



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

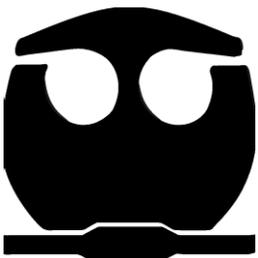
CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS INFLAMATORIAS
INFILTRANTES DE TUMORES PULMONARES TIPO
ADENOCARCINOMA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

LORENZO ISLAS VÁZQUEZ



MÉXICO, D.F.

AÑO 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: ANA ESTHER AGUILAR CARDENAS
VOCAL: CONSTANTINO III ROBERTO LÓPEZ MACIAS
SECRETARIO: JOSÉ SULIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ
1er. SUPLENTE: JORGE FERNANDO PANIAGUA SOLIS
2° SUPLENTE: LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE CÁNCER PULMONAR, DEPARTAMENTO DE ENFERMEDADES CRÓNICO-DEGENERATIVAS, UNIDAD DE INVESTIGACIÓN; INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIOAS “ISMAEL COSIO VILLEGAS”

ASESOR DEL TEMA: JOSÉ SULIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ.

SUPERVISOR TÉCNICO: MANUEL MENESES FLORES.

SUSTENTANTE: LORENZO ISLAS VÁZQUEZ.

AGRADECIMIENTOS.

A mis padres por el apoyo otorgado durante la realización de este trabajo, por su cariño y palabras de ánimo que me motivaron a llevar a cabo este sueño, por su esfuerzo y dedicación para hacer de mí un hombre de bien, por haberme dado todo lo que estuvo en sus manos para que a mí no me faltara nada. Los amo.

A mis hermanos que con su cariño y apoyo hicieron que esto fuera más fácil.

A los integrantes del laboratorio de cáncer pulmonar del INER (Dolores, Paty, Susana, Ángeles, Nohemí, Norma, Vero, Ere, Edith, Heriberto) por sus comentarios y críticas hechas para mejorar este trabajo, al Doctor Sullivan por permitirme ser parte de su grupo y darme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección, por su tiempo y dedicación, a Manuel por sus pláticas, consejos y enseñarme a ver las cosas de una manera diferente.

A mis amigas Paguas, Bety (ñoñis), Sandra (chispa), Cinthya por las alegrías, pláticas, consejos y apoyo durante el tiempo que compartimos.

A Nayade y Clau por permitirme ser parte de su vida y formar parte importante de la mía, por sus innumerables consejos y apoyo en los momentos más difíciles que tuve, las quiero mucho.

A Edith por el tiempo que hemos compartido juntos, por ser la personita que llegó a mi vida para iluminarla y darle felicidad TE QUIERO MUCHO.

A Víctor y el Logan por los momentos agradables que compartimos, a Jonathan (el mingé) por el patrocinio de las quecas con mi tía y sobre todo por su amistad sincera.

A los amigos de la jardinera (Pliego, Said, Liber, Brenda, SILVIA, Juan, Miguel, Christian, Karla, Angie, Toño...) por ser mi segunda familia y aquellos con los que compartí grandes momentos de mi vida.

A aquellas personas con las que he compartido algún momento de mi vida y a aquellas que a pesar de la distancia siempre nos hemos mantenido en contacto, Alex Barragán, Nefi, Armando mi hermano, Janette.

ÍNDICE.

INTRODUCCIÓN	5
CARCINOGENÉISIS	5
CÁNCER PULMONAR	6
Etiología	6
Patología	7
CARCINOMA DE CÉLULAS PEQUEÑAS	9
CARCINOMA DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS	9
Carcinoma de células escamosas (epidermoide).....	9
Carcinoma de células grandes	10
ADENOCARCINOMA	10
ANTÍGENOS TUMORALES	11
SISTEMA INMUNOLÓGICO	12
CÉLULAS NK	13
Células presentadoras de antígeno (APCs).....	13
CÉLULAS DENDRÍTICAS (DCs)	14
LINFOCITOS T	14
Linfocitos T CD4+ cooperadores (Th).....	15
Linfocitos T CD8+ citotóxicos (CTLs).....	16
ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA INMUNE EN EL PULMÓN	16
SISTEMA INMUNE Y CÁNCER	18
MECANISMOS DE EVASIÓN TUMORAL	21
Pérdida o disminución en la expresión de la molécula de clase I del MHC	21
Factores solubles derivados del tumor	22
Señalización defectuosa de los receptores de muerte	22
Alteraciones en la transducción de señales de las células efectoras	23
Ignorancia inmunológica y tolerancia en tumores	24
ANTECEDENTES	26
CÁNCER	26
LINFOCITOS INFILTRANTES DEL TUMOR (TILs)	27
TILs EN CÁNCER	28

