constituido principalmente por silicatos, y es útil en la construcción de viviendas así como en la elaboración de materiales adiabáticos. Cuando las fibras de asbesto ingresan a las vías respiratorias son fagocitadas por los macrófagos y al no ser degradadas pueden dar origen a una acumulación de células fagocíticas, proceso conocido como asbestosis. Se considera que una exposición prolongada a altas dosis de asbesto puede provocar cáncer pulmonar, debido a la agresión contra los epitelios, aunque algunos autores discuten que dichas dosis son difíciles de alcanzar a menos que se trate de una exposición ocupacional<sup>4,8,11</sup>.

### 1.1.3 TIPOS HISTOLÓGICOS DE CÁNCER PULMONAR

La clasificación de los tumores pulmonares se basa principalmente en la microscopía de luz, aunque recientemente se ha apoyado de otras técnicas como la inmunohistoquímica y la microscopía electrónica. Se han propuesto diversos

esquemas de clasificación, siendo el más aceptado el presentado por la Organización Mundial de la Salud en 1981, el cual clasifica los tumores pulmonares primarios en 1) adenocarcinoma, 2) carcinoma epidermoide, 3) carcinoma de células grandes y 4) carcinoma de células pequeñas. Los tumores presentan distintos grados de diferenciación, el cual se asigna según la zona menos diferenciada. Se dice que un tumor es bien diferenciado cuando no presenta gran diferencia histológica en comparación con el tejido que le dio origen; un tumor pobremente diferenciado pierde el parecido con el tejido normal y se asemeja a las células pluripotenciales. Debido a su comportamiento clínico, los tres primeros grupos se designan comúnmente como carcinoma de células no pequeñas. Cada tipo histológico se ha asociado a ciertos factores ambientales o de exposición y genéticos del individuo<sup>11,12,13,14</sup>.

### *Adenocarcinoma*

Es el tipo histológico más frecuente en ambos sexos y representa del 30 al 35% de los casos de cáncer pulmonar. En su mayoría, el adenocarcinoma se presenta como un tumor periférico, presentando sintomatología en etapas tardías; por su localización, es el principal tipo histológico en metastatizar a pleura, siendo el hígado, glándula adrenal, hueso y sistema nervioso central otros blancos muy frecuentes. De acuerdo a su patrón de crecimiento y producción de moco, se subclasifica en cuatro categorías: acinar, papilar, broncoalveolar y carcinoma sólido con formación de moco; según el grado de diferenciación también se subdividen en tumor pobremente, moderadamente y bien diferenciado. Una propiedad característica del adenocarcinoma es la producción de mucina, lo cual es muy importante y útil durante los exámenes de diagnóstico y clasificación<sup>11,12,13,14</sup>.

### *Carcinoma epidermoide*

Aproximadamente el 30% de los casos de cáncer pulmonar pertenecen al carcinoma epidermoide, el cual en su mayoría se presenta como un tumor central en el epitelio bronquial proximal y de tamaño medio, por lo que presenta sintomatología en etapas tempranas. Varios autores han encontrado una estrecha relación con el hábito tabáquico. Se ha sugerido que el origen del carcinoma epidermoide se debe a la inflamación crónica o daño al epitelio bronquial lo que origina la sustitución de células epiteliales ciliadas normales por células escamosas. Al igual que el adenocarcinoma, el carcinoma epidermoide puede dividirse en pobremente, moderadamente y bien diferenciado. En estos últimos, la presencia de perlas de queratina y puentes intercelulares es característica. Los tumores bien diferenciados pueden alcanzar gran tamaño sin metastatizar, aunque se han reportado metástasis a cerebro<sup>11,12,13,14</sup>.

### *Carcinoma de células pequeñas*

Este tumor se presenta en un 20% de los casos de cáncer pulmonar, se origina en las vías respiratorias centrales y se le ha propuesto un origen neuroendócrino. Es un tumor sumamente agresivo y metastatiza de manera temprana y rápida, principalmente a nódulos linfáticos. Se ha reportado que el carcinoma de células pequeñas causa algunos síndromes hormonales debido a la producción ectópica de ciertas hormonas. Este tipo histológico se subclasifica como limitado o extensivo según su diseminación fuera del tórax, y por sus características celulares en: células en forma de avena, intermedias o combinadas. Las células de este tumor son muy semejantes a los linfocitos normales, pero de mayor tamaño; para realizar el diagnóstico se recurre a tinciones inmunohistoquímicas de marcadores neuroendócrinos como son la

enolasa neuroespecífica, la bombesina y la cromogranina. Los pacientes no tratados tienen una supervivencia de 2 a 3 meses<sup>11,12,13,14</sup>.

### *Carcinoma de células grandes*

Representan del 10 al 20% de los tumores pulmonares. En este grupo se encuentran todos aquellos tumores que no cumplen las características de los otros tipos histológicos, es decir, son células no diferenciadas, con gran núcleo, nucleolo prominente, sin producción de queratina o mucina y sin diferenciación de célula pequeña. Presentan origen bronquial. El patrón de metástasis es similar al del adenocarcinoma pero con predominio cerebral. Se pueden dividir en dos grupos, carcinoma de células gigantes el cual es muy agresivo y presenta células multinucleadas y gran infiltrado leucocitario, y el carcinoma de células claras que contiene grandes cantidades de glucógeno. Muchas veces se encuentran patrones microscópicos que sugieren algún otro tipo histológico, por lo que algunos autores lo consideran una variante del adenocarcinoma o del carcinoma epidermoide totalmente desdiferenciado, realizándose el diagnóstico diferencial por medio de inmunohistoquímica<sup>11,12,13,14</sup>.

## **1.2 SISTEMA INMUNE**

Cuando algún agente extraño entra al organismo, se enfrenta en primera instancia a las barreras mecánicas y posteriormente a los componentes de la inmunidad natural; si estos mecanismos no son suficientes para la erradicación del agente invasor, debe ser activado algún mecanismo especializado contra el agresor. Entre las células que participan en los mecanismos de defensa del huésped se encuentran las células NK, los monocitos/macrófagos, los linfocitos

T y los linfocitos B<sup>15,16</sup>. En el presente trabajo sólo se describirán aquellas células que se determinaron durante la parte experimental.

### 1.2.1 MONOCITOS/MACRÓFAGOS

Los monocitos son células que derivan de la médula ósea a partir del precursor mieloide y se encuentran en la circulación sanguínea; los monocitos infiltran los tejidos en donde maduran dando lugar a las células del sistema fagocítico mononuclear. Durante la maduración y activación, los monocitos proliferan y cambian su tamaño y estructura interna, además de que sintetizan gran cantidad de productos involucrados en la erradicación de agentes extraños, conociéndose ahora como macrófagos<sup>15,16</sup>.

Se han utilizado distintas técnicas con el fin de identificar a los monocitos, las más utilizadas han sido las tinciones citoquímicas de esterasa no específica y fosfatasa alcalina<sup>17</sup>. Actualmente, se han utilizado anticuerpos dirigidos contra moléculas de superficie de las células; los marcadores más utilizados son el CD14, el cual es el receptor para el lipopolisacárido (LPS) presente en la pared celular de las bacterias gram-negativas; el CD16, conocido anteriormente como el receptor tipo III para la fracción Fc de la inmunoglobulina G (FcγRIII), que participa biológicamente en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo y la opsonización; el CD11b, que forma parte de las moléculas de adhesión de la familia de las integrinas; el CD33, que participa en la adhesión celular dependiente de ácido siálico; y el CD68, del cual se desconoce su función, aunque se le ha encontrado asociado a la membrana lisosomal<sup>16,18</sup>.

Además de los antes mencionados, los monocitos presentan otras proteínas de superficie como los receptores para manosa y lectinas que facilitan

la fagocitosis de los microorganismos que presenten dichas sustancias en su superficie externa<sup>8</sup>, los receptores FcγRI y FcγRII, las moléculas CR1 y CR3 que actúan como receptores para fracciones solubles del complemento con las mismas funciones que el FcγRIII, la molécula clase II codificada por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC-II) implicada en el proceso de presentación de antígenos, razón por lo cual se incluyen en el grupo de células presentadoras de antígeno profesionales (APC)<sup>8,17,18</sup>.

Los macrófagos tienen capacidad fagocítica, por lo que al exponerse a partículas extrañas emiten prolongaciones de la membrana plasmática denominadas pseudópodos, formando fagosomas que se fusionan posteriormente con lisosomas con el fin de degradar el material fagocitado. Los lisosomas contienen una amplia variedad de enzimas hidrolíticas ácidas (proteasas, lipasas, ribonucleasas), metabolitos reactivos de oxígeno provenientes de la vía de la mieloperoxidasa (anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo) y óxido nítrico originado a partir de arginina<sup>8,17</sup>.

Una vez activados, los macrófagos sintetizan gran cantidad de mediadores solubles destacando entre ellos los factores de crecimiento para granulocitos y macrófagos (GM-CSF, G-CSF y M-CSF), proteínas del complemento (C1 a C5, factor B, factor D y properdina), citocinas inflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF-α), factores quimiotácticos, citocinas antiinflamatorias (IL-10, TGF-β) y algunos lípidos involucrados en la inflamación (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos)<sup>8,17</sup>.

Los macrófagos al integrarse al grupo de APC, participan en la iniciación de la respuesta inmune por medio de la activación de linfocitos T<sup>8</sup>.

## 1.2.2 LINFOCITOS T

Los linfocitos T presentan un receptor específico en su superficie denominado receptor de la célula T (TCR) formado por las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , el cual reconoce fragmentos peptídicos unidos a las MHC. El TCR se encuentra asociado a un complejo de cinco proteínas denominado CD3 ( $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  y  $\eta$ ) que se encarga de la transducción de la señal iniciada por la interacción MHC-peptido-TCR hacia el interior de la célula<sup>15,19</sup>.

Para los linfocitos T se han reportado diferentes marcadores de superficie, como son: el CD28 que se encuentra presente en los linfocitos CD4<sup>+</sup> e interacciona con la molécula B7 (CD80) presente en la APC durante la activación del linfocito T, el ligando de CD40 (CD40L o CD154) proteína que al interaccionar con la molécula CD40 del linfocito B participa en el cambio de isotipo, CD2 conocido como el receptor de eritrocitos de carnero que participa en la adhesión entre el linfocito T y la APC, y el CD5, molécula que participa en la transducción de señales<sup>15,19</sup>.

Los linfocitos T al ser activados cambian morfológicamente presentando mayor tamaño, proceso conocido como transformación blástica. El linfocito T activado produce IL-2 que favorece la proliferación de éste y los demás linfocitos T y expresa sobre su membrana celular el receptor para esta interleucina (CD25), razón por lo cual se considera a esta interleucina como autócrina y parácrina<sup>15,19</sup>.

### *Linfocitos T cooperadores*

Los linfocitos T cooperadores (Th) se caracterizan por presentar, además de las moléculas arriba mencionadas, la molécula CD4, la cual sirve como un co-receptor para la MHC-II presente en la APC durante el proceso de activación

del linfocito T. La función principal de los linfocitos Th es la de proveer un microambiente de citocinas con el fin de modular la respuesta inmune<sup>15</sup>.

### Linfocitos Th1 y Th2

En 1984, Mossman describió dos clases de linfocitos Th de acuerdo al patrón de citocinas producidas por líneas celulares murinas. Las clonas que produjeron IL-2 e IFN- $\gamma$  las denominó Th1, mientras que aquellas que produjeron IL-4, IL-5 e IL-10 recibieron el nombre de Th2<sup>20</sup>.

Otros autores estudiaron linfocitos T humanos buscando análogos de las clonas murinas, llegando a hallazgos similares. Además, otros reportes indican la existencia de linfocitos T que producen tanto IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-4 así como linfocitos que secretan IFN- $\gamma$  e IL-4, por lo que a estas células se les denominó Th0<sup>20,21,22</sup>.

De lo anterior, se ha propuesto un esquema de activación y diferenciación para la clasificación de los linfocitos T cooperadores. Los linfocitos pre-Th son linfocitos T CD4<sup>+</sup> que no han entrado en contacto con el antígeno y producen solamente IL-2, cuando el linfocito es activado comienza un proceso de diferenciación en el que la célula produce IFN- $\gamma$  e IL-4 y menores cantidades de IL-2, conociéndose este estadio como linfocito Th0. Conforme continúa el proceso de diferenciación, el linfocito adquiere un patrón diferencial de citocinas, aquellos que producen IFN- $\gamma$  y TNF- $\beta$ , se clasifican como Th1, mientras que aquellos que secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 se denominan Th2<sup>22</sup>. Se ha propuesto una subdivisión de linfocitos Th0 como fases transitorias de diferenciación, según secreten IL-2 e IL-4 (Th0A) o secreten IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-4 (Th0B) y la existencia de linfocitos Th3, los cuales sintetizan predominantemente TGF- $\beta$ <sup>23</sup>.

### *Linfocitos T citotóxicos*

Los linfocitos T citotóxicos (Tc) se distinguen por poseer en su superficie la molécula CD8 que sirve como co-receptor de la MHC-I durante el proceso de activación de la célula T. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> antes de ser activados se conocen como pre-Tc y para su activación, maduración y proliferación necesitan de IL-2 e IFN- $\gamma$ , además de la interacción APC-linfocito pre-Tc, para poder llevar a cabo su función<sup>15,16</sup>.

Como su nombre lo indica, el linfocito Tc va a producir la muerte de la APC que lo active, siendo éste el principal mecanismo de erradicación de células infectadas por virus, por bacterias o parásitos intracelulares, así como células provenientes de un trasplante o células transformadas<sup>8,16</sup>.

Los mecanismos efectores de los linfocitos Tc son 1) la liberación de perforina, proteína que forma poros en la membrana de la célula diana de forma tal que ésta muere por pérdida del control de su permeabilidad, 2) granzimas que al entrar en contacto con la célula blanco provocan que se degrade su propio material genético, 3) el linfocito Tc presenta en su superficie la molécula ligando de Fas (FasL, CD95L) la cual interacciona con la proteína Fas (CD95) en la célula diana induciendo la apoptosis. Además, se ha reportado que los linfocitos Tc producen y liberan cantidades considerables de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y, en menores cantidades, IL-2, citocinas que presentan una amplia gama de funciones efectoras e inmunoreguladoras<sup>15,16</sup>.

Recientemente, los linfocitos Tc también se han dividido en base al patrón de citocinas producido. Se ha descrito la existencia de clones de linfocitos T CD8 que sintetizan IL-2 e IFN- $\gamma$  y otras que producen IL-4, IL-5 e IL-10, a las cuales se les ha denominado Tc1 y Tc2, respectivamente<sup>24</sup>; de igual forma, se

han reportado linfocitos T  $\gamma\delta$  que presentan esta dicotomía siguiendo el mismo patrón que los linfocitos Th<sup>23</sup>. Por esto, algunos autores prefieren denominar linfocitos Th1 y Th2 a las clonas murinas, mientras que aquellas respuestas *in vivo*, tanto en modelos animales como humanos, son referidas como tipo Th1 y tipo Th2<sup>23</sup>.

Aún no se ha determinado claramente la importancia funcional de estos subgrupos. Sin embargo, se considera que los linfocitos Tc1 reconocen al antígeno siempre y cuando éste haya sido procesado y presentado en el contexto de las MHC-I, lo cual significa que este antígeno es intracelular y al activarse el linfocito T va a producir la muerte de la célula que presentó al antígeno; en cambio, se considera que los linfocitos Tc2 cooperan con el linfocito B cuando éste participa como APC. La colaboración de estos subgrupos podría ser participando en crear el microambiente de citocinas en el sitio donde se está activando la respuesta inmune.

### 1.2.3 LINFOCITOS B

Los linfocitos B son células encargadas de la síntesis de anticuerpos y se producen en la médula ósea, lugar donde se lleva a cabo el proceso de maduración y selección a partir del precursor linfoide. Estas células inmunes presentan en su superficie una inmunoglobulina de superficie denominada receptor de la célula B (BCR) que es específica para cierto determinante antigénico y se origina por el reordenamiento de los genes de la inmunoglobulina, durante la ontogenia del linfocito B. Este receptor es capaz de reconocer al antígeno en su forma nativa, puesto que interacciona con la estructura secundaria del determinante antigénico<sup>15,16</sup>.

Las proteínas de superficie que caracterizan a los linfocitos B son: el BCR, la MHC-II, el CD19, CD20, CD21 que participan en el proceso de proliferación y diferenciación a célula plasmática; el CD40, al que se le ha descrito una función coestimuladora en la activación y el cambio de isotipo en la célula B, la proteína B7 (CD80) que es clave durante la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, y FcγRII, que proporciona un sistema de retroalimentación negativa en la producción de inmunoglobulinas<sup>8,15,16</sup>.

Cuando el antígeno reacciona con el BCR del linfocito B se produce la activación de éste. Para que el linfocito B se active y prolifere es necesaria además la presencia de la IL-4, IL-5 e IL-6, participando esta última en la liberación de los anticuerpos. Los anticuerpos producidos por la célula B muestran la misma especificidad del BCR, ya que son producto de una variante en el procesamiento del RNAm que codifica para el BCR la cual elimina los fragmentos transmembranal y citoplasmático de este último, por lo que se podría decir que los anticuerpos son la forma soluble del BCR. El linfocito B diferenciado origina a la célula plasmática, que presenta mayor tamaño que el linfocito B en reposo, evidenciándose la intensa síntesis de proteínas por poseer un aparato de Golgi prominente<sup>15,16</sup>.

Los anticuerpos pueden dividirse de acuerdo al tipo de cadena pesada que poseen en cinco isotipos: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. La inmunoglobulina de superficie de la mayoría de los linfocitos B es del isotipo IgM asociado a la IgD, por lo que los primeros anticuerpos secretados son del isotipo IgM. En posteriores contactos con el antígeno y dependiendo del microambiente de citocinas y factores solubles, se pueden producir anticuerpos de los demás isotipos<sup>15,16</sup>.

## 1.2.4 CITOCINAS

Durante la activación de la respuesta inmune en contra de agentes externos, las células necesitan estar comunicadas por medio de moléculas de superficie y por factores solubles, conocidos en forma genérica como citocinas y se han descrito gran cantidad de éstas. Los mediadores solubles que participan en la comunicación entre leucocitos se conocen con el nombre de interleucinas, las cuales por lo general son producidas por diferentes tipos celulares<sup>25</sup>.

Cada citocina tiene una amplia gama de funciones, dependiendo de la célula sobre la cual este actuando. De igual forma, un mismo efecto puede ser provocado por un grupo de citocinas. Algunas citocinas presentan efectos contrarios o actúan en forma agonista. Además, una citocina dada puede inhibir o promover la síntesis de otra, por lo cual el efecto neto de una citocina está en función del conjunto de citocinas presentes en el ambiente celular<sup>25,26</sup>. En esta revisión sólo se mencionarán aquellas citocinas que se relacionan con el trabajo desarrollado.

### *Interferón $\gamma$*

El interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), junto con el IFN- $\alpha$  y el IFN- $\beta$ , pertenece a la familia de interferones y es un polipéptido de 34-50 kDa con función primordialmente inmunoreguladora. Se le denomina también IFN tipo II ó IFN inmune<sup>27</sup>.