ANTECEDENTES DIRECTOS	32
JUSTIFICACIÓN	34
HIPÓTESIS	35
OBJETIVO	36
Objetivos particulares	36
MATERIALES Y MÉTODOS	37
Material biológico	37
Anticuerpos	37
Protocolo de tinción inmunohistoquímica	39
Clasificación y evaluación del infiltrado inflamatorio	40
Análisis estadístico	41
RESULTADOS	42
Determinación de las proporciones de las poblaciones celulares en los adenocarcinomas pulmonares	42
Distribución regional (intratumoral o peritumoral) de las poblaciones celulares estudiadas	43
Proporción de linfocitos T con fenotipo de memoria	45
Determinación de proporciones de células citotóxicas con potencial citocida	45
DISCUSIÓN	50
Densidad de células inflamatorias	50
Potencial citocida de las células citotóxicas	53
CONCLUSIONES	55
BIBLIOGRAFÍA	56

INTRODUCCIÓN

CARCINOGENESIS

Actualmente, en el ámbito celular, se reconoce al cáncer como una anomalía genética que implica la mutación de genes, algunos de los cuales actúan normalmente suprimiendo o favoreciendo la continuidad del ciclo celular. Asimismo, mutaciones en genes que inducen apoptosis dan lugar a una división celular descontrolada y a la formación de tumores (1-3).

Un mecanismo propuesto para explicar la generación del cáncer, o carcinogénesis, involucra tres etapas denominadas: ***iniciación, promoción y progresión.***

La ***iniciación*** se lleva a cabo cuando la célula es afectada por algún agente genotóxico (químico, físico o biológico), ocasionando una mutación en los protooncogenes o bien en genes supresores de tumor (TSG). Los primeros son genes dominantes que codifican proteínas que participan como señales para favorecer la proliferación celular; los segundos son genes recesivos que codifican proteínas involucradas en las señales que regulan o inhiben la proliferación celular. Una mutación en cualquiera de estos genes favorece la proliferación celular descontrolada característica del cáncer.

La ***promoción*** consiste en la acumulación de mutaciones, generación tras generación, en las células tumorales, lo cual explica la heterogeneidad celular observada en los tumores. Cuando el mismo carcinógeno, u otro, sigue en contacto con la célula iniciada pueden producirse en ella un mayor número de mutaciones, gracias a las cuales, la célula transformada puede ganar autonomía e independizar su proliferación de las señales reguladoras del microambiente. La acumulación de estas células transformadas origina un tumor primario o carcinoma *in situ*.

La **progresión** implica la dispersión de las células del tumor hacia los tejidos adyacentes, fenómeno conocido como invasión. En esta etapa, las células transformadas manifiestan alteraciones en el patrón de expresión de las moléculas del complejo de adhesión celular E-cadherina-cateninas, el cual también es responsable en parte de mantener la arquitectura tisular y el fenotipo celular diferenciado. Las alteraciones en la expresión o función de las proteínas de este complejo, o de sus reguladores, provoca la pérdida de adhesión intercelular, alteraciones morfológicas e incremento en la motilidad celular. Aunado a esto, las células neoplásicas son capaces de sintetizar enzimas proteolíticas con las que degradan la membrana basal y entran a la circulación sanguínea y/o linfática, para distribuirse en otros órganos del cuerpo. Durante este proceso más del 99% de las células malignas mueren, las que sobreviven pasan a través de la capa de células endoteliales, que revisten el interior de la pared capilar, y penetran en la matriz extracelular adyacente. Posteriormente, la célula neoplásica puede llevar a cabo la extravasación en cualquier órgano, por distante que esté, y generar en él un tumor secundario. Este proceso se denomina metástasis y es una característica de los tumores malignos (3-7).

CÁNCER PULMONAR

Etiología

La causa exacta y patogénesis del cáncer pulmonar aún es desconocida; sin embargo, hay ciertos factores que han sido señalados como posibles agentes causales (8).

El tabaquismo es el principal factor asociado al cáncer pulmonar, el humo de cigarro es responsable del 85-90% de los casos. Las tres clases principales de carcinogénicos contenidos en el humo del cigarro son hidrocarburos policíclicos, nitrosaminas y aminas aromáticas.

El factor ocupacional más común relacionado con la incidencia de cáncer pulmonar es la exposición a asbestos; otro factor ocupacional y ambiental incluye la exposición a radón, arsénico, cromo, níquel y radiación ionizante. Por otro lado, enfermedades pulmonares no malignas preexistentes como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis pulmonar idiopática y tuberculosis también se asocian con un incremento en el riesgo de desarrollar cáncer pulmonar (8-10).

La epidemiología molecular ha puesto de manifiesto diferencias genéticas asociadas al riesgo de desarrollar cáncer pulmonar. La mayoría de los agentes químicos naturales y hechos por el hombre son metabolizados por enzimas detoxificadoras, principalmente de la familia del citocromo P-450; sin embargo, algunas veces estos compuestos son convertidos a productos con actividad citotóxica, mutagénica o carcinogénica. La presencia, en algunos individuos, de variantes génicas provoca que las proteínas sintetizadas presenten diferentes niveles de actividad, permitiendo que el tiempo de vida media de los carcinógenos se incremente y, con ésto la posibilidad de unirse covalentemente a proteínas y ácidos nucleicos, formando aductos e induciendo mutaciones, especialmente transversiones G-T, lo que conlleva a generar toxicidad celular. La permanencia de las mutaciones inducidas por agentes genotóxicos marca la iniciación del proceso denominado carcinogénesis (11) (Figura 1).

Patología

El cáncer pulmonar, a excepción de un pequeño porcentaje de casos, se origina de la mucosa bronquial por lo que es designado broncogénico. Cerca de la mitad de los tumores pulmonares son de localización central, ya que su origen es en las vías aéreas centrales; la otra mitad son periféricos, originándose en las vías aéreas pequeñas; sin embargo, es difícil hacer esta distinción en estadios avanzados (12).

Aún cuando hay diferentes tipos histológicos de cáncer pulmonar, es común hacer referencia a los cuatro tipos principales de carcinomas. Estos tipos histológicos muestran características patológicas distintivas, así como diferencias epidemiológicas, clínicas, radiográficas y pronósticas particulares. Tomando en cuenta estos aspectos, los carcinomas pulmonares se clasifican en dos grandes grupos: carcinoma de células pequeñas y carcinoma de células no pequeñas (13) (Figura 2).