Los principales tipos celulares que producen esta citocina son los linfocitos Th1 y los Tc1, aunque en humanos ha sido reportado la existencia de células Th0 que son capaces de sintetizarlo. Las células NK sintetizan esta citocina aunque parecen necesitar la coestimulación de los monocitos y el TNF- $\alpha$ <sup>26,27</sup>.

Las funciones del IFN- $\gamma$  son: 1) regular la expresión de MHC-I y MHC-II en una variedad de tipos celulares, aunque disminuye la expresión de las MHC-II en los linfocitos B, esta acción se ve aumentada en presencia de TNF- $\alpha$ ; 2) participar en la diferenciación de precursores mieloides hacia monocitos y promover la capacidad presentadora de antígeno sobre los macrófagos, además promover la elaboración de especies derivadas del nitrógeno y oxígeno, incrementar la expresión de receptores para componentes del complemento y la biosíntesis de proteínas de este sistema y del receptor Fc $\gamma$ RI, aumentar la resistencia del macrófago a la infección bacteriana y, junto con el TNF- $\alpha$  incrementar la expresión de moléculas de adhesión sobre las células inflamatorias, promoviendo con esto la migración hacia el tejido dañado; 3) antagonizar la expresión de MHC-II sobre linfocitos B murinos producida por la IL-4, 4) inhibir la proliferación de clonas de células Th2 pero no de clonas Th1 y 5) favorecer la producción de linfocitos Tc, aunque existe controversia en esto último<sup>26,27</sup>.

#### *Interleucina 4*

La interleucina 4 (IL-4) es una glicoproteína de 19 kDa producida principalmente por los linfocitos Th2, los mastocitos y actualmente, se ha reportado la producción de esta citocina por algunos linfocitos Tc<sup>26,28</sup>.

Los primeros reportes de esta citocina, le atribuyeron la capacidad de aumentar la síntesis de DNA en linfocitos B estimulados con anticuerpos anti-IgM, razón por la cual se llamó factor de crecimiento de la célula B. Actualmente se han atribuido diferentes funciones, entre las que se encuentran: 1) en linfocitos B, la inducción de MHC II, del receptor de baja afinidad para IgE, del receptor para IL-4, y la producción de los isotipos IgE e IgG<sub>4</sub>; 2) en

linfocitos T, promueve la proliferación y diferenciación de los linfocitos Tc, favorece la proliferación y producción de IL-4 a partir de clonas Th2 e inhibe el desarrollo de las clonas Th1 y la producción de las citocinas correspondientes; 3) en células no linfoides, inhibe el crecimiento de los macrófagos pero incrementa su actividad citotóxica sobre ciertas células tumorales, favorece el crecimiento de las células cebadas dependiente de IL-3 y 4) se ha reportado que la IL-4 presenta actividad antitumoral asociada con la presencia de linfocitos Tc específicos<sup>28,29</sup>.

### *Interleucina 10*

La interleucina 10 (IL-10) es un polipéptido de 18 kDa que aumenta la proliferación de timocitos murinos en respuesta a la IL-2 y la IL-4. Se presenta como homodímero<sup>30</sup>.

Se ha reportado producción de esta citocina en células T CD4<sup>+</sup> con el fenotipo Th2 y Th0, por clonas de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, monocitos/macrófagos, queratinocitos, células B activadas, linfomas de células B y líneas de linfoma de Burkitt transfectadas con el virus Epstein Barr. La IL-10 se sintetiza tardíamente en comparación a las otras citocinas, lo cual puede desempeñar un papel muy importante en la regulación de la activación de monocitos y linfocitos T<sup>30,31</sup>.

Entre las funciones descritas para la IL-10 se encuentra: 1) la inhibición en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de la producción de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF y LT, cuando se utilizan macrófagos como APC pero no con linfocitos B; algunos reportes indican que la IL-10 también pueden inhibir la producción de citocinas tipo Th2, pero es necesario realizar mas estudios para confirmar este efecto; el efecto en la disminución de la proliferación de linfocitos Th1 puede ser parcialmente neutralizado añadiendo IL-2 al cultivo, lo que sugiere que la IL-10

inhibe el estímulo APC-linfocito T necesario para la producción de IL-2; 2) en monocitos/macrófagos disminuye la expresión de las MHC-II, con lo cual se dificulta la presentación de antígeno y la correcta activación de los linfocitos T; 3) sobre las APC disminuye la expresión de moléculas coestimuladoras; 4) inhibe su propia producción a partir de los monocitos; 5) favorece la producción del antagonista del receptor de IL-1, el cual presenta actividad anti-inflamatoria; 6) inhibe la producción de óxido nítrico en el macrófago; 7) presenta actividad quimiotáctica para linfocitos T CD8<sup>+</sup> y no para CD4<sup>+</sup>, inhibiendo la respuesta quimiotáctica de estos últimos hacia la IL-8; 8) aumenta la viabilidad de los linfocitos B en cultivo y 9) inhibe la diferenciación de linfocitos T hacia Th1, posiblemente por el bloqueo en la síntesis de IFN- $\gamma$ <sup>26,30,31</sup>.

#### *Factor de necrosis tumoral $\alpha$*

En 1975, Lloyd Old observó en ratones portadores de tumor que al administrar LPS se producía la necrosis de la masa tumoral; dicho efecto era ocasionado por una proteína, a la cual se le denominó factor de necrosis tumoral (TNF). La purificación y caracterización de ésta se realizó en 1984. Posteriormente, se describió otra proteína con funciones semejantes a las del TNF y se le denominó TNF- $\beta$ , mientras que a la primera se le llamó TNF- $\alpha$ <sup>32</sup>.

Los principales células productoras de TNF- $\alpha$  son los macrófagos estimulados con LPS, siendo esta inducción favorecida por el IFN- $\gamma$ . La producción por parte de los linfocitos T es controversial, aunque la evidencia apunta hacia las células T CD4<sup>+</sup>. Los linfocitos B producen TNF- $\alpha$  en cantidad inversamente proporcional al estadio de maduración. Otras células productoras de TNF- $\alpha$  son los polimorfonucleares, las células cebadas, las células NK, los queratinocitos y las células tumorales. Entre los inductores de TNF- $\alpha$  sobre los

monocitos se encuentra el LPS, el TNF- $\alpha$  mismo, complejos inmunes, C5a y varias citocinas como el IFN- $\gamma$ <sup>32,33</sup>.

El TNF- $\alpha$  se sintetiza como una pro-proteína transmembranal de 26 kDa, la cual se libera al ser escindida por una metaloproteasa dando lugar a la forma soluble de 17 kDa. La forma biológicamente activa del TNF- $\alpha$  es un homotrímero de la especie soluble, aunque existen reportes de actividad biológica para el TNF membranal<sup>32,33</sup>.

Existen dos tipos de receptores para el TNF, el tipo I o TNFR-P55 y el tipo II o TNFR-P75. Se han adjudicado diferentes funciones a cada uno de los receptores, aunque diversos autores sugieren que es necesaria la presencia de los dos para una adecuada transducción de señales<sup>33</sup>. Estos receptores se encuentran en todas las células nucleadas, excepto en los linfocitos T en reposo. Se ha reportado la presencia de formas solubles de estos receptores, que al parecer participan en la depuración del TNF y como reguladores de los efectos de esta citocina<sup>32</sup>.

Los efectos biológicos del TNF- $\alpha$  son: 1) actúa como un factor quimiotáctico de monocitos, 2) induce la expresión de moléculas de adhesión sobre estos y sobre las células endoteliales, con lo cual favorece el fenómeno de migración, 3) junto con el IFN- $\gamma$ , activa la producción de intermediarios reactivos del oxígeno y la producción de óxido nítrico, 4) participa en la diferenciación de precursores de monocitos y en la proliferación de monocitos, 5) reduce la expresión de MHC-II sobre los macrófagos, 6) incrementa la afinidad del receptor de IL-2 e incrementa la producción de IFN- $\gamma$  sobre linfocitos T activados, 7) favorece el crecimiento y maduración de las células B. 8) presenta actividad procoagulante por bloqueo de la vía de la proteína C, 9) induce la secreción de IL-6 e IL-8 a partir de células endoteliales, 10) produce la

necrosis de tumores transplantados en ratones, como se mencionó anteriormente y 11) activa a la lipoproteína lipasa en los adipocitos, evento clave para el fenómeno de caquexia<sup>26,32,33</sup>.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1.1 CITOMETRÍA DE FLUJO

La fluorescencia es un fenómeno en el cual una sustancia absorbe luz de cierta longitud de onda, con lo cual sus electrones pasan a un nivel energético superior quedando la molécula excitada; cierta cantidad de energía es perdida durante el proceso de transición interna, por lo que la sustancia excitada emite luz de mayor longitud de onda y menor energía regresando a su nivel energético basal<sup>34</sup>.

Hasta la fecha, los fluorocromos mas utilizados son el isotiocianato de fluoresceína (FITC), la ficoeritrina (PE), yoduro de propidio (PI), el complejo ficoeritrina-rojo Texas (PE-TR) y el perinilclorofilproteína (PerCP), entre otros. Estos fluorocromos pueden acoplarse a anticuerpos con lo cual se logra un proceso específico llamado inmunofluorescencia<sup>35</sup>.

El citómetro de flujo fue desarrollado en la década de los setenta asociando el principio Coulter con el fenómeno de la fluorescencia. Su aplicación principal fue la separación de células al emplear anticuerpos contra moléculas específicas en la superficie de las células conjugados con algún fluorocromo, conociéndose al equipo como separador de células activadas por fluorescencia (FACS, del inglés fluorescence-activated cell sorter). La principal ventaja de la citometría de flujo es la capacidad de medir multiparamétricamente gran cantidad de células individuales<sup>34</sup>.

En forma general, el citómetro de flujo consta de varios sistemas: un sistema de fluidos, un sistema óptico y un sistema electrónico. La principal función del sistema de fluidos es la de asegurar que las células sean analizadas

una a una; para esto, el aparato succiona la muestra con ayuda del vacío que él mismo produce y la conduce hasta la zona de análisis en donde se mezcla con el fluido de alimentación del equipo; al ocurrir esto, cada célula es “empaquetada” dentro de una gota de fluido y de esta forma interacciona con el láser<sup>34</sup>.

El sistema óptico está constituido por dos tipos de filtros: los filtros dicróicos, cuya función es dividir la fluorescencia emitida por la célula y dirigirla hacia los detectores para cada fluorescencia, y los filtros de ancho de banda, los cuales están colocados frente a cada detector y permiten el paso de la fluorescencia, rechazando la luz dispersada proveniente del láser<sup>34</sup>.

Cuando la célula pasa a través del láser, la continuidad del rayo es alterada. En base a esto, es posible determinar los siguientes parámetros<sup>34</sup>:

1. Eventos. El citómetro de flujo detecta cualquier variación en la intensidad del láser y cada célula que pasa a través de él provoca una interferencia en la señal, la cual es considerada por el aparato como un evento.

2. Tamaño. El tamaño de la célula se relaciona directamente con la luz dispersada la cual es detectada con un sensor colocado en un ángulo de 2 a 15° con respecto al láser.

3. Granularidad. Una célula que presenta gran complejidad en su interior (un gran número de organelos) dispersará mayor cantidad de luz, la cual se detecta por medio de un sensor situado a 90° con respecto al laser.

4. Fluorescencia. Los citómetros actuales tienen la capacidad de detectar hasta cuatro fluorescencias de forma simultánea, para lo cual poseen un detector para cada una de las fluorescencias empleadas. Por lo general, el aparato cuenta con una fuente emisora de luz con longitud de onda tal que pueda excitar a todos los fluorocromos utilizados, pero estos deben emitir fluorescencia en diferentes rangos de longitud de onda.

El sistema electrónico consta de detectores de fluorescencia y amplificadores de señal.

Existen distintas metodologías para realizar la inmunofluorescencia en células. El método directo utiliza anticuerpos marcados con algún fluorocromo y dirigidos contra la molécula de interés y el proceso se realiza en un solo paso. En el método indirecto, se utiliza un anticuerpo primario dirigido a la molécula en estudio y posteriormente se agrega un segundo anticuerpo marcado con el fluorocromo y dirigido contra la región Fc del primer anticuerpo; este método es utilizado cuando no se tiene el anticuerpo primario marcado o cuando el proceso de acoplamiento al fluorocromo conlleva el riesgo de modificar su estructura. Cuando la cantidad de antígeno presente en la célula es mínima, es posible amplificar la señal utilizando el sistema biotina-avidina, para lo cual se utiliza un segundo anticuerpo marcado con biotina y por último se adiciona avidina marcada con algún fluorocromo, de forma tal que se incrementa la cantidad de fluorocromos por molécula de antígeno<sup>34,35</sup>.

### 2.1.2 TINCIÓN DE CITOCINAS INTRACELULARES

Hasta la fecha, no se cuenta con ningún marcador de superficie que pueda diferenciar de manera directa y sencilla los linfocitos Th1 y Th2. Inicialmente se consideró que estos subtipos podían diferenciarse en base a la expresión de las isoformas de la molécula CD45R, pero más tarde se encontró que estas isoformas definen a las poblaciones de linfocitos T en reposo y de memoria<sup>22</sup>. Otra molécula candidato fue CD30, la cual se consideró específica para las células Th2, pero posteriormente se observó expresión de ésta sobre linfocitos Th1, que se tiñen en menor grado que las clonas Th2<sup>36</sup>. Actualmente, se ha reportado una expresión selectiva de receptores de quimiocinas sobre estos

subtipos celulares; los linfocitos Th1 expresan grandes cantidades de CXCR3 y CCR5 (receptor tipo tres de las quimiocinas CXC y receptor tipo cinco de las quimiocinas CC, respectivamente), mientras que los linfocitos Th2 expresan preferentemente CCR3 y CCR4 (receptor tipo tres y tipo cuatro de las quimiocinas CC)<sup>37</sup>. Otro reporte sugiere una expresión selectiva del receptor para IL-18 sobre los linfocitos Th1<sup>38</sup>. Ya que no se ha llegado a un consenso, estas poblaciones aún se distinguen por el patrón de citocinas producido.

Se han utilizado diferentes métodos para diferenciar estas subpoblaciones. Una posibilidad es clonar los linfocitos T y cuantificar la citocina liberada al sobrenadante por medio de ensayos inmunoenzimáticos o biológicos. Otra opción es medir la expresión genética mediante RT-PCR a partir del RNAm de los linfocitos T y semicuantificar la citocina de interés. Estas técnicas tienen la desventaja de que sólo se determina la citocina producida, pero no la población que la está produciendo, a no ser que las células estén clonadas, pero en este último caso, la manipulación y los tiempos de cultivo no garantizan que los resultados sean un reflejo de la muestra inicial<sup>39</sup>.

La inmunofluorescencia por microscopía empleando cortes histológicos o monocapas celulares ha sido utilizada para este fin, marcando la citocina de interés con un fluorocromo y con otro el tipo de célula. Sin embargo, cuando se usan cortes histológicos, las células pueden sobreponerse obteniendo resultados erróneos, además, con esta metodología se cuantifica un bajo número de células y la determinación simultánea de dos fluorescencias por microscopía es complicada, subjetiva y de poca exactitud<sup>39</sup>.

La hibridación *in situ* ha sido utilizada con el fin de diferenciar estas subpoblaciones, ya que permite marcar células de manera individual pero la

presencia de RNAm para cualquiera de las citocinas no implica necesariamente que se está secretando la proteína<sup>39,40</sup>.

En 1991, Sander describió una metodología para la determinación de citocinas por medio de la tinción intracelular y la citometría de flujo<sup>40</sup>; posteriormente, en 1993, Jung realizó algunas modificaciones a esta técnica con el fin de aumentar su sensibilidad<sup>41</sup>.

Para esta técnica las células deben ser estimuladas *in vitro* con sustancias que provoquen una estimulación policlonal, esto es, que una sola sustancia pueda activar la mayor proporción de la población de linfocitos sin importar la especificidad de su receptor y que produzcan y secreten citocinas. Para este fin, se pueden utilizar reactivos como anti-CD3, mitógenos como la concanavalina A, fitohemaglutinina o productos farmacológicos como los ésteres de forbol y los ionóforos de calcio<sup>42</sup>. Los ésteres de forbol como el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) actúan a nivel de la proteína cinasa C, la cual es clave en la activación de los linfocitos T y depende del nivel de calcio dentro de la célula, el cual es proporcionado por la apertura de los canales de calcio de la membrana celular y el aumento de la concentración de éste en el espacio intracelular inducido por la ionomicina. Estos estímulos brindan la mayor activación para linfocitos T<sup>43,44</sup>.

Para determinar el fenotipo de la célula productora de citocinas se realiza un marcaje de superficie. Por ejemplo, para seleccionar la población de linfocitos T, la muestra debe marcarse con un anticuerpo anti-CD3, puesto que esta molécula se encuentra en la superficie de todos los tipos de linfocitos T. Para estabilizar esta unión y evitar que la célula realice el proceso de "capping", es preferible unir covalentemente el antígeno y el anticuerpo, lo cual se realiza con un agente fijador, como es el paraformaldehído (PFA). Este fijador

mantiene la estabilidad de la membrana y la morfología celular, de forma tal que los parámetros de tamaño y granularidad detectados por el citómetro se modifiquen al mínimo<sup>40</sup>.

Posteriormente, es necesario permeabilizar la célula por medio de detergentes que induzcan la formación de poros en la membrana celular pero no modifiquen su estructura. Para este fin se ha utilizado la saponina, la cual forma poros de aproximadamente 8 nm de diámetro debido a su gran afinidad por el colesterol. La formación de poros con saponina es reversible, por lo cual este buffer debe utilizarse en cada uno de los pasos durante la tinción<sup>40</sup>.

Cuando se realiza la estimulación, se debe tener algún marcador por medio del cual se verifique que la mayor parte de las células se están activando. Entre los marcadores de activación más utilizados destacan el receptor de IL-2, las moléculas CD28 y CD69. Esta última es el marcador de activación más temprano que se expresa en la superficie de linfocitos T dentro de las dos horas posteriores al inicio del estímulo. La inducción de este marcador se ha asociado con la activación de la proteínasa C y una elevación de calcio intracelular, ya que los ésteres de forbol y los ionóforos de calcio inducen la expresión de CD69 en gran cantidad. Adicionalmente, se ha sugerido que la molécula CD69 puede actuar como transductor de señales durante la activación de la célula T<sup>43</sup>.

Cuando en los ensayos de tinción intracelular las células mononucleares sólo se incuban en presencia de activadores (PMA e ionomicina) se obtiene un nivel muy bajo de células productoras de citocinas, puesto que estos productos, después de sintetizarse, siguen la ruta de maduración y secreción normal a través del complejo de Golgi; por lo anterior se introdujo durante la incubación de las células mononucleares con el estímulo el uso de la monensina, un producto de *Streptomyces cinnamonensis*, que actúa como ligando de iones Na<sup>+</sup>,

$K^+$  e  $H^+$ , lo que conlleva a la ruptura de gradientes iónicos dentro de la célula y a la inhibición del transporte de proteínas a través del aparato de Golgi; por lo que las proteínas sintetizadas se acumularán dentro de este organelo, logrando que la cantidad del producto se incremente dentro de la célula y la intensidad de fluorescencia aumente. La monensina tiene el inconveniente de ser citotóxica en grandes cantidades y largos períodos de exposición, por lo que actualmente es preferible utilizar la brefeldina A (BFA), producto sintetizado por *Penicillium brefeldianum* que también inhibe el transporte protéico y presenta menor citotoxicidad. Para evitar una disminución de la viabilidad de las células cultivadas, la exposición con BFA no debe exceder de 6 horas<sup>41,44,45</sup>.