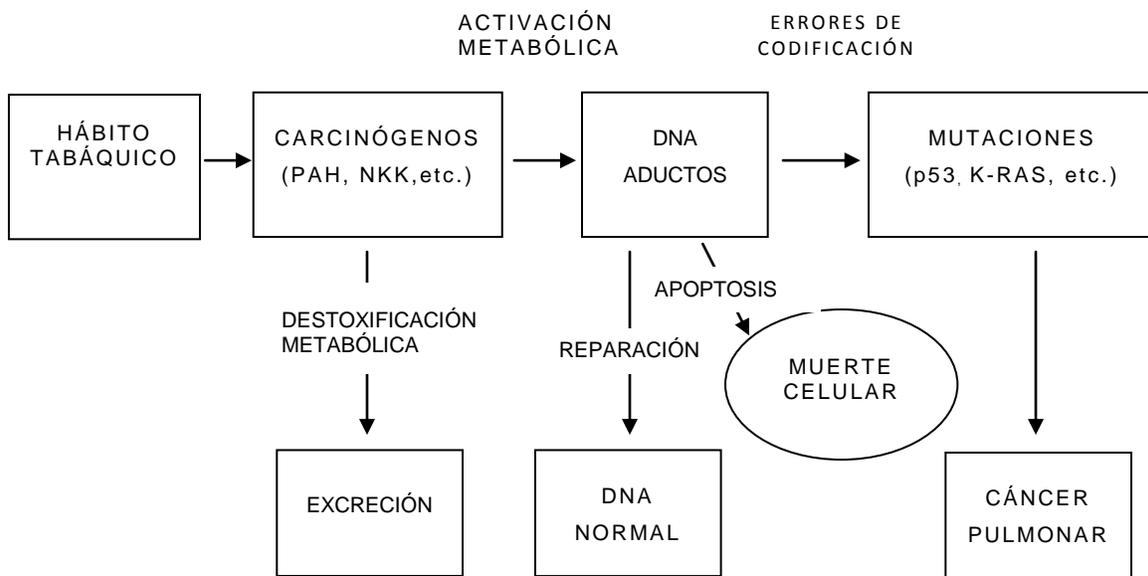


Figura 1. Hábito tabáquico, carcinógenos y patogénesis del cáncer pulmonar

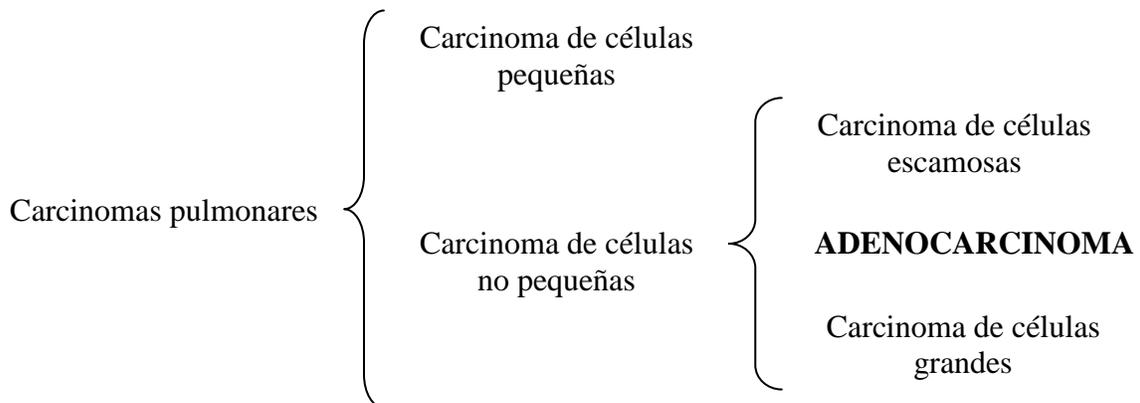


Figura 2. Clasificación histológica de los carcinomas pulmonares.

CARCINOMA DE CÉLULAS PEQUEÑAS

El carcinoma de células pequeñas representa aproximadamente el 18% de todos los tipos histológicos de carcinomas observados en pulmón. Tiene características neuroendocrinas y se ha propuesto que se origina de células programadas para diferenciarse en ese sentido.

Las células tumorales generalmente presentan morfología de células pequeñas, redondeadas u ovals, con poco o nada de citoplasma semejantes a los linfocitos, aunque su volumen es casi del doble. El tumor crece en cúmulos que no muestran organización glandular ni escamosa. Este tipo tumoral es el más agresivo de los tumores pulmonares y se caracteriza por su metástasis temprana y pobre pronóstico.

Muchos de estos tumores tienen una función endócrina consistente en la secreción de hormonas. Este carcinoma, al igual que el de células escamosas, está estrechamente relacionado con el tabaquismo activo y pasivo.

CARCINOMA DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS

Carcinoma de células escamosas (epidermoide)

El carcinoma de células escamosas o carcinoma epidermoide representa alrededor del 30% de todos los carcinomas pulmonares y es muy frecuente en individuos fumadores del género masculino. Patológicamente se caracteriza por la formación de puentes intercelulares, perlas de queratina y el desarrollo de islas grandes y bien definidas de células malignas. La mayor parte de estos carcinomas son de localización central y su metástasis es principalmente local, involucrando estructuras circundantes y ganglios linfáticos regionales. Dado que no hay epitelio escamoso en el pulmón, se considera que estos tumores se originan de cambios metaplásicos provocados por el hábito de fumar.

Carcinoma de células grandes

Este tipo histológico de carcinoma constituye alrededor del 9% de todos los carcinomas pulmonares. Es un carcinoma pobremente diferenciado y su diagnóstico histológico es por exclusión de adenocarcinomas, carcinomas de células escamosas o carcinoma de células pequeñas. Este tipo de tumor puede crecer extremadamente rápido hasta alcanzar un gran tamaño; su metástasis es temprana, principalmente a mediastino y cerebro.

ADENOCARCINOMA

Los adenocarcinomas representan cerca del 31% de todos los carcinomas pulmonares. Este tipo de tumor se origina de células progenitoras de bronquiolos, alveolares o de células productoras de mucina; tiene la misma incidencia que el carcinoma de células escamosas, siendo más frecuente en mujeres que en hombres. Un adenocarcinoma pulmonar es un tumor primario maligno en el cual se forman estructuras glandulares. Las principales variantes histológicas comprenden al adenocarcinoma ordinario, que se origina en bronquio, y el adenocarcinoma alveolar, que se origina en la pared alveolar o en los bronquiolos terminales. Un aspecto peculiar del adenocarcinoma de pulmón es su frecuente aparición en las regiones periféricas del parénquima pulmonar, lo cual tiene importantes consecuencias para la sintomatología, diagnóstico y terapia. La configuración glandular y la producción de mucina son las características que distinguen histológicamente al adenocarcinoma de otros tipos de carcinomas broncogénicos. La estructura de las glándulas puede ser típicamente acinar, con mucina llenando su interior, o bien papilar, que consiste en células cilíndricas o conoidales encajadas dentro de unas proyecciones irregulares en forma de dedo. La mucina puede estar localizada intra o extracelularmente. La metástasis de estos tumores a la pleura visceral y a órganos distantes es muy frecuente (12, 13). Para

establecer el diagnóstico de adenocarcinoma se debe satisfacer al menos uno de estos criterios histológicos. Dado que la mayoría de los crecimientos primarios aparecen lejos de las vías aéreas grandes, son raros los síntomas obstructivos y el tumor tiende a ser clínicamente silencioso. Cuando finalmente aparecen los síntomas, éstos incluyen: tos, hemoptisis, dolor torácico y pérdida de peso. Desde el punto de vista radiológico, la presentación más común es un nódulo pulmonar solitario periférico, cercano a la superficie pleural y a menudo con un tamaño inferior a los 4cm. El tercio restante de adenocarcinomas se origina en un bronquio central y puede producir los mismos signos y síntomas que se observan en otros cánceres de pulmón. La resección es posible en una elevada proporción de casos pero el índice de supervivencia a los 5 años es aún inferior al 15%, lo cual se debe a que las metástasis aparecen precozmente en el curso de la enfermedad, aunque no tanto como en el carcinoma de células pequeñas. El descubrimiento de ganglios linfáticos positivos en una muestra quirúrgica, indica un mal pronóstico para la supervivencia a largo plazo. Ni la radioterapia, ni los regímenes quimioterapéuticos han logrado aumentar el índice de supervivencia a 5 años, más allá de 5 al 15% de los pacientes afectados (14).

ANTÍGENOS TUMORALES

Los antígenos tumorales son formas aberrantes de proteínas expresadas como resultado del desarrollo de desregulaciones o ligeras alteraciones en las proteínas normales.

Estas proteínas se clasifican en:

- Antígenos específicos del tumor (del inglés tumor-specific antigen [TSA]), que se expresan exclusivamente en células tumorales y evocan fácilmente respuestas inmunitarias

- Antígenos característicos del tumor, o antígenos de tumor único, son TSA que se expresan en unos pocos tumores clonales
- Antígenos asociados al tumor (TAA) que se expresan tanto en células normales como tumorales, y que con frecuencia son incapaces de inducir respuesta inmunitaria por la autotolerancia
- Antígenos virales, son proteínas virales características de los virus oncogénicos que se expresan en los tumores

SISTEMA INMUNOLÓGICO

La principal función del sistema inmune es defender al organismo en contra de agentes infecciosos. La complejidad de esta función requiere de un repertorio de mecanismos para el reconocimiento y defensa del organismo en contra de estos patógenos.