### 2.1.3 POLARIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

A pesar de haberse realizado gran cantidad de estudios con el fin de elucidar los mecanismos por los cuales una célula pre-Th adquiere un fenotipo con cierto patrón de secreción de citocinas, no se ha llegado a un consenso. Todavía no se ha determinado si las subpoblaciones Th1 y Th2 derivan de un precursor común, si dicho precursor está predestinado a cierto fenotipo ó si el antígeno es responsable de la inducción del fenotipo<sup>21</sup>.

En relación a lo anterior, un primer hallazgo fue el hecho de que la IL-4 servía como factor de proliferación para las clonas Th2, además de fomentar la producción de sí misma. Posteriormente se observó que si las células pre-Th se cultivaban en presencia de IL-4, éstas adquirirían el fenotipo Th2. Cabe mencionar que la IL-2 también es un factor de crecimiento para estas células, pero no fomenta la diferenciación de las células pre-Th a Th2. Se ha discutido la participación de la IL-1 en este proceso, pero al parecer esta citocina es

necesaria solo en la proliferación de las células Th2 y no para la diferenciación a este fenotipo<sup>21,22,23</sup>.

Por lo que respecta al subtipo Th1, se consideró que el IFN- $\gamma$  tendría un papel determinante en la diferenciación de esta subpoblación, pero la presencia de anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  en el medio de cultivo no muestra ninguna alteración en el patrón producido<sup>21,22</sup>. Tras el descubrimiento de la IL-12, se realizaron observaciones que indicaban que esta citocina era indispensable y determinante en la producción de IFN- $\gamma$  y del fenotipo Th1, siendo el IFN- $\gamma$  un potenciador de su propia producción. Posteriormente, al describirse la IL-18, se pensó que era mas importante que la IL-12 en la diferenciación hacia Th1, sin embargo, se encontró que la sola adición de IL-18 al medio de cultivo no fue capaz de tal diferenciación, la cual se logra al adicionar IL-12<sup>22,38</sup>.

El proceso de diferenciación Th1/Th2 parece ser excluyente, dado que las citocinas de un grupo inhiben la proliferación del otro. Se sabe que la IL-4 inhibe la diferenciación de las células Th1 y la producción de IFN- $\gamma$ , la IL-10 bloquea esta misma diferenciación al inhibir la expresión de moléculas coestimuladoras en los macrófagos. En forma contraria, el IFN- $\gamma$  bloquea la obtención del fenotipo Th2, efecto realizado directamente sobre el linfocito pre-Th<sup>21,22</sup>.

Además de la influencia de citocinas, se ha estudiado la participación de la APC durante la diferenciación de los subtipos Th. Cuando ocurre el proceso de activación de la célula T se presentan interacciones de moléculas de superficie que frecuentemente participan en las vías de señalización; entre éstas se encuentra la asociación de la molécula B7 (CD80) expresada sobre la APC y la molécula CD28 sobre el linfocito T. Se ha reportado la existencia de dos variantes de la molécula B7 denominadas B7.1 y B7.2 (CD80 y CD86,

respectivamente), y se ha sugerido que la primera induce diferenciación hacia Th1 y la segunda hacia Th2. Esto podría explicar el hecho de que la IL-10 inhiba la diferenciación Th1 y no Th2, puesto que se ha observado que la IL-10 inhibe la expresión de una molécula coestimuladora sobre el macrófago, la cual podría ser B7.1<sup>22</sup>.

Se han realizado estudios en los cuales se determina el efecto de la cantidad de péptidos antigénicos expresados en la superficie de la APC sobre la diferenciación de linfocitos pre-Th. Baja dosis de antígenos se asocia a la diferenciación de linfocitos Th1 mientras que altas dosis inducen la producción del fenotipo Th2. Por otro lado, la cantidad de antígeno presentado a los linfocitos T va a depender de la afinidad del péptido por la MHC-II, por lo cual el tipo de respuesta Th se vería influenciado por el haplotipo de cada individuo<sup>22</sup>.

En otro contexto, las células neoplásicas pueden presentar alteraciones antigénicas, las cuales podrían activar la respuesta inmune en contra de ellas. Para su destrucción es necesario que se active la respuesta inmune celular, mediada por células efectoras como son linfocitos Tc, células NK y macrófagos, con ayuda de las citocinas tipo Th1<sup>21,22</sup>. Se ha reportado que los pacientes con cáncer muestran un estado de inmunosupresión expresado como: respuesta de hipersensibilidad tardía alterada, desbalance en las subpoblaciones de linfocitos T, proliferación alterada de linfocitos ante mitógenos, actividad citotóxica disminuida, susceptibilidad aumentada a las infecciones y disminución en la producción de citocinas tipo Th1; esto sugiere que las células tumorales presentan mecanismos que bloquean la activación de una respuesta inmune efectiva<sup>46,47,48</sup>.

#### 2.1.4 DERRAME PLEURAL

El derrame pleural es la acumulación de líquido en el espacio intersticial formado entre las pleuras parietal y visceral que cubren los pulmones y puede ser uni o bilateral. De acuerdo a su etiología, se puede clasificar como 1) maligno, cuando el tumor involucra la pleura, 2) paramaligno ocasionado por un tumor que no involucra directamente la pleura y 3) no maligno<sup>49</sup>. El carcinoma pulmonar es la causa principal del derrame pleural maligno; cerca del 10% de los tumores broncogénicos conllevan a metástasis pleural<sup>50</sup>, principalmente el adenocarcinoma debido a su localización periférica<sup>49</sup>.

El principal síntoma del derrame pleural es la disnea, que puede ir desde grandes a pequeños esfuerzos. Según la extensión del derrame, también puede presentarse tos, pérdida de peso, dolor torácico y anorexia<sup>49,50</sup>.

El mecanismo más aceptado por medio del cual se produce el derrame pleural maligno es por un drenaje inadecuado de la circulación linfática causado por la invasión o infiltración tumoral hacia los nódulos linfáticos del mediastino. En el caso de metástasis a pleura, la cantidad de células tumorales presentes en el líquido pleural es un indicativo de la localización del tumor secundario; si hay gran cantidad de células tumorales, el tumor se está desarrollando sobre la superficie mesotelial, mientras que el hallazgo de pocas células sugiere que el tumor está presente en la capa subserosa. La apariencia hemática del derrame pleural maligno se cree que se debe a la invasión de los vasos y capilares sanguíneos por las células malignas o por la producción de sustancias vasoactivas<sup>49,50</sup>.

### 2.1.5 POBLACIONES INMUNOCELULARES EN CÁNCER PULMONAR

La primera sugerencia de la participación de la respuesta inmune en la erradicación de las células neoplásicas, fue la observación en cortes histológicos provenientes de tumores pulmonares de monocitos, linfocitos y células NK, por lo que los primeros trabajos se enfocaron a estudiar a los linfocitos infiltrantes del tumor (TIL), los cuales se pensaba llegaban a tal sitio con el fin de eliminar a las células malignas. Se analizaron las poblaciones celulares en la biopsia o el tumor extirpado con fines terapéuticos mediante inmunohistoquímica. Nakamura<sup>47</sup> estudió por citometría de flujo, los TIL de muestras de cáncer de pulmón y encontró que la mayoría de las células mononucleares eran linfocitos T y portaban el marcador CD8; Chin<sup>51</sup> y Wimmenaver<sup>52</sup> encontraron porcentajes similares de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en TIL provenientes de cáncer de mama y cáncer renal.

Cabe mencionar que en México el cáncer de pulmón es detectado tardíamente, por lo que la mayoría de las veces no se puede realizar la extirpación del tumor debido a lo avanzado de la enfermedad, e inclusive en la mayoría de los casos se proporciona solamente un tratamiento paliativo. Como se mencionó anteriormente, el cáncer pulmonar puede producir derrame pleural, causando la sintomatología ya indicada. Para disminuirla, el médico realiza un procedimiento llamado toracocentesis en el que, en condiciones asépticas, retira la mayor cantidad del líquido acumulado en el espacio pleural. Este líquido se utiliza para realizar pruebas clínicas necesarias para el diagnóstico (citológicos, bacteriológicos, análisis fisicoquímicos, etc.)<sup>49</sup>.

Las células inmunocompetentes que han sido más estudiadas en el derrame pleural son los linfocitos T. Domagala<sup>53</sup>, Ribera<sup>54</sup> y López-González<sup>55</sup>

han reportado un incremento de células T en el derrame pleural con respecto a la sangre en pacientes con cáncer. Otros autores<sup>56,57</sup> reportaron que el incremento de células T es mayor en derrames pleurales ocasionados por carcinoma pulmonar comparados con aquellos de etiología benigna, aunque Petterson<sup>58</sup> y Moisan<sup>59</sup> no encontraron diferencia en estos dos grupos. Por su parte, Bagci<sup>57</sup> menciona que los derrames pleurales provocados por enfermedad benigna presentan mayor porcentaje de linfocitos T que los derrames de origen maligno. Varios investigadores<sup>46,53,55,60</sup> han mencionado que los pacientes con cáncer muestran en sangre una cantidad menor de linfocitos T que los individuos sanos, pero Nakamura<sup>47</sup> no obtuvo este mismo resultado. Los estudios anteriores se realizaron por medio de inmunofluorescencia o la técnica de formación de rosetas.

Algunos autores<sup>47,57</sup> no encontraron diferencias en las subpoblaciones de linfocitos T comparando la sangre de pacientes con cáncer y sujetos sanos. Albera<sup>60</sup> encontró una disminución en el porcentaje de linfocitos CD4<sup>+</sup> en la sangre de pacientes con cáncer, sin cambio en los linfocitos CD8<sup>+</sup>. Radhakrishna<sup>46</sup> reporta una disminución de células CD4<sup>+</sup> con aumento de linfocitos CD8<sup>+</sup> en la sangre de pacientes con cáncer en comparación al grupo control. Otros autores<sup>61,62</sup> encontraron un incremento de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y la disminución de células CD8<sup>+</sup> en el líquido pleural con respecto a la sangre en pacientes con cáncer. Ribera<sup>54</sup> observó un incremento de células CD4<sup>+</sup> en el derrame pleural de pacientes con cáncer, con cantidades similares de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en líquido pleural y sangre. Por lo anterior, no existe un consenso a este respecto.

Los linfocitos B han sido estudiados principalmente en base a sus productos efectoros, las distintas subclases de anticuerpos. Los estudios más

recientes en los que se evalúa la proporción de linfocitos B han utilizado la citometría de flujo. Radhakrishna<sup>46</sup> y Nakamura<sup>47</sup> trabajaron con la sangre de pacientes con cáncer y de sujetos sanos y encontraron que los primeros presentaban un ligero incremento de linfocitos B con respecto a los segundos. Gjomarkaj<sup>56</sup> reportó que las efusiones con características de exudado presentan niveles de linfocitos B mayores que aquellas con características de trasudado. Bagci<sup>57</sup> compara derrames pleurales de origen maligno y benigno encontrando que los primeros muestran un porcentaje mayor de células B en comparación a los benignos, aunque esta diferencia no es significativa. Chen<sup>61</sup> encontró una proporción ligeramente aumentada de linfocitos B en el derrame pleural con respecto a la sangre de los pacientes con cáncer.

El linaje de células fagocíticas ha sido el menos estudiado en el derrame pleural<sup>56</sup>. Fischer<sup>63</sup> cuantificó las poblaciones de CMN utilizando conteo diferencial, no encontrando diferencias en el número de monocitos en la sangre de pacientes con cáncer y controles sanos. Wimmenauer<sup>52</sup> comparó por medio de inmunocitoquímica las poblaciones celulares de sangre y TIL en pacientes con cáncer de pulmón, encontrando un número disminuido de células CD14<sup>+</sup> en TIL con respecto a la sangre. Bagci<sup>57</sup> utilizando citometría de flujo evaluó los monocitos en derrame pleural encontrando que los derrames benignos presentaban menor cantidad de monocitos que aquellos de etiología maligna. Gjomarkaj<sup>56</sup> por inmunocitoquímica reporta que los derrames pleurales con características de exudados presentan menor cantidad de células CD68<sup>+</sup> (macrófagos) que los trasudados.

## 2.1.6 PRODUCCIÓN DE CITOCINAS TIPO Th1 Y Th2 EN CÁNCER PULMONAR

Cuando se estableció que las citocinas tipo Th1 activan la respuesta celular a través de la cual las células tumorales podrían ser eliminadas, se comenzó a estudiar el patrón de citocinas producido en la periferia del tumor. Shimokata<sup>64</sup> y Ribera<sup>54</sup> utilizando la técnica de ELISA encontraron que el derrame pleural de origen tuberculoso presentaba 100 veces mayor cantidad de IFN- $\gamma$  que el derrame pleural maligno. Fischer<sup>63</sup>, con la misma técnica, estudió las células sanguíneas de pacientes con cáncer y controles sanos reportando una disminución en la producción de IFN- $\gamma$  en los pacientes con cáncer. Chen<sup>61,65</sup> compara la cantidad de citocinas producida en sangre y derrame pleural de pacientes con cáncer mediante la técnica de ELISA sin encontrar cantidades detectables de IL-4 e IL-12, pero aumentadas de IL-10 en derrame pleural y niveles mínimos de IFN- $\gamma$  en ambos líquidos biológicos. Asselin-Paturel<sup>66</sup> por medio de PCR estudió el patrón de citocinas en biopsias provenientes de pacientes con carcinoma de células no pequeñas, encontrando expresión aumentada de IL-10, TGF- $\beta$  e IL-6 y cantidades mínimas de IFN- $\gamma$  e IL-2. Mantovani<sup>67</sup> encontró, por medio de la técnica de ELISA, concentraciones similares de IL4 e IL-10 en derrame pleural y sangre de pacientes con cáncer y un aumento de IFN- $\gamma$  en el derrame pleural de estos; las tres citocinas anteriores fueron mayores en la sangre de los pacientes con cáncer que en el grupo control. Södelblom<sup>68</sup>, utilizando la técnica ELISA, no encontró valores detectables de IFN- $\gamma$  en derrames pleurales de etiología maligna. Huang<sup>69</sup> trabajó con líneas celulares y cortes histológicos de cáncer de pulmón, utilizando RT-PCR e inmunotinción, encontrando que la mayoría de las líneas tumorales estudiadas expresaban RNAm para IL-4, IL-10 y TGF- $\beta$ , y no para IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ; del

mismo modo los cortes histológicos expresaban mayor cantidad de citocinas tipo Th2 que Th1, por lo que las células tumorales pueden participar en la formación del ambiente de citocinas.

Por otro lado, Martinet<sup>70</sup> por medio de un ensayo biológico con células L-929 y ELISA encuentra cantidades mínimas o no detectables de TNF- $\alpha$  en derrames pleurales malignos. Fischer<sup>63</sup> estudió la producción de TNF- $\alpha$  en sangre de pacientes con cáncer y sujetos sanos, reportando un aumento de TNF- $\alpha$  en pacientes con cáncer que no presentan metástasis, mientras que aquellos con metástasis tenían niveles de TNF- $\alpha$  similares al grupo control. Södelblom<sup>68</sup> con la técnica RIA mostró una disminución de TNF- $\alpha$  en el derrame pleural de pacientes con cáncer en comparación a los pacientes con tuberculosis; el nivel de TNF- $\alpha$  de otras patologías benignas no tuberculosas fue similar al encontrado en los pacientes con cáncer. Orphanidou<sup>71</sup> encontró que la sangre de los pacientes con cáncer muestra niveles de TNF- $\alpha$  mayores que la sangre del grupo con etiología benigna; el derrame pleural del grupo con cáncer presenta mayor cantidad de TNF- $\alpha$  que la sangre del mismo grupo. Mantovani<sup>67</sup> muestra una disminución de la concentración de TNF- $\alpha$  en derrame pleural con respecto a sangre en pacientes con cáncer; el nivel plasmático de TNF- $\alpha$  es menor que en los sujetos sanos.

Debido a la diversidad de resultados, nos parece necesario evaluar las poblaciones de células inmunocompetentes en el derrame pleural de pacientes con carcinoma pulmonar, además de determinar el patrón de citocinas por célula presente en este espacio anatómico.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer pulmonar es un tumor de alta morbilidad y mortalidad que se presenta principalmente entre los 45 y 75 años de edad<sup>1</sup> y se ha relacionado estrechamente con el hábito tabáquico<sup>8</sup>. En nuestra comunidad, esta neoplasia se detecta tardíamente y presenta pocas expectativas de vida. El adenocarcinoma pulmonar frecuentemente produce derrame pleural<sup>49</sup>. Dicho líquido contiene células inflamatorias y malignas que al estar en contacto podrían inducir la respuesta inmune, por lo que el derrame pleural constituye un material biológico útil para el estudio de los mecanismos efectores del sistema inmune en contra de las células transformadas, así como de los mecanismos de evasión que éstas presentan.

Se ha reportado que ciertos tipos histológicos de cáncer pulmonar muestran un patrón de citocinas tipo Th2 producido directa o indirectamente por las células tumorales con lo cual éstas podrían evadir la respuesta inmune<sup>66,68</sup>. Cabe mencionar que las subpoblaciones de linfocitos T tipo Th1 y Th2 en cáncer pulmonar han sido poco estudiadas y prácticamente todos los reportes se han realizado en sangre periférica o con TIL, de ahí la importancia de hacer un estudio comparativo de sangre periférica y líquido pleural, ya que el desorden en el espacio pleural podría considerarse como un reflejo de lo que está sucediendo en el tumor primario.

## 4. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Determinar las poblaciones de células mononucleares (linfocitos B, linfocitos T y monocitos/macrófagos), subpoblaciones de linfocitos T, así como el perfil de citocinas producido por los linfocitos T y la producción de TNF- $\alpha$  por monocitos/macrófagos de sangre y derrame pleural de pacientes con cáncer pulmonar comparado con la sangre de sujetos sanos, utilizando la citometría de flujo.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Estandarizar la técnica de tinción de citocinas intracelulares en células mononucleares por citometría de flujo.
- Determinar en las CMN obtenidas del líquido pleural y sangre de pacientes con cáncer pulmonar las poblaciones CD3 (linfocitos T), CD14 (monocitos) y CD19 (linfocitos B).
- Determinar las subpoblaciones de linfocitos T (CD4 y CD8) en líquido pleural y sangre de pacientes con cáncer pulmonar.
- Evaluar la proporción de linfocitos T productores de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 en sangre y líquido pleural de pacientes con cáncer.
- Cuantificar la cantidad de monócitos y macrófagos productores de TNF- $\alpha$  en sangre y líquido pleural de dichos pacientes.
- Comparar las poblaciones inmunocelulares de los pacientes con cáncer con respecto a los sujetos sanos.

## 5. HIPÓTESIS

El líquido proveniente de un derrame pleural maligno puede presentar gran cantidad de células del sistema inmune y células tumorales. En este compartimiento, las células interactúan de forma tal que los linfocitos se activan y presentan mecanismos efectoros con el fin de eliminar células tumorales y éstas a su vez, presentan mecanismos de evasión a la respuesta inmune, por lo que en pacientes con cáncer pulmonar se esperan encontrar alteraciones generales o particulares en las poblaciones de células inmunocompetentes. Dichas alteraciones pudieran manifestarse cualitativa como cuantitativamente.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1.1 REACTIVOS Y ANTICUERPOS

#### *Reactivos*

Medio RPMI-1640 bajo en endotoxina, suero fetal de ternera (FCS), forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), ionomicina, brefeldina A (BFA), lipopolisacárido de *E. coli* 0111:B4 (LPS), dimetilsulfóxido (DMSO), albúmina sérica bovina (BSA), azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ), todos obtenidos de Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA); Ficoll-Hypaque (Nycomed, Pharma AS, Oslo, Noruega), alcohol etílico (Merck, Darmstadt, Alemania), amortiguador de fosfatos salino (PBS); solución salina de FACS, solución FACS de lisis 10X y solución FACS permeabilizante 10X de Becton Dickinson (San Jose, CA, USA).

#### *Anticuerpos*

Para la tipificación de linfocitos se utilizaron los siguientes reactivos: anticuerpo monoclonal  $\text{IgG}_1$  de ratón anti-CD3 humano conjugado a FITC, anticuerpo monoclonal  $\text{IgG}_1$  de ratón anti-CD19 humano conjugado a PE, anticuerpo monoclonal  $\text{IgG}_1$  de ratón anti-CD45 conjugado a PerCP. Como controles de isotipo: anticuerpo monoclonal  $\text{IgG}_1$  de ratón conjugado a FITC y anticuerpo monoclonal  $\text{IgG}_1$  de ratón conjugado a PE, todos provenientes de Becton Dickinson (San Jose, CA, USA).

Para la determinación de subpoblaciones de linfocitos T se utilizaron: anticuerpo monoclonal  $\text{IgG}_1$  de ratón anti-CD3 humano conjugado a FITC, anticuerpo monoclonal  $\text{IgG}_1$  de ratón anti-CD4 humano conjugado a PE y

anticuerpo monoclonal IgG<sub>2a</sub> de ratón anti-CD8 humano conjugado a PerCP obtenidos de Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA).

Para determinar el porcentaje de células productoras de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 se utilizaron: anticuerpo monoclonal IgG<sub>1</sub> de ratón anti-CD69 humano conjugado a FITC y anticuerpo monoclonal IgG<sub>1</sub> de rata anti-IL-10 humano conjugado a PE de Pharmingen (San Diego, CA, USA); anticuerpo monoclonal IgG<sub>1</sub> de ratón anti-CD3 humano conjugado a PerCP, anticuerpo monoclonal IgG<sub>2a</sub> de ratón anti-IFN- $\gamma$  humano conjugado a FITC, anticuerpo monoclonal IgG<sub>1</sub> de ratón anti-IL-4 humano conjugado a PE. Como controles de isotipo se emplearon: anticuerpo monoclonal IgG<sub>2a</sub> de ratón conjugado a FITC y anticuerpo monoclonal IgG<sub>1</sub> de ratón conjugado a PE; todos estos anticuerpos se obtuvieron de Becton Dickinson (San Jose, CA, USA).

Para cuantificar el porcentaje de monocitos/macrófagos y células productoras de TNF- $\alpha$  se utilizaron los reactivos: anticuerpo monoclonal IgG<sub>2b</sub> de ratón anti-CD14 humano conjugado a PE de Becton Dickinson (San Jose, CA, USA) y anticuerpo monoclonal IgG<sub>1</sub> de ratón anti-TNF humano conjugado a FITC de R&D (Minneapolis, MN, USA).

## 6.1.2 RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

### *Población de estudio*

Se trabajó con el líquido pleural y la sangre de 11 pacientes con cáncer pulmonar, 9 hombres y 2 mujeres, con edades entre 32 a 85 años, que presentaron síndrome de derrame pleural y que no habían recibido tratamiento previo a la obtención de la muestra. De éstos, 10 presentaron diagnóstico de adenocarcinoma y uno de células gigantes. Además, para comparación se

trabajaron muestras sanguíneas de 9 sujetos sanos no fumadores, 6 hombres y 3 mujeres, con edades entre 25 y 75 años.

#### *Líquido pleural*

El líquido pleural se obtuvo por toracocentesis aséptica practicada por el personal médico del INER.

El líquido pleural obtenido se centrifugó 15 minutos a 1500 rpm para recuperar la población celular, la cual se lavó dos veces con 20 mL de medio RPMI y se resuspendió en 10 a 20 mL de medio.

#### *Sangre periférica*

Se obtuvieron 20 mL de sangre periférica de cada paciente y de los sujetos sanos, utilizando heparina sódica como anticoagulante.

#### *Enriquecimiento de células mononucleares*

Las células mononucleares (CMN) de las muestras se separaron por medio de un gradiente de Ficoll, colocando 5 mL de sangre o de la suspensión de células provenientes del líquido pleural sobre 3mL de Ficoll-Hypaque y centrifugando por 30 minutos a 1500 rpm. Posteriormente, se recuperaron las CMN (interfase plasma-Ficoll) y se lavaron con 10 mL de medio RPMI.

### 6.1.3 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Todos los reactivos se prepararon asépticamente.

#### *PMA*

Se reconstituyó en DMSO a una concentración de 0.1 mg/mL y se almacenó a -20°C en alícuotas de 10 µL, soportando 3 ciclos de congelación-

descongelación. La solución de trabajo se preparó diluyendo la solución antes mencionada 1:100 en PBS. Concentración final 25 ng/mL.

#### *Ionicina*

Se reconstituyó en alcohol etílico absoluto a una concentración de 0.5 mg/mL y se almacenó a -20°C. La solución de trabajo se preparó diluyendo la solución antes mencionada 1:10 en PBS. Concentración final 1 µg/mL.

#### *BFA*

Se reconstituyó en DMSO a una concentración de 5 mg/mL y se almacenó a -20°C en alícuotas de 20 µL, soportando 3 ciclos de congelación-descongelación. La solución de trabajo se preparó diluyendo la solución antes mencionada 1:10 en PBS. Concentración final 10 µg/mL.

#### *LPS*

Se reconstituyó en medio RPMI 1640 a una concentración de 1 mg/mL y se almacenó a 2-4°C. La solución de trabajo se preparó diluyendo la solución antes mencionada 1:100 en medio RPMI. Concentración final 1 µg/mL.

### 6.1.4 DETERMINACIÓN DE LINFOCITOS T Y SUS SUBPOBLACIONES, LINFOCITOS B Y MONOCITOS/MACRÓFAGOS

#### *Tinción de superficie de marcadores CD3, CD4, CD8, CD19, CD14 y CD45 a partir de las CMN*

Se preparó una suspensión de  $2 \times 10^6$  células/mL de las CMN obtenidas de sangre y líquido pleural. Se colocaron 100 µL de esta suspensión celular ( $2 \times$

10<sup>5</sup> células) en tubos de 12 x 75 (Falcon, Bedford, MA, USA) y se adicionaron los volúmenes de anticuerpo como se indica en la tabla 1.

TABLA 1. Tinción de marcadores CD3, CD4, CD8, CD14, CD19 y CD45 en CMN.

Tubo	Blanco	CD3/CD4/CD8	CD45/ISOT	CD3/CD19/CD45	CD14
Reactivo					
CD3-FITC/ CD4-PE/ CD8-PerCP <sup>a</sup>	-	3 $\mu$ L <sup>c</sup>	-	-	-
IgG <sub>1</sub> FITC/ IgG <sub>1</sub> PE CD45-PerCP <sup>b</sup>	-	-	5 $\mu$ L	-	-
CD3-FITC/ CD19-PE/ CD45-PerCP <sup>b</sup>	-	-	-	5 $\mu$ L	-
CD14 PE	-	-	-	-	0.6 $\mu$ L

<sup>a</sup> Reactivos obtenidos de Sigma Chemical.

<sup>b</sup> Reactivos obtenidos de Becton Dickinson.

<sup>c</sup> Se adicionaron 3  $\mu$ L de cada anticuerpo.

Estos tubos se incubaron por 30 minutos con agitación a temperatura ambiente y en oscuridad. Se adicionaron 2 mL de solución FACS de lisis 1X, se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó por 5 minutos a 1500 rpm y se retiró el sobrenadante. Se adicionaron 2 mL de buffer de lavado, se centrifugó por 5 minutos a 1500 rpm y se retiró el sobrenadante. Finalmente, las células se resuspendieron en 400  $\mu$ L de solución salina de FACS.

### 6.1.5 DETERMINACIÓN DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T PRODUCTORAS DE IFN- $\gamma$ /IL-4 E IL-10

*Población no estimulada y estimulada de CMN para la tinción intracelular de IFN- $\gamma$ /IL-4 e IL-10 en subpoblaciones de linfocitos T*

Las CMN de sangre y líquido pleural se ajustaron a  $2 \times 10^6$  células/mL en RPMI + 10% de FCS. Se colocó 1mL de esta suspensión en tubos estériles de 12 x 75 (Falcon, Bedford, MA, USA) y se agregaron los volúmenes indicados de los reactivos antes preparados según la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de estimulación de CMN para la tinción intracelular de IFN, IL-4 e IL-10 en linfocitos T.

Reactivo \ Tubo	NEST	NEST + BFA	EST + BFA
PMA	-	-	25 $\mu$ L
Ionomicina	-	-	20 $\mu$ L
BFA	-	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L

NEST: Cultivadas sin estímulo

NEST+BFA: cultivadas sin estímulo y en presencia de BFA

EST+BFA: Cultivadas en presencia del estímulo ( PMA e ionomicina ) y de BFA.

Los tubos se agitaron ligeramente y se incubaron semiabiertos a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 4 horas.

*Tinción intracelular de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 en subpoblaciones de linfocitos T*

Para la determinación de las células productoras de estas citocinas se requieren los siguientes pasos:

#### a) Tinción de superficie de la molécula CD3

Se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de suspensión celular ( $2 \times 10^5$  células) según la tabla 3 en tubos de 12 x 75 (Falcon) y se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de anti-CD3 conjugado con PerCP. Se agitó ligeramente en vórtex y se incubó 15 minutos con agitación a temperatura ambiente y en la oscuridad.

#### b) Permeabilización y tinción intracelular de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 en subpoblaciones de linfocitos T

Se adicionaron 2 mL de solución FACS de lisis 1X a los tubos anteriores y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm y se removió el sobrenadante. Posteriormente, se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de solución FACS para permeabilizar y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad, previa agitación. Se adicionaron 2 mL de buffer de lavado (PBS + 0.1% de  $\text{NaN}_3$  + 0.5% de BSA), se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm y se removió el sobrenadante. Se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  del anticuerpo anti-citocina (IFN, IL-4 ó IL-10), del anticuerpo anti-CD69 o del control de isotipo, de acuerdo a la tabla 3; el anticuerpo anti-CD69 se utilizó con el fin de determinar el porcentaje de células activadas en la población no estimulada y en la estimulada; se incubó a temperatura ambiente y en la oscuridad por 30 minutos, previa agitación. Se adicionaron 2 mL de buffer de lavado, se centrifugó 5 minutos a 1500 r.p.m. y se removió el sobrenadante. Por último, las células se resuspendieron en 400  $\mu\text{L}$  de solución salina de FACS.

Tabla 3. Producción de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 por linfocitos T.

Tubo	CD3/CD69	CD3/CD69	CD3/SOT	CD3/IFN/IL4	CD3/IL10	CD3/SOT	CD3/IFN/IL4	CD3/IL10
Proceso	NEST	EST+BFA	NEST+BFA	NEST+BFA	NEST+BFA	EST+BFA	EST+BFA	EST+BFA
CD3-PerCP	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI
CD69-FITC	SI	-	-	-	-	-	-	-
LISIS	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI
PERMEABILIZACION	-	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI
Control de isotipo FITC/PE	-	-	SI	-	-	SI	-	-
CD69-FITC	-	SI	-	-	-	-	-	-
IFN-FITC	-	-	-	SI	-	-	SI	-
IL4-PE	-	-	-	-	-	-	-	-
IL10-PE	-	-	-	-	SI	-	-	SI

ISOT: Control de isotipo (IgG<sub>2a</sub>, FITC/IgG<sub>1</sub>, PE)

NEST: Cultivadas sin estímulo

NEST+BFA: cultivadas sin estímulo y en presencia de BFA

EST+BFA: Cultivadas en presencia del estímulo ( PMA e ionomicina ) y de BFA.

### 6.1.6 DETERMINACIÓN DE MONOCITOS/MACRÓFAGOS PRODUCTORES DE TNF- $\alpha$

#### *Población no estimulada y estimulada de CMN para la tinción intracelular de TNF- $\alpha$*

Las CMN de sangre y líquido pleural se ajustaron a  $2 \times 10^6$  células/mL en RPMI + 10 % FCS. Se colocó 1mL de esta suspensión en tubos estériles de 12 x 75 (Falcon, Bedford, MA, USA) y se agregaron los reactivos según la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de estimulación de CMN para la tinción intracelular de TNF- $\alpha$  en monocitos/macrófagos.

Reactivo \ Tubo	NEST	NEST + BFA	LPS + BFA
LPS	-	-	100 $\mu$ L
BFA	-	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L

NEST: Cultivadas sin estímulo

NEST+BFA: cultivadas sin estímulo y en presencia de BFA

LPS+BFA: Cultivadas en presencia de lipopolisacárido y BFA.

Los tubos se agitaron ligeramente y se incubaron semiabiertos a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 4 horas.

#### *Tinción intracelular de TNF- $\alpha$ en monocitos/macrófagos*

Para la determinación de las células productoras de TNF- $\alpha$  se requieren los siguientes pasos:

**a). Tinción de superficie de la molécula CD14**

Se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de suspensión celular ( $2 \times 10^5$  células ) según la tabla 5 en tubos de 12 x 75 (Falcon) y se adicionaron 0.6  $\mu\text{L}$  de anti-CD14 conjugado con PE. Se agitó ligeramente en vórtex y se incubó 30 minutos con agitación a temperatura ambiente y en la oscuridad.

**b). Permeabilización y tinción intracelular de TNF- $\alpha$  en monocitos/macrófagos**

Se adicionaron 2 mL de solución FACS de lisis 1X a los tubos anteriores y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron 5 minutos a 1500 rpm y se removió el sobrenadante. Posteriormente se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de solución FACS para permeabilizar; se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad, previa agitación. Se adicionaron 2 mL de buffer de lavado, se centrifugaron 5 minutos a 1500 rpm y se removió el sobrenadante. Se adicionaron 0.7  $\mu\text{L}$  de anti-TNF- $\alpha$  conjugado a FITC, de acuerdo a la tabla 5; se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad, previa agitación. Se adicionaron 2 mL de buffer de lavado, se centrifugaron 5 minutos a 1500 rpm y se removió el sobrenadante. Por último, las células se resuspendieron en 400  $\mu\text{L}$  de solución salina de FACS.

Tabla 5. Producción de TNF- $\alpha$  por monocitos/macrófagos.

Proceso	Tubo	CD14	CD14	CD14/TNF	CD14/TNF
		NEST+BFA	LPS+BFA	NEST+BFA	LPS+BFA
CD14-PE		SI	SI	SI	SI
LISIS		SI	SI	SI	SI
PERMEABILIZACION		SI	SI	SI	SI
TNF-FITC		-	-	SI	SI

### 6.1.7 ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

En todos los casos las muestras se analizaron en un citómetro FACScalibur de Becton Dickinson (San Jose, CA, USA) utilizando el paquete CellQuest. Para las determinaciones de marcadores de superficie (CD3, CD4, CD8, CD14 ó CD19) se adquirieron 10,000 eventos mientras que para las determinaciones de citocinas intracelulares (IFN e IL-4, IL-10 ó TNF) se adquirieron 20,000 eventos.

### 6.1.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Como medida de tendencia central se utilizó la mediana. Para comparar la diferencia entre los grupos de estudio se utilizó la prueba estadística de Kruskal Wallis o análisis de varianza de rangos y posteriormente una prueba de Dunn's para determinar el grupo responsable de las diferencias, aceptándose como significativa una probabilidad menor a 0.05. Para determinar la correlación entre los resultados obtenidos para el marcador CD3 con los reactivos provenientes de Sigma y aquellos a partir de los anticuerpos de Becton Dickinson se utilizó la prueba de correlación de Spearman. Las pruebas y parámetros estadísticos se procesaron en el programa SigmaStat 2.0 (Jandel Scientific).

## 7. RESULTADOS

### 7.1.1 DETERMINACIÓN DE LINFOCITOS CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> Y CD19<sup>+</sup>

La población de células linfoides se seleccionó en base a la expresión de CD45 (antígeno común de los leucocitos) y la granularidad propia de esta población, mediante una ventana colocada en el gráfico de granularidad vs CD45-PerCP. A partir de ella, se determinó el porcentaje de linfocitos CD3<sup>+</sup> y linfocitos CD19<sup>+</sup> en cada una de las muestras (Figura 1). La mediana de los porcentajes de células con respecto al total de la población linfoide se muestra en la tabla 6.

En la sangre de sujetos sanos las células CD3<sup>+</sup> representaron aproximadamente el 53% de las células linfoides; los pacientes con cáncer mostraron 50% de linfocitos T en sangre y 85% en líquido pleural ( $p < 0.05$ , Tabla 6, Figura 2). No existe diferencia significativa entre el porcentaje de linfocitos T sanguíneos del grupo control y de los pacientes con cáncer.

En relación a los linfocitos B, la sangre de los controles mostró 10% de células CD19<sup>+</sup> con respecto a la población linfoide. Los pacientes con cáncer presentaron 7% de linfocitos B en sangre y 12% en la efusión pleural (Tabla 6, Figura 3). Las diferencias encontradas no muestran significancia estadística.

### 7.1.2 DETERMINACIÓN DE LINFOCITOS T Y SUS SUBPOBLACIONES

La población de linfocitos T se detectó utilizando una ventana en el gráfico granularidad vs CD3-FITC y a partir de ésta, se determinaron las subpoblaciones CD4 y CD8 (figura 4). El porcentaje de células T se determinó relacionando la población de células CD3<sup>+</sup> (R2) con respecto a la población de células linfoides (R1, Figura 4). El anticuerpo anti-CD3 utilizado en esta determinación

proveniente de Sigma Chemical fue diferente al empleado en la determinación anterior (proveniente de Becton Dickinson) por lo que se decidió comparar el porcentaje de linfocitos obtenido con ambos reactivos.

Con los anticuerpos obtenidos de Sigma, los sujetos sanos mostraron 48% de linfocitos T en sangre y con el anticuerpo de Becton Dickinson 53%, mientras que los pacientes con cáncer mostraron en sangre 50% de células CD3<sup>+</sup> y 82% en derrame pleural vs. 50% y 85% respectivamente; no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos con ambos anticuerpos. Estos resultados muestran un coeficiente de correlación de 0.93 (resultados no mostrados).