Estos mecanismos son capaces de detectar estructuras que comparten estos patógenos y son distintas a las expresadas por el organismo, esta discriminación es esencial para permitir la eliminación del patógeno sin causar daño al organismo.

La acción del sistema inmune es posible gracias a la participación e interrelación de diferentes poblaciones celulares, entre las que se encuentran las células citotóxicas naturales (NK), células presentadoras de antígeno (APCs) y linfocitos T.

Los principales tipos celulares del sistema inmune son derivados de células progenitoras en la médula ósea; algunas de estas células maduras circulan en el torrente sanguíneo y se esparcen a través de los tejidos del cuerpo, aunque también se congregan en tejidos linfoides especializados. Para generar una respuesta inmune eficaz, los distintos tipos celulares cooperan entre sí, mediante interacciones directas (célula-célula), o bien mediante la secreción de algunas moléculas (15).

CÉLULAS NK

Las células NK forman parte del sistema inmune innato y se encuentran en la sangre periférica, bazo, médula ósea, así como en otros tejidos. Las células NK constituyen cerca del 15% de los linfocitos humanos de sangre periférica, no expresan receptor de células T (TCR) y no poseen la capacidad de desarrollar memoria inmunológica (16).

La célula NK cuenta con una variedad de receptores que inducen su función, estos receptores incluyen a la familia de receptores de citotoxicidad natural (NCR) NKp30 y NKp46; así como al receptor NKG2D y el receptor de IgG (CD16). El ligando de varios receptores incluyen moléculas sobreexpresadas por estrés celular o infección como por ejemplo MIC para el receptor NKG2D o la hemaglutinina viral para el receptor NKp46. La unión de los receptores activadores de la célula NK induce en la célula NK la citotoxicidad dependiente de gránulos (perforina-granzimas) (17), producción de citocinas (IFN- γ , IL-15 e IL-13) e inducción de moléculas coestimuladoras. Las células NK también pueden restringir su función a través de la familia de receptores de células NK tipo inmunoglobulinas (KIR), los cuales tras reconocer a la molécula de clase I del MHC inhibe la función de las células NK, estos receptores son esenciales para la discriminación entre las células normales de aquellas transformadas (18).

Células presentadoras de antígeno

Las células presentadoras de antígenos (APCs), en particular las células dendríticas (DCs) y macrófagos tienen un papel importante en la regulación y modulación de la respuesta inmune. Los macrófagos actúan como centinelas, detectando y capturando partículas extrañas, mediante fagocitosis o pinocitosis; sin embargo, su eficacia para activar a las células T *naive* es baja, comparada con la de las DCs, las cuales son APC profesionales capaces de modular la respuesta inmune adaptativa a través del reconocimiento de patógenos, directa

o indirectamente, censando perturbaciones en el microambiente como agentes infecciosos, daño celular o inflamación (19).

CÉLULAS DENDRÍTICAS (DCs)

Las DCs representan la población más importante de APCs en el sistema inmune, con la habilidad única de inducir no solo la respuesta inmune primaria en contra de los patógenos invasores, sino también la tolerancia inmunológica.

Las células dendríticas son células presentadoras de antígenos que estimulan a las células T *naive*, se encuentran distribuidas en todos los tejidos, poseen un linaje hematopoyético heterogéneo y sus subpoblaciones presentan características fenotípicas, morfológicas y fisiológicas diferenciales. Estas células son críticas para la inducción de la inmunidad mediada por células (20, 21).

Las DCs circulan en la sangre como precursores inmaduros antes de su migración a los tejidos periféricos donde capturan y procesan antígenos para posteriormente diferenciarse y activarse como APCs.

Una vez que el antígeno es endocitado por la APC, es procesado o fragmentado en péptidos dentro del proteasoma, posteriormente estos péptidos son reexpresados en la superficie celular unidos a moléculas del MHC. Cuando los péptidos se presentan unidos a moléculas de clase I, interaccionan con los linfocitos T citotóxicos (CTLs), los cuales se activan y proliferan; mientras que cuando se presentan unidos a moléculas de clase II, interaccionan con los linfocitos T cooperadoras (Th) induciendo su proliferación (22, 23).