En lo que respecta a las subpoblaciones de células T, en la sangre de los controles, el 62% de los linfocitos CD3<sup>+</sup> mostraron el marcador CD4 y el 31% el marcador CD8, siendo la relación CD4/CD8 de 2.1; en el caso de los pacientes con cáncer, el 55% de los linfocitos T sanguíneos fueron CD4<sup>+</sup> y el 35% fueron CD8<sup>+</sup>, con una relación CD4/CD8 de 1.6; en el líquido pleural, los linfocitos CD4<sup>+</sup> representaban el 75% y los CD8<sup>+</sup> el 19%, con una relación CD4/CD8 de 4.2 (Tabla 7, Figuras 5, 6, y 8).

El porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> fue ligeramente menor en la sangre de los pacientes con cáncer con respecto al grupo control, sin mostrar diferencias significativas; en el derrame pleural esta población se encontró incrementada al compararla con la sangre de los pacientes con cáncer ( $p < 0.05$ ). En la sangre del grupo con cáncer el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> es ligeramente mayor que el grupo control, sin haber diferencias significativas entre estos dos grupos. El derrame pleural presentó una marcada disminución de este tipo de linfocitos con respecto a la sangre de los pacientes con cáncer ( $p < 0.05$ ). En cuanto a la relación CD4/CD8, ésta se encontró disminuida en la sangre de los pacientes con cáncer

pero no muestra diferencias significativas cuando se compara con la sangre de los controles sanos. En el derrame pleural se encontró una relación CD4/CD8 mayor que en la sangre del grupo con cáncer ( $p < 0.05$ ).

En esta determinación se encontraron células doble positivas (DP) y células dobles negativas (DN, Figura 4C). Los sujetos sanos presentaron 1.2% de células DP en sangre, mientras que los pacientes con cáncer presentaron 3.1% y 2.3% en sangre y líquido pleural, respectivamente; la diferencia de células DP encontrada entre el grupo control y la sangre de los pacientes con cáncer fue significativa ( $p < 0.05$ ). Con respecto a las células DN, se encontró 2.6% de éstas en la sangre de los sujetos sanos; los pacientes con cáncer mostraron casi el doble, 5.0% de células DN en sangre ( $p < 0.05$ ) y 2.4% en derrame pleural (Tabla 7, Figura 4C).

### 7.1.3 DETECCIÓN DE MONOCITOS/MACRÓFAGOS

El porcentaje de monocitos/macrófagos se determinó en base al gráfico granularidad vs CD14 (R2), tomando en cuenta la granularidad propia de estas células, y como 100% el total de CMN determinadas a partir del gráfico tamaño vs granularidad (R1, Figura 7).

La cantidad de monocitos presentes en las CMN de la sangre de los sujetos fue del 7%. Los pacientes con cáncer mostraron 14% en sangre y 1% en líquido pleural ( $p < 0.05$ , Tabla 8, Figura 9). La población de fagocitos mononucleares de la sangre de los controles no muestra diferencias significativas en comparación con la sangre de los pacientes con cáncer.

En resumen, en la tabla 8 se indican las medianas del porcentaje obtenido para cada población de CMN y subpoblaciones de linfocitos T para los grupos en estudio.

#### 7.1.4 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES BASAL Y MÁXIMO DE ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T EN BASE A LA EXPRESIÓN DE LA MOLÉCULA CD69

La molécula CD69 se empleó con distintas finalidades 1) para determinar la inducción de la activación de los linfocitos T, 2) como control del procedimiento de permeabilización y de la inhibición del transporte celular de proteínas y 3) para monitorear la posible existencia de células T activadas *in vivo*, en contra de células malignas.

El porcentaje de activación se determinó tomando en cuenta la población de linfocitos T en base al porcentaje de células que expresaban el marcador CD69 (Figura 10).

En la sangre de los controles, el porcentaje de linfocitos T CD69<sup>+</sup> fue de 10% en la población no estimulada, mientras que en esta misma población los pacientes con cáncer presentaron una activación basal del 12% en sangre y del 16% en líquido pleural. En contraste, en la población estimulada, los sujetos sanos mostraron 88% de linfocitos T CD69<sup>+</sup>; en los pacientes con cáncer se observó una activación del 76% en sangre y 82% en líquido pleural (Tabla 9, Figuras 11 y 12). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la población no estimulada y estimulada, para ninguno de los grupos.

### 7.1.5 DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE CITOCINAS (IFN- $\gamma$ /IL-4 E IL-10) POR LINFOCITOS T

La producción de citocinas intracelulares se evaluó considerando la población de linfocitos T (Figuras 13 y 16).

En ninguno de los grupos estudiados se encontraron células productoras de citocinas en la población no estimulada tanto de sangre como de líquido pleural (Figura 13C y 16C). Los siguientes resultados corresponden a la población estimulada; el grupo control mostró 27% de células T productoras de IFN- $\gamma$ , 1.7% de células T productoras de IL-4 y 2.2% de células T productoras de IL-10 en sangre; los pacientes con cáncer presentaron en sangre 28%, 1.5% y 2.2% y en derrame pleural 32%, 1.2% y 1.9% de linfocitos T productores de estas citocinas (Tabla 10, Figuras 14, 15, y 18). Se encontraron porcentajes de linfocitos T productores de ambas citocinas (IFN- $\gamma$  e IL-4) menores o iguales a 0.5%, valor considerado como límite de detección del citómetro (Figura 13D). No hay diferencias significativas con respecto a la producción de estas citocinas.

### 7.1.6 PRODUCCIÓN DE TNF- $\alpha$ A PARTIR DE MONOCITOS/MACRÓFAGOS

A partir de células teñidas con el anticuerpo anti-CD14 se determinó el porcentaje de células productoras de TNF- $\alpha$ . Las determinaciones se realizaron en las poblaciones no estimulada y estimulada con LPS (Figura 17).

En la población no estimulada, el grupo control mostró 30% de células productoras de TNF- $\alpha$ ; en los pacientes con cáncer se encontró un nivel basal de células productoras de TNF- $\alpha$  en sangre y derrame pleural similar al encontrado en el control de sujetos sanos, siendo de 31 y 33%, respectivamente (no existen diferencias significativas). En la población estimulada con LPS, la cantidad de

células productoras de esta citocina se incrementó a 88% para el grupo control y a 77% y 68% en sangre y derrame pleural para el grupo con cáncer, respectivamente; ambas diferencias son significativas ( $p < 0.05$ , Tabla 11, Figuras 19 y 20).

Cabe mencionar que la incubación de las CMN con LPS y BFA, la cual funciona como un inhibidor del transporte de proteínas a través del complejo de Golgi, ocasionó una disminución en la expresión del marcador CD14 en los monocitos. Cuando en el grupo control se determinó la proporción de células CD14<sup>+</sup> en CMN sin tratamiento, se encontró un valor de 7.3%. Las CMN incubadas en presencia de BFA presentaron 6.9% de células CD14<sup>+</sup>, mientras que aquellas incubadas con LPS y BFA sólo tenían 4.2% de dichas células (Figura 21). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos empleados durante la incubación.

## 7.2 TABLAS

TABLA 6. PORCENTAJE DE LINFOCITOS T Y LINFOCITOS B.

MARCADOR	CONTROLES	PACIENTES CON CÁNCER	
	Sangre	Sangre	Derrame pleural
CD3 <sup>+</sup> <sup>a</sup>	52.7	50.1	84.9 <sup>b</sup>
CD19 <sup>+</sup> <sup>a</sup>	10.2	7.2	12.5

Medianas obtenidas a partir del porcentaje de células positivas para los anticuerpos provenientes de Becton Dickinson. <sup>a</sup> Porcentaje en relación al total de células linfoides. <sup>b</sup>  $p < 0.05$ , con respecto a la sangre de los pacientes con cáncer.

TABLA 7. PORCENTAJE DE LINFOCITOS T Y SUS SUBPOBLACIONES.

MARCADOR	CONTROLES	PACIENTES CON CÁNCER	
	Sangre	Sangre	Derrame pleural
CD3 <sup>+</sup> <sup>a</sup>	48.4	50.1	82.4 <sup>d</sup>
CD4 <sup>+</sup> <sup>b</sup>	61.9	54.7	74.8 <sup>d</sup>
CD8 <sup>+</sup> <sup>b</sup>	31.1	34.9	18.6 <sup>d</sup>
Dobles positivas <sup>b</sup>	1.2	3.1 <sup>c</sup>	2.3
Dobles negativas <sup>b</sup>	2.6	5.0	2.4 <sup>d</sup>
Relación CD4/CD8	2.1	1.6	4.2 <sup>d</sup>

Medianas obtenidas a partir del porcentaje de células positivas para los anticuerpos provenientes de Sigma Chemical. <sup>a</sup> Porcentaje en relación al total de células linfoides. <sup>b</sup> Porcentaje en relación al total de linfocitos T. <sup>c</sup>  $p < 0.05$ , con respecto a la sangre de los sujetos sanos. <sup>d</sup>  $p < 0.05$ , con respecto a la sangre de los pacientes con cáncer.

TABLA 8. POBLACIONES DE CMN Y SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T.

MARCADOR	CONTROLES	PACIENTES CON CÁNCER	
	Sangre	Sangre	Derrame pleural
CD3 <sup>+</sup> <sup>a</sup>	52.7	50.1	84.9 <sup>d</sup>
CD4 <sup>+</sup> <sup>b</sup>	61.9	54.7	74.8 <sup>d</sup>
CD8 <sup>+</sup> <sup>b</sup>	31.1	34.9	18.6 <sup>d</sup>
CD14 <sup>+</sup> <sup>c</sup>	7.3	14.3	1.2 <sup>d</sup>
CD19 <sup>+</sup> <sup>a</sup>	10.2	7.2	12.5

Medianas obtenidas a partir del porcentaje de células positivas para cada marcador. <sup>a</sup> Porcentaje en relación al total de células linfoides. <sup>b</sup> Porcentaje en relación al total de linfocitos T. <sup>c</sup> Porcentaje en relación al total de CMN. <sup>d</sup>  $p < 0.05$ , con respecto a la sangre de los pacientes con cáncer.

TABLA 9. PORCENTAJE DE LINFOCITOS T CD69<sup>+</sup> EN LA POBLACIÓN DE CMN NO ESTIMULADA Y ESTIMULADA.

EXPRESIÓN DE CD69 EN:	CONTROLES	PACIENTES CON CÁNCER	
	Sangre	Sangre	Derrame pleural
población no estimulada	10.2	11.8	15.7
población estimulada	88.0	75.7	81.7

Se indican las medianas obtenidas a partir de los porcentajes de células CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>.

TABLA 10. PORCENTAJE DE LINFOCITOS T PRODUCTORAS DE CITOCINAS EN CMN ESTIMULADAS CON PMA E IONOMICINA EN PRESENCIA DE BFA.

<i>PRODUCCIÓN DE:</i>	<i>CONTROLES</i>	<i>PACIENTES CON CÁNCER</i>	
	<i>Sangre</i>	<i>Sangre</i>	<i>Derrame pleural</i>
IFN- $\gamma$	27.4	28.3	31.9
IL4	1.7	1.5	1.2
IL10	2.2	2.2	1.9

Se indican las medianas obtenidas a partir de los porcentajes de linfocitos CD3<sup>+</sup> productores de cada citocina.

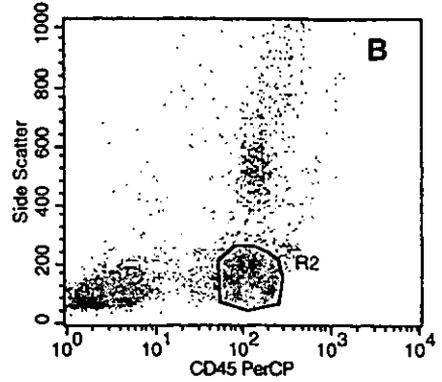
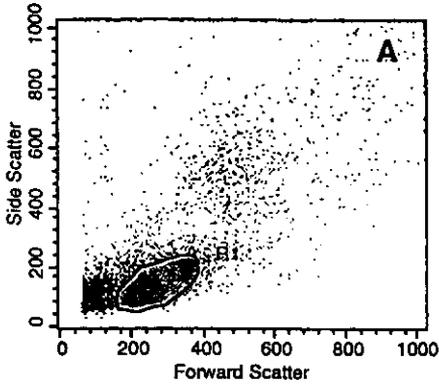
TABLA 11. PORCENTAJE DE MONOCITOS/MACRÓFAGOS PRODUCTORES DE TNF- $\alpha$  EN CMN EN AUSENCIA O PRESENCIA DE LPS.

<i>PRODUCCIÓN DE TNF-<math>\alpha</math> EN:</i>	<i>CONTROLES</i>	<i>PACIENTES CON CÁNCER</i>	
	<i>Sangre</i>	<i>Sangre</i>	<i>Derrame pleural</i>
población no estimulada	29.8	31.1	32.9
población estimulada	88.2	76.8 <sup>a</sup>	67.9 <sup>b</sup>

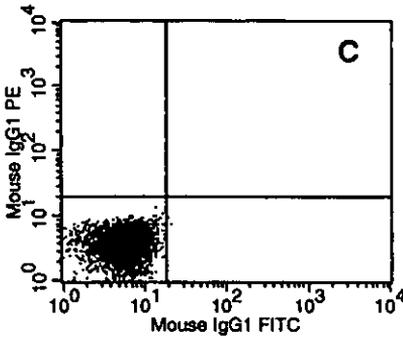
Se indican las medianas obtenidas a partir de los porcentajes de células CD14<sup>+</sup> productoras de TNF- $\alpha$ . <sup>a</sup> p<0.05, en relación a la sangre de los controles.

<sup>b</sup> p<0.05, en relación a la sangre de los pacientes con cáncer.

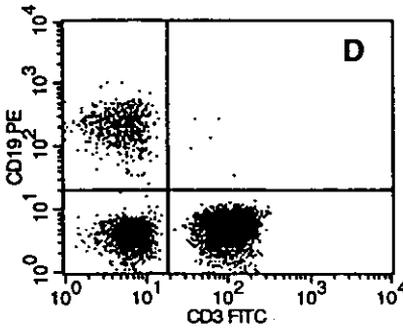
## 7.3 FIGURAS.



REGION R1 Y R2 (LINFOCITOS CD45+)



Quad	% Gated
UL	0.00
UR	0.00
LL	99.97
LR	0.03



Quad	% Gated
UL	10.43
UR	0.08
LL	24.81
LR	64.68

Figura 1. Determinación de linfocitos  $CD3^+$  y  $CD19^+$ . A: se selecciona la región de linfocitos en base a su tamaño y granularidad (R1). B: se selecciona la población de linfocitos en base a su granularidad y la expresión del marcador CD45 (R2). C: controles de isotipo. D: porcentaje de linfocitos  $CD3^+$  y  $CD19^+$ . UL, cuadrante superior izquierdo, linfocitos  $CD19^+/CD3^-$ ; UR, cuadrante superior derecho, linfocitos  $CD19^+/CD3^+$ ; LL, cuadrante inferior izquierdo, linfocitos  $CD19^-/CD3^-$ ; LR, cuadrante inferior derecho, linfocitos  $CD19^-/CD3^+$ . Se adquirieron 10,000 eventos.

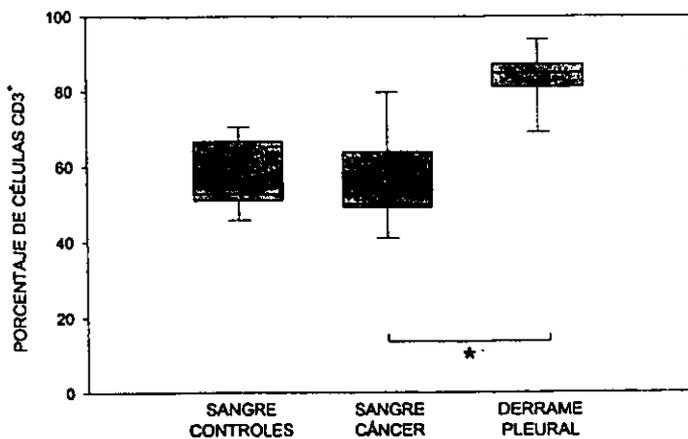


Figura 2. Porcentaje de linfocitos T (CD3<sup>+</sup>). Los límites inferior y superior del rectángulo representan los percentiles 25 y 75, respectivamente; la línea dentro del rectángulo la mediana y los límites fuera del rectángulo los percentiles 10 y 90. \* p<0.05.

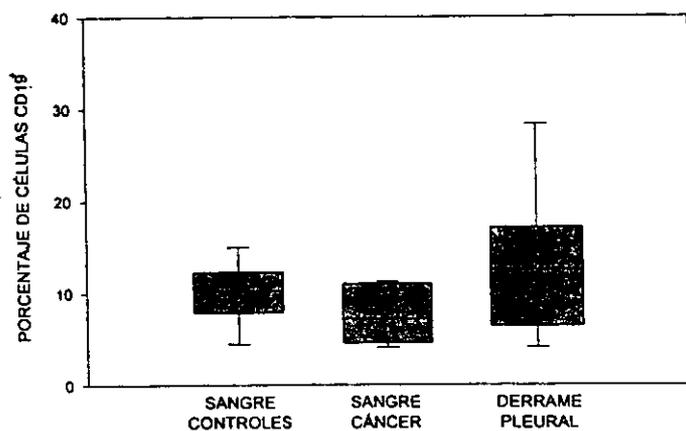
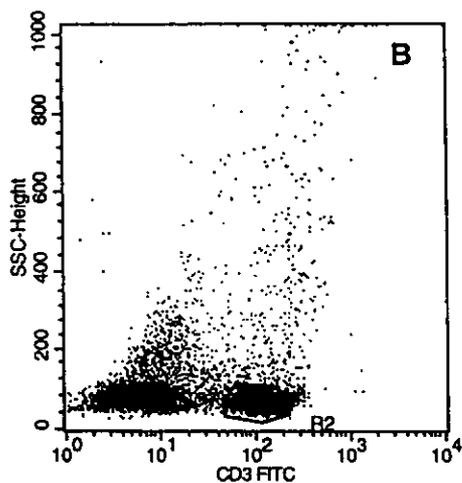
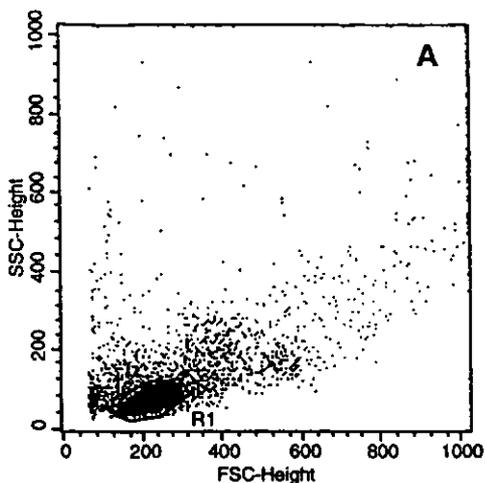
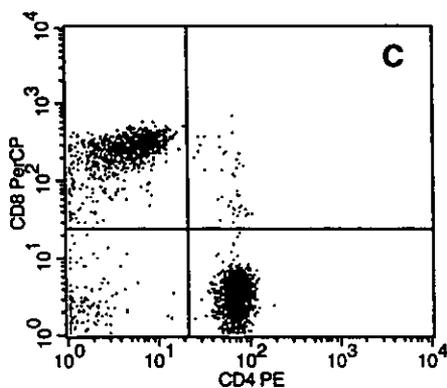


Figura 3. Porcentaje de linfocitos B (CD19<sup>+</sup>).



REGIONES R1 Y R2 (LINFOCITOS CD3+)



Quad	% Gated
UL	36.30
UR	1.14
LL	3.83
LR	58.74

Figura 4. Determinación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. A: se selecciona la región de linfocitos en base a su tamaño y granularidad (R1). B: se seleccionan los linfocitos T en base a la expresión del marcador CD3 (R2). C: porcentajes de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. UL, linfocitos T CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>; UR, linfocitos T CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>; LL, linfocitos T CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>; LR, linfocitos T CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>. Se adquirieron 10,000 eventos.

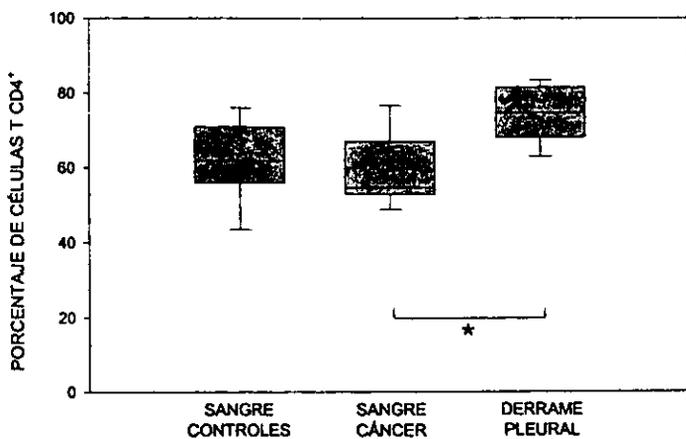


Figura 5. Porcentaje de linfocitos T cooperadores (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>).  
\* p<0.05.

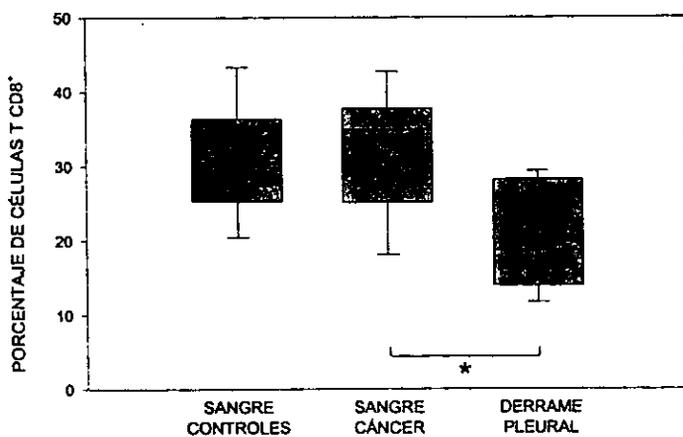
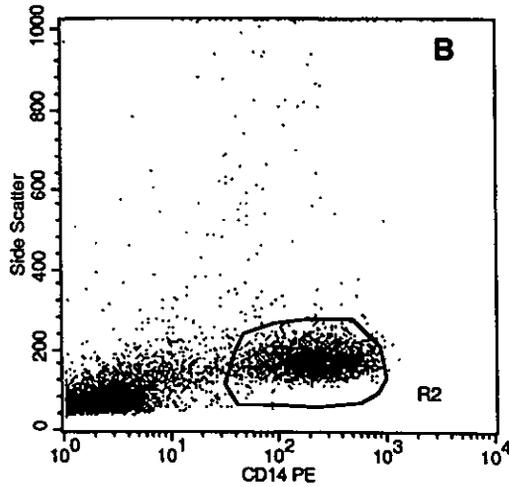
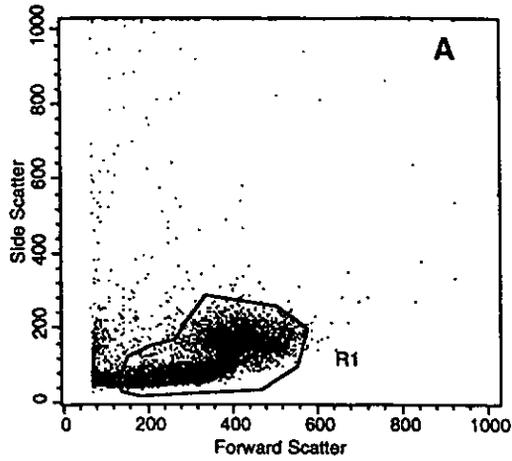


Figura 6. Porcentaje de linfocitos T citotóxicos (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>).  
\* p<0.05.



Region	% Gated
R1	84.65
R2	25.78

Figura 7. Determinación de monocitos/macrófagos. A: El total de CMN queda seleccionado en la región 1 (R1). B: La región 2 (R2) contiene a las células CD14<sup>+</sup>. El porcentaje de monocitos/macrófagos se determinó como se explica en Resultados. Se adquirieron 10,000 eventos.

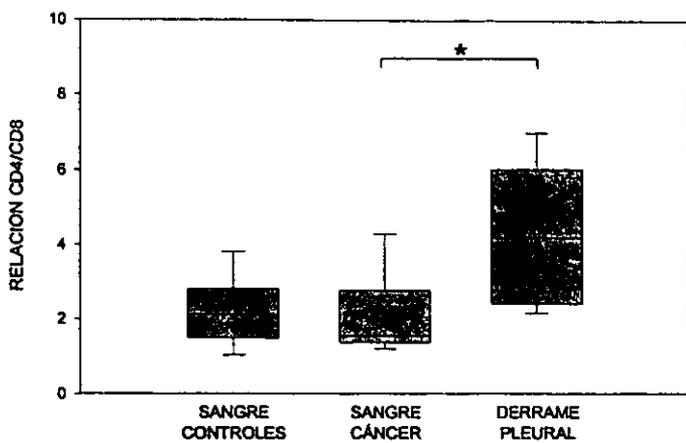


Figura 8. Relación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. \* p<0.05.

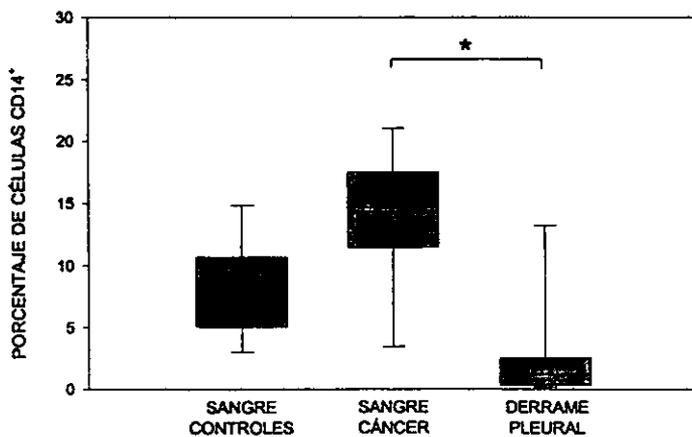
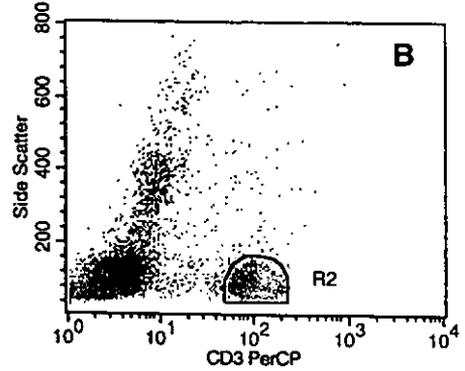
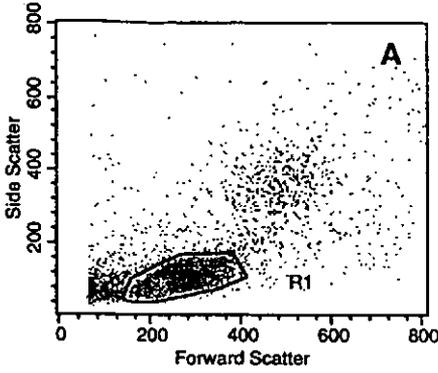
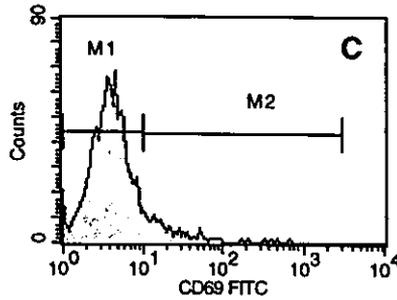


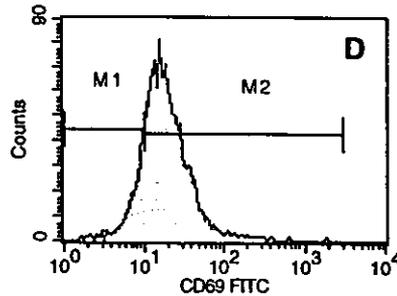
Figura 9. Porcentaje de monocitos/macrófagos (CD14<sup>+</sup>). \* p<0.05.



REGION R2 (LINFOCITOS CD3+)



Marker	% Gated
All	100.00
M1	92.56
M2	7.52



Marker	% Gated
All	100.00
M1	15.43
M2	85.07

Figura 10. Determinación del porcentaje de células activadas en base a la expresión del marcador CD69. A: región de linfocitos en base a su tamaño y granularidad (R1). B: se seleccionan los linfocitos T en base a la expresión del marcador CD3 (R2). C: porcentaje de células T CD69<sup>+</sup> en CMN no estimuladas. D: porcentaje de células T CD69<sup>+</sup> en CMN estimuladas. M1, linfocitos T CD69<sup>-</sup>; M2, linfocitos T CD69<sup>+</sup>. Se adquirieron 20,000 eventos.

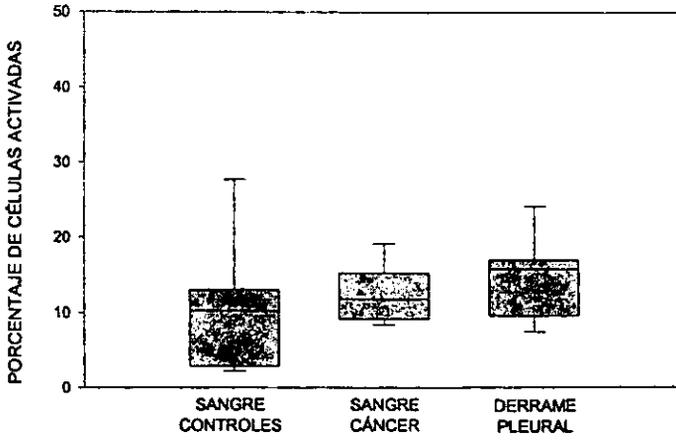


Figura 11. Porcentaje de células T CD69<sup>+</sup> en CMN sin estímulo.

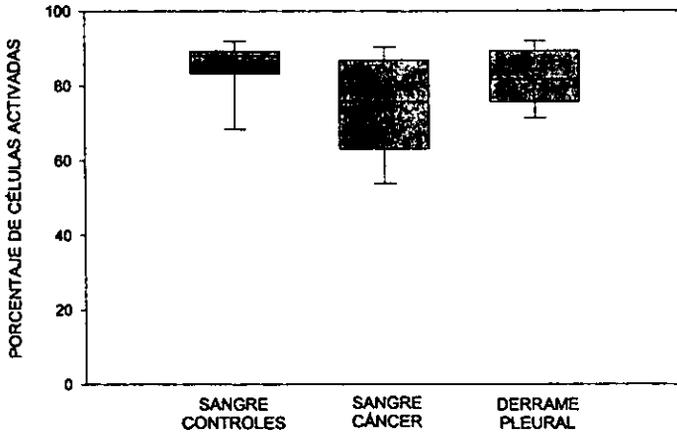
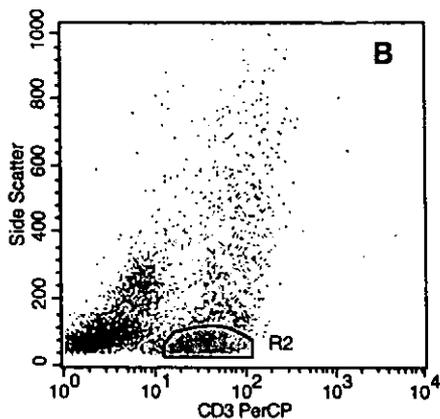
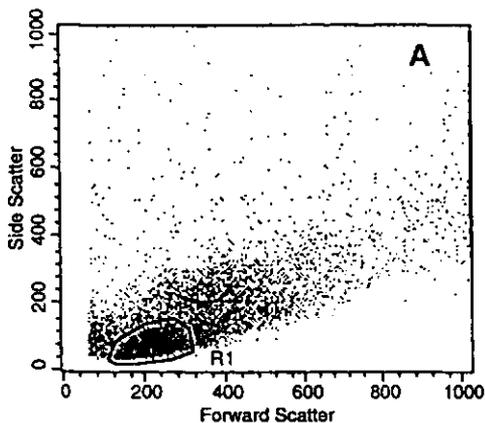
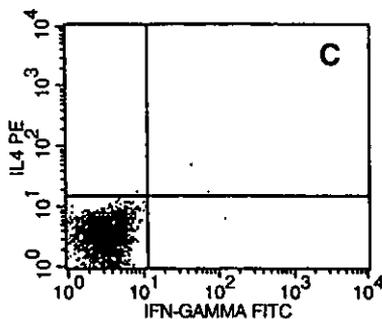


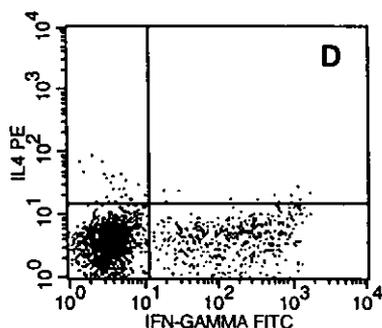
Figura 12. Porcentaje de células T CD69<sup>+</sup> en CMN estimuladas con PMA e ionomicina.



REGION R2 (LINFOCITOS CD3+)



Quad	% Gated
UL	0.09
UR	0.12
LL	99.73
LR	0.07



Quad	% Gated
UL	1.00
UR	0.39
LL	79.13
LR	19.48

Figura 13. Determinación de linfocitos T productores de IFN- $\gamma$  e IL-4. A: región de linfocitos en base a su tamaño y granularidad (R1). B: se seleccionan los linfocitos T en base a la expresión del marcador CD3 (R2). C: porcentaje de linfocitos T productores de citocinas en CMN no estimuladas. D: porcentaje de células T productoras de citocinas en CMN estimuladas. UL, células T IL4<sup>+</sup>/IFN<sup>-</sup>; UR, células T IL4<sup>+</sup>/IFN<sup>+</sup>; LL, células T IL4<sup>-</sup>/IFN<sup>-</sup>; LR, células T IL4<sup>-</sup>/IFN<sup>+</sup>. Se adquirieron 20,000 eventos.

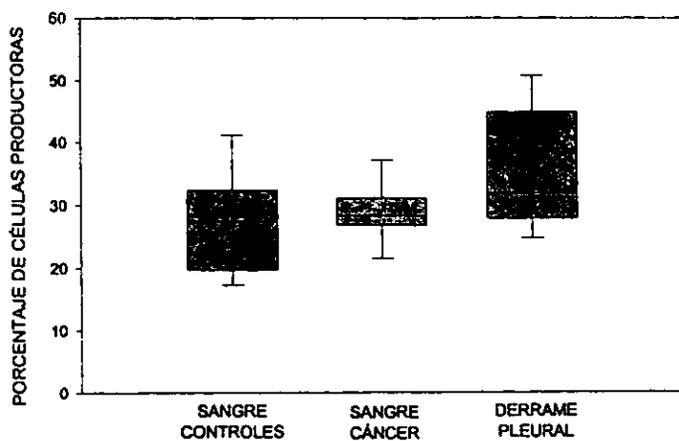


Figura 14. Linfocitos T productores de IFN- $\gamma$ .

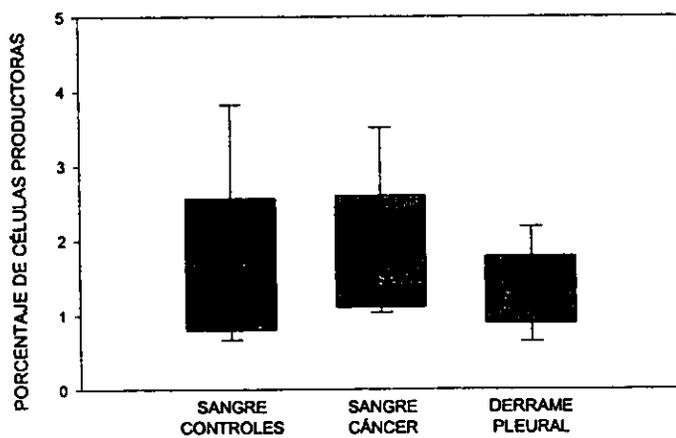
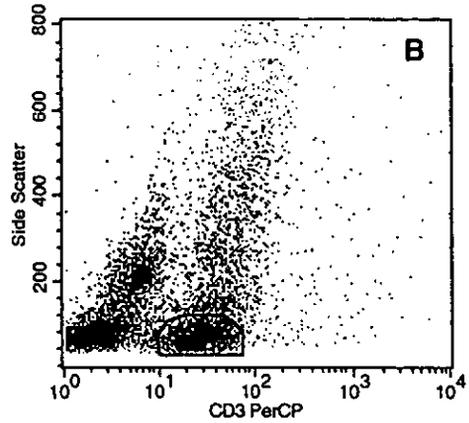
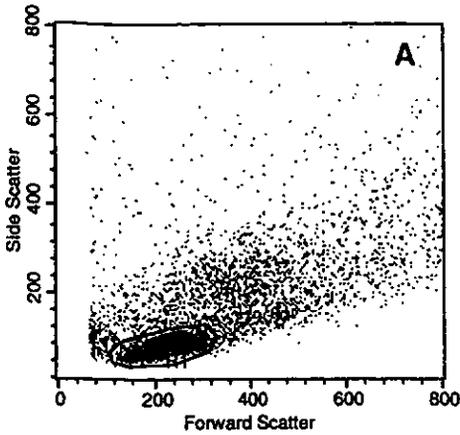
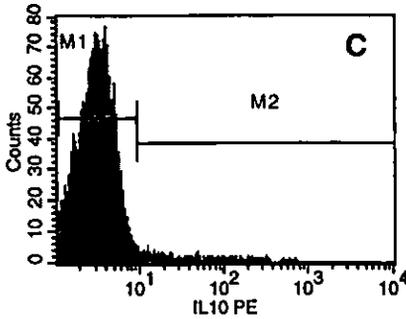


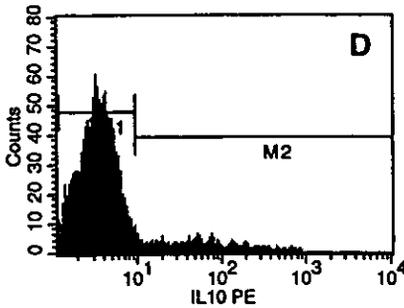
Figura 15. Linfocitos T productores de IL-4.



REGION R2 (LINFOCITOS CD3+)

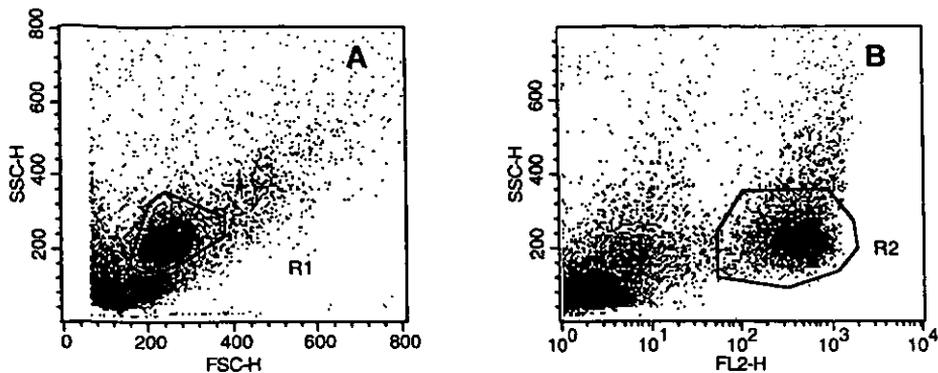


Marker	% Gated
All	100.00
M1	99.62
M2	0.38

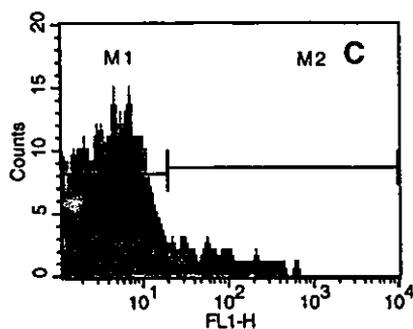


Marker	% Gated
All	100.00
M1	98.18
M2	1.82

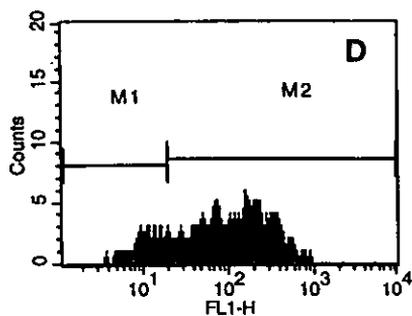
Figura 16. Determinación de linfocitos T productores de IL-10. A: región de linfocitos en base a su tamaño y granularidad (R1). B: se seleccionan los linfocitos T en base a la expresión del marcador CD3 (R2). C: porcentaje de células T productoras de IL-10 en CMN no estimuladas. D: porcentaje de células T productoras de IL-10 en CMN estimuladas. M1, linfocitos T no productoras de IL-10; M2, linfocitos T productoras de IL-10. Se adquirieron 20,000 eventos.



REGION R2 (MONOCITOS/MACROFAGOS)



Marker	% Gated
All	100.00
M1	75.95
M2	11.70



Marker	% Gated
All	100.00
M1	19.05
M2	80.80

Figura 17. Determinación de monocitos/macrófagos productores de TNF- $\alpha$ . A: región de monocitos/macrófagos en base a su tamaño y granularidad (R1). B: se selecciona la misma población en base a la expresión del marcador CD14 (R2). C: porcentaje de monocitos/macrófagos productores de TNF- $\alpha$  en CMN no estimuladas. D: porcentaje de monocitos/macrófagos productores de TNF- $\alpha$  en CMN estimuladas. M1, monocitos no productores de TNF ; M2, monocitos productores de TNF. Se adquirieron 20,000 eventos.

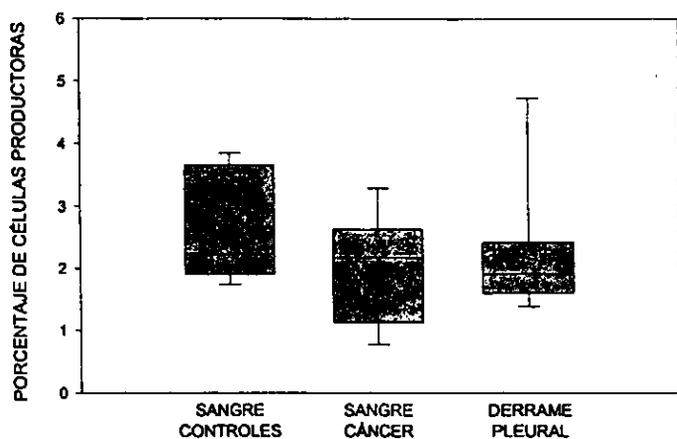


Figura 18. Linfocitos T productores de IL-10.

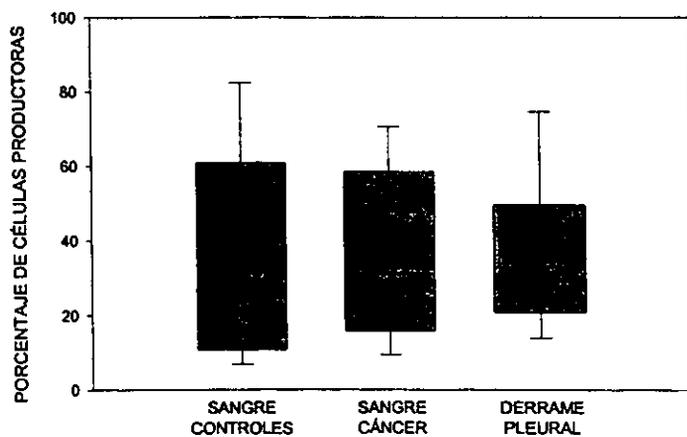


Figura 19. Monocitos/macrófagos productores de TNF- $\alpha$  en CMN sin estímulo.

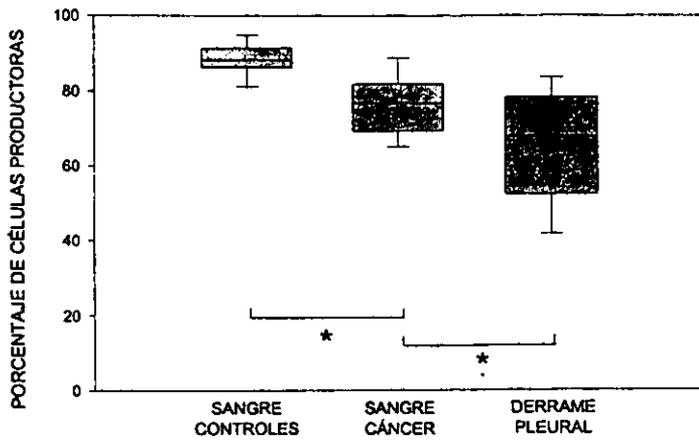


Figura 20. Monocitos/macrófagos productores de TNF- $\alpha$  en CMN estimuladas con LPS. \*  $p < 0.05$ .

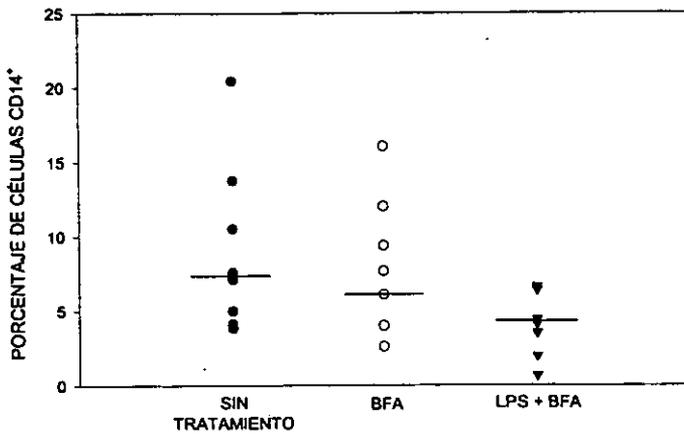


Figura 21. Efecto del LPS y la BFA en la expresión del marcador CD14. — mediana.

ESTA TESIS NO PUEDE  
 SALIR DE LA BIBLIOTECA

## 8. DISCUSIÓN

Los pacientes con cáncer cursan con un estado de inmunosupresión<sup>48</sup> por lo que se ha buscado identificar los mecanismos de ésta. Con respecto al cáncer pulmonar, a nivel sanguíneo también se ha demostrado este fenómeno<sup>46,47</sup>, a nivel local se ha cuantificado la población y actividad de TIL reportándose resultados diversos, lo que pudiera deberse a variaciones metodológicas<sup>51,52</sup>. Otro compartimento estudiado ha sido el espacio pleural, pues dada la posición anatómica del pulmón es frecuente la infiltración y/o metástasis a pleura, lo que pudiera estar influenciado por las propias células malignas y/o por factores del huésped<sup>72</sup>. Este proceso origina la acumulación de líquido en la cavidad pleural, síndrome denominado clínicamente derrame pleural, el cual puede contener tanto células tumorales como células inmunocompetentes<sup>49,50</sup>.

Se considera que, en condiciones normales, el volumen y la composición del líquido pleural son regulados por un balance de presiones hidrostáticas y osmóticas y por la baja permeabilidad de los capilares y linfáticos pleurales<sup>73</sup>. Un aumento en la permeabilidad o la obstrucción de estos últimos favorece la extravasación celular y su acumulación en el espacio pleural como se ha postulado que sucede en el cáncer. Se han realizado estudios para definir el fenotipo y la actividad de las células presentes en la cavidad pleural en condiciones normales. En ellos se reporta que de las CMN los monocitos predominan con un 70% y los linfocitos se encuentran en un 30%<sup>73</sup>; en cuanto a éstos, las proporciones de células T y células CD8<sup>+</sup> son similares a las que se encuentran en sangre, mientras que la proporción de células CD4<sup>+</sup> y células NK se encuentra disminuida<sup>72</sup>. Estos resultados sugieren que en la cavidad pleural

coexisten células inmunocompetentes que tal vez pudieran responder eficientemente al estímulo de las células tumorales.

En base a estos estudios consideramos que el empleo de derrames pleurales de etiología maligna nos permite conocer el comportamiento de las células inmunocompetentes frente a las células transformadas. Inicialmente decidimos estudiar el comportamiento celular a nivel sanguíneo y compararlo con el que se presenta a nivel pleural. Bajo nuestras condiciones experimentales, la proporción de células CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> a nivel sanguíneo en los pacientes con cáncer no muestra diferencias significativas con respecto a las mismas poblaciones celulares en sujetos sanos. Estos resultados sugieren que la presencia de células tumorales en el huésped no ejerce una inmunosupresión que se refleje a nivel sanguíneo como un desequilibrio en el número de linfocitos T y sus subpoblaciones. En este sentido, Moissan<sup>59</sup> mediante rosetas E, encuentra porcentajes de linfocitos T similares a los obtenidos por nosotros, pero al analizarlos como valor absoluto reporta una disminución en los pacientes con cáncer. Nakamura<sup>47</sup> empleando inmunofluorescencia, no encuentra diferencias de linfocitos T y sus subpoblaciones a nivel sanguíneo entre los grupos estudiado y control. Por el contrario, otros autores reportan una disminución en el porcentaje de células T<sup>46,55,59,60</sup> o de linfocitos CD4<sup>+</sup> con valores similares<sup>60</sup> o incrementados<sup>46</sup> de linfocitos CD8<sup>+</sup> en pacientes con cáncer con respecto al grupo control.

El análisis fluorocitométrico nos permitió detectar linfocitos T DP y DN a nivel sanguíneo, mostrando diferencias significativas sólo en las DP. Esta población pudieran ser células T inmaduras<sup>15</sup> que se estarían liberando a la circulación sanguínea como respuesta compensatoria a la disminución de la población de células T, o ser inducida por factores liberados por las células

neoplásicas. Por lo que respecta a la población DN, se encontró incrementada al doble con relación a la DP y pudiera deberse a linfocitos T cuyo receptor está formado por las cadenas  $\gamma\delta^{15}$ , o bien subgrupos de células NK que portan el marcador CD3<sup>74</sup>.

A fin de definir si en los pacientes con cáncer existen células sanguíneas que presenten un estado de activación, se determinó la expresión del marcador CD69 en células T. La expresión basal de este marcador no muestra diferencias entre el grupo control y los pacientes con cáncer. Se ha estudiado el marcador CD25 en CMN de pacientes con cáncer pulmonar, reportándose un aumento de células positivas a éste<sup>75</sup>, aunque otro estudio indica que no hay diferencia en la expresión de CD25 y HLA-DR en linfocitos T sanguíneos entre pacientes con cáncer y sujetos sanos<sup>67</sup>. Por otro lado, los pacientes con cáncer presentaron una menor proporción de células T activadas con el estímulo empleado identificadas en base al marcador CD69, lo que sugiere que los linfocitos T sanguíneos de los pacientes con cáncer presentan alteración de su activación, efecto que pudiera ser causado por factores liberados por las células neoplásicas, y en consecuencia no responder eficientemente en contra de éstas. La disminución de la capacidad proliferativa ha sido descrita en la sangre de los pacientes con cáncer, aunque evaluada mediante ensayos de incorporación de timidina y en respuesta a mitógenos<sup>46,47</sup>. Es probable que la alteración en la activación de los linfocitos T, determinado mediante el marcador CD69, correlacione con el uso de mitógenos.

Los linfocitos T sanguíneos de pacientes con cáncer pulmonar mostraron una producción de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 similar a la del grupo control. Los grupos de Fischer<sup>63</sup> y Mantovani<sup>67</sup> determinan mediante ELISA la producción de citocinas inducida por mitógenos en CMN sanguíneas de pacientes que presentan distintos tipos y estadios de cáncer, encontrando resultados

antagónicos y significativos respecto al grupo control. Asselin-Paturel<sup>66</sup> reporta mediante PCR cuantitativo una disminución en el mensajero para IFN- $\gamma$ , y un incremento del mensajero para IL-4 e IL-10, en las CMN sanguíneas de pacientes con distintos tipos histológicos de cáncer pulmonar. Ito<sup>76</sup> determina mediante citometría de flujo las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$  e IL-4 a nivel sanguíneo en pacientes con cáncer e individuos sanos, observando porcentajes similares de células en ambos grupos, y una relación de células productoras de IFN- $\gamma$  de cuatro a diez veces mayor que las productoras de IL-4. Estos últimos resultados concuerdan con los obtenidos por nuestro grupo. Incluyendo la fenotipificación de células T, nuestros resultados sugieren que a nivel sanguíneo los pacientes con cáncer pulmonar no muestran alteraciones cuali y cuantitativas de linfocitos T.

Al igual que lo obtenido en la cuantificación de linfocitos T y sus subpoblaciones, las células B no muestran diferencias a nivel sanguíneo entre el grupo control y los pacientes con cáncer. Algunos investigadores han encontrado resultados similares a los nuestros<sup>47,58,59,60</sup>, aunque con porcentajes de linfocitos B ligeramente mayores a los obtenidos por nuestro grupo<sup>47,58</sup>. Es probable que la presencia de células neoplásicas presentes en el paciente no repercuta en modificar esta estirpe a nivel sanguíneo. Sin embargo, Radhakrishna<sup>46</sup> y colaboradores al reportar valores absolutos sanguíneos de células B encuentran un incremento de esta estirpe en pacientes con cáncer pulmonar.

En relación a los monocitos, nuestros resultados muestran un aumento no significativo de esta estirpe en la sangre de los pacientes con cáncer en comparación con el grupo control. Cabe mencionar que en relación al cáncer pulmonar, los monocitos han sido poco estudiados. Fischer<sup>63</sup> mediante conteo

diferencial sanguíneo no encuentra diferencias de estas células entre pacientes con cáncer e individuos sanos. Wimmenauer<sup>52</sup>, mediante inmunofluorescencia, encuentra en la sangre de pacientes con cáncer porcentajes de células CD14<sup>+</sup> similares a nuestros valores, pero no emplea controles sanos.

En lo que respecta a la producción basal de TNF- $\alpha$ , se encontraron células productoras de esta citocina en porcentajes muy variables, tanto en los controles como en los pacientes con cáncer, sin mostrar diferencias. La gran dispersión de valores pudiera deberse a variaciones interindividuales dadas por las características genéticas, factores ambientales, o a la activación inespecífica de los monocitos durante el proceso metodológico empleado<sup>77</sup>. La producción inducida de TNF- $\alpha$  en los monocitos de los pacientes con cáncer mostró una disminución significativa de células productoras de TNF- $\alpha$  con respecto al grupo control. Este fenómeno pudiera deberse a la producción de factores solubles derivados de las células neoplásicas que afecten primordialmente a los monocitos, disminuyendo su capacidad para la erradicación de las células transformadas<sup>77</sup>. Mantovani<sup>67</sup> y colaboradores estimularon CMN con mitógeno (PHA) y determinaron el TNF- $\alpha$  mediante ELISA encontrando niveles menores de esta citocina en los pacientes con cáncer respecto al grupo control. Por su parte, Fischer<sup>63</sup> y colaboradores cuantificaron por ELISA la concentración de TNF- $\alpha$  a nivel plasmático en pacientes con cáncer, no encontrando diferencias con sujetos sanos.

En relación a la población inmunocompetente en el derrame pleural maligno, encontramos incremento en el porcentaje de linfocitos T, causado principalmente por linfocitos CD4<sup>+</sup>, y disminución de linfocitos CD8<sup>+</sup> en comparación con la sangre de los mismos pacientes. Ya ha sido reportado un comportamiento similar<sup>53,54,55,61,62</sup>. Sólo Albera<sup>60</sup> y colaboradores, empleando

inmunofluorescencia, no encuentran diferencias de linfocitos T y sus subpoblaciones en sangre y derrame pleural de pacientes con cáncer. Estos resultados sugieren la acumulación selectiva de células CD4<sup>+</sup> en el espacio pleural probablemente: a) debido a la proliferación de esta subpoblación de linfocitos T por la activación de la respuesta inmune en respuesta a las células tumorales y b) debido a la posible liberación de quimiocinas selectivas para esta subpoblación por las células tumorales y/o por las células normales en respuesta al crecimiento tumoral<sup>78</sup>. La disminución de las células CD8<sup>+</sup> podría ser relativa a la expansión de los linfocitos CD4<sup>+</sup>, o bien la presencia y/o liberación de factores inhibitorios de la migración y/o proliferación de linfocitos CD8<sup>+</sup> por las células tumorales<sup>79</sup>.

Con respecto a los linfocitos T DN, se encontró una disminución en el derrame pleural en relación a la sangre de los mismos pacientes, los cuales pudieran ser linfocitos T  $\gamma\delta$ . Estudios previos reportan una baja proporción de linfocitos T con receptor  $\gamma\delta$  en TIL y en derrame pleural con incremento en su actividad tóxica hacia células tumorales autólogas y líneas celulares<sup>80</sup>. Tendremos que realizar mas estudios con el fin de demostrar esta población y su actividad biológica.

En el derrame pleural, la expresión basal del marcador CD69 en linfocitos T mostró una tendencia (no significativa) a incrementarse en comparación a la sangre de los pacientes con cáncer y del grupo control. Mantovani<sup>67</sup> y colaboradores, mediante citometría de flujo, evaluaron la expresión de los marcadores CD25 y HLA-DR en CMN de sangre y líquido pleural de pacientes con cáncer sin encontrar diferencias; este estudio correlaciona con el nuestro. Por otro lado, la población estimulada de linfocitos T mostrando CD69 se incrementó, de manera no significativa, en derrame pleural con relación a la

sangre de los mismos pacientes, y no hubo diferencias con el grupo control. Mantovani<sup>67</sup> y colaboradores evaluaron la expresión de CD25 y HLA-DR en CMN estimuladas con mitógeno o anti-CD3, no encontrando diferencias de estos marcadores en sangre y derrame pleural. Es probable que el uso de potentes estímulos policlonales no permita discriminar alteraciones en el estado de activación de los linfocitos en pacientes con cáncer.

El derrame pleural, en relación a la sangre de los pacientes con cáncer, mostró una tendencia a incrementar el porcentaje de células T productoras de IFN- $\gamma$ , con tendencia opuesta para las células T productoras de IL-4 e IL-10. Esto sugiere que en el derrame pleural pudiera presentarse una respuesta tipo Th1, aunque dicha respuesta pueda o no ser eficaz contra las células tumorales<sup>76</sup>. Mantovani<sup>67</sup> y colaboradores cuantificaron mediante ELISA la producción de citocinas inducida por mitógenos en CMN de sangre y derrame pleural de pacientes con cáncer y reportan niveles similares de IL-4 e IL-10 en ambos líquidos, y niveles mayores de IFN- $\gamma$  en derrame pleural, lo que correlaciona con nuestros resultados. Por otro lado, Chen<sup>61,65</sup> y colaboradores determinan IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 mediante ELISA en sangre y derrame pleural de pacientes con cáncer, encontrando niveles mínimos de IL-4 e IFN- $\gamma$  y niveles elevados de IL-10 en el derrame pleural, por lo que concluyen que en este compartimento se genera una respuesta tipo Th2.

La población de linfocitos B en derrame pleural no mostró diferencias en relación a la sangre de los mismos pacientes y los controles. Varios investigadores han cuantificado las células B en la sangre y el derrame pleural de pacientes con cáncer sin encontrar diferencias<sup>59,60,61</sup>. Estos resultados sugieren que la presencia de células tumorales en el mismo microambiente no afecta la proporción de esta población celular. Por otro lado, Petterson<sup>58</sup> y colaboradores,

mediante inmunofluorescencia, reportan una disminución de linfocitos B en el derrame pleural en relación a la sangre de los pacientes con cáncer, con porcentajes de linfocitos B sanguíneos superiores a los obtenidos por nosotros.

Con respecto a los monocitos, el derrame pleural mostró una disminución significativa de esta población en relación a la sangre de los pacientes con cáncer y de los valores normales reportados para esta cavidad anatómica. Algunos grupos<sup>56,57</sup> reportan valores de monocitos que varían de 10 a 30% en el derrame pleural maligno, pero no realizan comparaciones con la sangre de los mismos pacientes. La disminución de monocitos en el derrame pleural pudiera ser relativa al incremento de linfocitos T, o deberse a factores inhibitorios de su migración producidos por las células neoplásicas<sup>70</sup>.

La producción de TNF- $\alpha$  por monocitos estimulados de derrame pleural fue significativamente menor en comparación a la sangre de los mismos pacientes. Mantovani<sup>67</sup> y colaboradores determinaron mediante ELISA la producción de TNF- $\alpha$  en CMN estimuladas con mitógeno, encontrando una disminución de esta citocina en derrame pleural con respecto a la sangre de los pacientes, lo que correlaciona con nuestros resultados. Empleando cocultivos de monocitos y líneas tumorales, nuestro grupo ha previamente reportado que líneas de tumores pulmonares liberan factores solubles que bloquean la producción del TNF- $\alpha$ <sup>77</sup>; un fenómeno similar pudiera ocurrir *in vivo*. De manera antagónica, Orphanidou<sup>71</sup> y colaboradores no encuentran diferencias al analizar mediante RIA la concentración de TNF- $\alpha$  en plasma y derrame pleural de pacientes con cáncer.

En suma, los resultados obtenidos hasta el momento con la metodología empleada, parecen indicar que las células malignas tipo adenocarcinoma modifican cuantitativamente pero no cualitativamente a los linfocitos T y sus

subpoblaciones. Además, este tipo de tumor parece afectar primordialmente a los monocitos, tanto en número como en su capacidad funcional para producción de TNF- $\alpha$ , citocina que además de tener función inmunomoduladora, presenta actividad tóxica contra las células transformadas, lo que podría contribuir a la falla del sistema inmune para la erradicación del tumor.

## 9. CONCLUSIONES

- ◆ La sangre de los pacientes y del grupo control mostró valores similares de linfocitos T y sus subpoblaciones, linfocitos B y monocitos.
- ◆ El derrame pleural mostró un aumento de linfocitos T, mediado principalmente por células T CD4<sup>+</sup>, y una disminución de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en comparación a la sangre de los mismos pacientes.
- ◆ La sangre y el derrame pleural de los pacientes con cáncer no mostraron diferencias en la proporción de linfocitos B.
- ◆ El derrame pleural de los pacientes con cáncer presentó una disminución de células CD14<sup>+</sup> en comparación a la sangre.
- ◆ Los pacientes con cáncer mostraron una tendencia a incrementar el porcentaje de linfocitos T productores de IFN- $\gamma$  en derrame pleural en relación a la sangre. Los linfocitos T productores de IL-4 y aquellos productores de IL-10 presentaron el efecto contrario.
- ◆ Los pacientes con cáncer presentaron una disminución de monocitos productores de TNF- $\alpha$  que los controles, efecto que es mas pronunciado en el derrame pleural.

Es necesario realizar estudios mas detallados con el fin de determinar el efecto de las células tumorales sobre la respuesta inmune antitumoral, así como la participación de las células inmunocompetentes en la erradicación de las células neoplásicas, a fin de aplicar inmunoterapias diseñadas para contrarrestar el crecimiento tumoral.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Travis WD, Travis LB, Devesa SS. Lung Cancer. *Cancer* 1995; 75: 191-202.
2. Richardson GE, Johnson BE. The biology of lung cancer. *Semin Oncol* 1993; 20: 105-127.
3. Weinberg RA. How Cancer Arises. *Sci Am* 1996; 275: 62-69.
4. Barret JC. Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environ Health Perspect* 1993; 100: 9-20.
5. Davila DG, Williams DE. The etiology of lung cancer. *Mayo Clin Proc* 1993; 68: 170-182.
6. Pitot HC, Dragan YP. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *FASEB J* 1991; 5: 2280-2286.
7. Ruoslahti E. How Cancer Spreads. *Sci Am* 1996; 275: 72-77.
8. Fishman AP, Elias JA, Fishman JA, Grippi MA, Kaiser LR, Senior RM. Fishman's pulmonary diseases and disorders. Third ed. USA: McGraw-Hill. 1998.
9. Williams CM. Diet and cancer prevention. *Chem Ind* 1993; 19: 280-283.
10. Trichopoulos D, Frederick PL, Hunter DJ. What causes cancer?. *Sci Am* 1996; 275: 80-87.
11. Yesner R. Pathogenesis and pathology. *Clin Chest Med* 1993; 14: 17-30.
12. Rosado-de-Christenson ML, Templeton PA, Moran CA. Bronchogenic carcinoma: Radiologic-pathologic correlation. *RadioGraphics* 1994; 14: 429-446.
13. Pass HI, Mitchell JB, Johnson DH, Turrisi AT. Lung cancer: principles and practice. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996.

14. Haque AK. Pathology of carcinoma of lung. An update on current concepts. *J Thorac Imaging* 1991; 7: 9-20.
15. Abbas AK, Lichtman Ah, Pober SS. Inmunología celular y molecular 2ª ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana, 1995.
16. Stites DP, Terr AI, Parslow TG. Inmunología básica y clínica 8ª ed. México, D.F.: Manual Moderno, 1996.
17. Lohmann-Matthes ML, Steinmüller C, Franke-Ullmann. Pulmonary macrophages. *Eur Respir J* 1994; 7: 1678-1689.
18. Vignola AM, Gjomarkaj M, Arnoux B, Bousquet J. Monocytes. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 149-152.
19. Agostini C, Chilosi M, Zambello R, Trentin L, Semenzato G. Pulmonary immune cells in health and disease: lymphocytes. *Eur Respir J* 1993; 6: 1378-1401.
20. Street NE, Mossman TR. Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *FASEB J* 1991; 5: 171-177.
21. Mossman TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-173.
22. Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4<sup>+</sup> T cells. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 635-673.
23. Mossman TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subset: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17: 138-146.
24. Noble A, Macary PA, Kemeny DM. IFN- $\gamma$  and IL-4 regulate the growth and differentiation of CD8<sup>+</sup> T cells into subpopulations with distinct cytokine profiles. *J Immunol* 1995; 155: 2928-2937.

25. Kelso A. Cytokines: principles and prospects. *Immunol Cell Biol* 1998; 76: 300-317.
26. Borish L, Rosenwasser LJ. Update on cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 719-734.
27. Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon- $\gamma$  and its receptor. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 571-611.
28. Ryan JJ. Interleukin-4 and its receptor: essential mediators of the allergic response. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 1-5.
29. Paul WE. Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 1991; 77: 1859-1870.
30. Moore KW, O'Garra A, Malefyt RW, Vieira P, Mossman TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 165-90.
31. Borish L. IL-10: evolving concepts. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 293-297.
32. Bemelmans MHA, van Tits LJH, Buurman WA. Tumor necrosis factor: function, release and clearance. *Crit Rev Immunol* 1996; 16: 1-11.
33. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 411-452.
34. Parks DR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Flow cytometry and fluorescence-activated cell sorting. In: Paul WE. *Fundamental Immunology*, 2<sup>nd</sup> ed. New York: Raven Press LTD, 1989: 781-802.
35. Stewart CC. Multiparameter flow cytometry. In: van Oss CJ, van Regenmortel MHV. *Immunochemistry*. USA: Marcel Dekker, Inc., 1994: 849-866.

36. Alzona M, Jäck HM, Ficher RI, Ellis TM. CD30 defines a subset of activated human T cells that produce IFN- $\gamma$  and IL-5 and exhibit enhanced B cell helper activity. *J Immunol* 1994; 153: 2861-2867.
37. Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* 1998; 19: 568-574.
38. Dinarello CA. IL-18: a Th1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 11-24.
39. Krouwels FH, Nocker RET, Snoek M, Lutter R, van der Zee JS, Weller FR, et al. Immunocytochemical and flow cytofluorimetric detection of intracellular IL-4, IL-5 and IFN- $\gamma$ : applications using blood- and airway-derived cells. *J Immunol Methods* 1997; 203: 89-101.
40. Sander B, Andersson J, Andersson U. Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde-saponin procedure. *Immunol Rev* 1991; 119:65-93.
41. Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1993; 159: 197-207.
42. Andersson U, Björk L, Skansén-Saphir U, Andersson J. Pooled human IgG modulates cytokine production in lymphocytes and monocytes. *Immunol Rev* 1994; 139: 21-42.
43. Vandenberghe P, Verwilghen J, Vaeck FV, Ceuppens JL. Ligation of the CD5 or CD28 molecules on resting human T cells induces expression of the early activation antigen CD69 by a calcium- and tyrosine kinase-dependent mechanism. *Immunology* 1993; 78: 210-217.

44. Schauer U, Jung T, Krug N, Frew A. Measurement of intracellular cytokines. *Immunol Today* 1996; 17: 305-306.
45. Prussin C, Metcalfe DD. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J Immunol Methods* 1995; 188: 117-128.
46. Radhakrishna PM, Balaram P, Padmanabhan TK, Abraham T, Hareendran NK, Krishnan NM. Immunocompetence in lung cancer. *Cancer* 1989; 64: 1853-1858.
47. Nakamura H, Ishiguro K, Mori T. Different immune functions of peripheral blood, regional lymph node and tumor infiltrating lymphocytes in lung cancer patients. *Cancer* 1988; 62: 2489-2497.
48. Mentzer SJ. Immunoreactivity in lung cancer. *Chest Surg Clin N Am* 1995; 5: 57-71.
49. Sahn SA. Pleural effusion in lung cancer. *Clin Chest Med* 1993; 14: 189-200.
50. Sahn SA. Malignant pleural effusions. *Clin Chest Med* 1985; 6: 113-125.
51. Chin Y, Janseens J, Vandepitte J, Vandenbrande J, Opdebeek L, Raus J. Phenotypic analysis of tumor-infiltrating lymphocytes from human breast cancer. *Anticancer Res* 1992; 12: 1463-1466.
52. Wimmenaver S, Wintzer HO, Kleist S. Phenotyping of human tumor-infiltrating lymphocytes before and after exposure to different in vitro stimulation conditions. *Anticancer Res* 1991; 11: 1013-1020.
53. Domagala W, Emerson EE, Koss LG. Distribution of T-lymphocytes and B-lymphocytes in peripheral blood and effusions of patients with cancer. *J Natl Cancer Inst* 1978; 61: 295-300.

54. Ribera E, Ocaña I, Martínez-Vázquez JM, Rosell M, Español T, Ruibal A. High level of interferon gamma in tuberculous pleural effusion. *Chest* 1988; 92: 308-311.
55. López-González JS, Hernández A, Ponce I, López A, Cervera MI. Compartimentalización de linfocitos T en derrames pleurales. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 1993; 6: 8-11.
56. Gjomarkaj M, Pace E, Melis M, Spatafora M, Toews GB. Mononuclear cells in exudative malignant pleural effusions. *Chest* 1994; 106: 1042-1049.
57. Bagci CB, Demiralp E, Çelikel T. Analysis of pleural effusions using flow cytometry. *Respiration* 1996; 63: 17-24.
58. Petterson T, Klockars M, Hellstrom PE, Riska H, Wangel A. T and B lymphocytes in pleural effusions. *Chest* 1978; 73: 49-51.
59. Moisan T, Chandrasekhar AJ, Robinson J, McKenna J, Marti G. Distribution of lymphocyte subpopulations in patients with exudative pleural effusions. *Am Rev Resp Dis* 1978; 117: 507-511.
60. Albera C, Mabritto I, Ghio P, Scagliotti GV, Pozzi E. Lymphocyte subpopulation analysis in pleural fluid and peripheral blood in patients with lymphocyte pleural effusions. *Respiration* 1991; 58: 65-71.
61. Chen YM, Yang WK, Whang-Peng J, Ing-Tiau KB, Perng RP. Elevation of interleukin-10 levels in malignant pleural effusion. *Chest* 1996; 110: 433-436.
62. Lucivero G, Pierucci G, Bonomo L. lymphocyte subsets in peripheral blood and pleural fluid. *Eur Resp J* 1988; 1: 337-340.
63. Fischer JR, Schindel M, Stein N, Lahm H, Gallati H, Krammer PH, et al. Selective suppression of cytokine secretion in patients with small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 1995; 6: 921-926.

64. Shimokata G, Saka H, Murate T, Hasegawa Y, Hasegawa I. Cytokine content in pleural effusion. *Chest* 1991; 99: 1103-1107.
65. Chen YM, Yang WK, Ting CC, Tsai WY, Yang DM, Whang-Peng J, et al. Cross regulation by IL-10 and IL-2/IL-12 of the helper T cells and the cytolytic activity of lymphocytes from malignant effusions of lung cancer patients. *Chest* 1997; 112: 960-966.
66. Asselin-Paturel C, Echchakir H, Carayol G, Gay F, Opolon P, Grunenwald D, et al. Quantitative analysis of Th1, Th2 and TGF- $\beta$ 1 cytokine expression in tumor, TIL and PBL of non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer* 1998; 77: 7-12.
67. Mantovani G, Maccio A, Pisano M, Versace R, Lai P, Esu S, et al. Tumor-associated lympho-monocytes from neoplastic effusions are immunologically defective in comparison with patient autologous PBMCs but are capable of realising high amounts of various cytokines. *Int J Cancer* 1997; 71: 724-731.
68. Söderblom T, Nyberg P, Teppo AM, Klockars M, Riska H, Petterson T. Pleural fluid interferon- $\gamma$  and tumour necrosis factor- $\alpha$  in tuberculous and rheumatoid pleurisy. *Eur Respir J* 1996; 9: 1652-1655.
69. Huang M, Wang J, Lee P, Sharma S, Mao JT, Meissner H, et al. Human non-small cell lung cancer cells express a type 2 cytokine pattern. *Cancer Res* 1995; 55: 3847-3853.
70. Martinet N, Beck G, Bernard V, Plenat F, Vaillant P, Schooneman F, et al. Mechanism for the recruitment of macrophages to cancer site. *Cancer* 1992; 70: 854-860.
71. Orphanidou D, Gaga M, Rasidakis A, Dimakou K, Toumbis M, Latsi P, et al. Tumour necrosis factor, interleukin-1 and adenosine deaminase in tuberculous pleural effusion. *Respir Med* 1996; 90: 95-98.

72. Takahashi K, Sone S, Kimura S, Ogura T, Monden Y. Phenotypes and lymphokine-activated killer activity of pleural cavity lymphocytes of lung cancer patients without malignant effusion. *Chest* 1993; 103: 1732-1738.
73. Wang NS. Anatomy of the pleura. *Clin Chest Med* 1998; 19: 229-240.
74. Schmidt RE, Murray C, Daley JF, Schlossman SF, Ritz J. A subset of natural killer cells in peripheral blood displays a mature T cell phenotype. *J Exp Med* 1986; 164: 351-362.
75. Tsuyuguchi I, Shiratsuchi H, Fukuoka M. Increased circulating activated T-cells in lung cancer. *Chest* 1986; 89: 705-708.
76. Ito N, Nakamura H, Tanaka Y, Ohgi S. Analysis of T helper type 1 and 2 cells and T cytotoxic type 1 and 2 cells by intracellular cytokine detection with flow cytometry. *Cancer* 1999; 85: 2359-2367.
77. López-González JS, Hernández GA, Ponce NMI, Aguilar CD, Mandoki JJ, Medina MF, et al. Evasion mechanisms to tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) of small cell lung carcinoma and non-small cell lung carcinoma cell lines: comparison with the erythroleukemia K-562 cell line. *Lung Cancer* 2000; 27: 177-187.
78. Gale LM, McColl SR. Chemokines: extracellular messengers for all occasions?. *BioEssays* 1999; 21: 17-28.
79. Chouaib S, Asselin-Paturel C, Mami-Chouaib F, Caignard A, Blay JY. The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction. *Immunol Today* 1997; 18: 493-497.
80. Zocchi MR, Ferrarini M, Rugarli C. Selective lysis of the autologous tumor by delta TCS1<sup>+</sup> gamma/delta<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes from human lung carcinomas. *Eur J Immunol* 1990; 20: 2685-2689.