LINFOCITOS T

Cerca del 70% de los linfocitos humanos son células T, entre sus funciones destacan: la regulación de la actividad de otras células del sistema inmune, la eliminación de células infectadas por patógenos, así como de células neoplásicas. Durante su maduración en el timo, las células T expresan una molécula de unión a antígenos llamada receptor de células T (TCR), este receptor se compone de dos

moléculas transmembranales α y β , a las cuales se asocia el complejo CD3. Estadios posteriores de maduración de los linfocitos expresan las moléculas CD4 o CD8. Las moléculas CD4 y CD8 son glicoproteínas cuyos ligandos naturales son las moléculas del MHC de clase II y clase I, respectivamente. La molécula CD4 pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Igs) y esta formada por una sola cadena. La molécula CD8 también pertenece a la superfamilia de las Igs, pero su estructura difiere considerablemente de la anterior, al estar formada por dos cadenas homólogas α y β que pueden formar heterodímeros o, en menor proporción, homodímeros (α/α) (24).

Las principales moléculas presentes en los linfocitos e implicadas en su activación son: CD2, CD45, CD28, CD4, CD8 y sus respectivos ligandos. Estas moléculas desempeñan un papel esencial en la transducción de señales y la activación o no de la célula T.

Linfocitos T CD4⁺ cooperadores (Th)

La principal función de las células T CD4⁺ es ayudar a otras células del sistema inmune, razón por la cual son llamadas células T cooperadoras (T helper [Th]).

Estas células se clasifican en varias subpoblaciones con base en el perfil de citocinas que producen: las células Th1 activan a macrófagos mediante la secreción de IFN- γ y así como la estimulación dependiente del contacto célula-célula para lo cual utilizan una variedad de moléculas coestimuladoras; las células Th2 producen IL-4, IL-5 e IL-13 y se especializan en facilitar la respuesta dependiente de anticuerpos, ayudan a la proliferación de células B mediante la producción de IL-4 y el contacto célula-célula dependiente de la unión de CD40 con su ligando (CD40L) aumentando de esta manera la defensa en contra de patógenos extracelulares (25, 26).

Linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs)

Los linfocitos citotóxicos (CTLs) son células del sistema inmune con capacidad para reconocer y eliminar células que muestran péptidos no propios asociados a moléculas clase I del MHC. Para efectuar este proceso, los CTLs expresan en su superficie el receptor de la célula T (TCR) y la molécula CD8. Luego de la interacción inicial es necesaria la co-estimulación celular apropiada, la cual involucra tanto a moléculas de superficie como factores solubles. Posteriormente, los CTLs inician un proceso de proliferación y diferenciación (activación) durante el cual modifican la expresión de sus moléculas de superficie (fenotipo) y producen proteínas citolíticas (perforina-granzimas), las cuales secreta cuando se presenta el contacto con la célula blanco, la sinapsis inmunológica da como resultado la muerte de la célula infectada o transformada, adicionalmente los CTLs producen IFN- γ y TNF (27, 28).

ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA INMUNE EN EL PULMÓN

Los pulmones pueden dividirse en dos compartimientos funcionales distintos: los conductos aéreos cuyo epitelio cilíndrico ciliado se encuentra recubierto de moco, y el parénquima pulmonar que comprende la pared alveolar donde se lleva a cabo el intercambio gaseoso. Distintas poblaciones de células del sistema inmune residen en áreas adyacentes, reflejando las diferentes funciones de los tejidos locales, así como los diferentes niveles de exposición a los antígenos aéreos a través del tracto respiratorio.

Conductos aéreos: El epitelio respiratorio de la mucosa esta compuesto de células ciliadas y células secretoras de moco que proveen un mecanismo para la limpieza mucociliar de los antígenos inhalados. La mucosa contiene una gran cantidad de células dendríticas y macrófagos. Las células dendríticas residentes en la mucosa del conducto aéreo son células especializadas en la

inmunovigilancia mediante la adquisición de antígenos, pero pierden la habilidad de una eficiente presentación de antígenos. Están posicionadas estratégicamente para la recolección de antígenos dentro y directamente en la superficie del epitelio (29, 30). Las células T también han sido encontradas en gran número en la mucosa intraepitelial y dentro de la lamina propia. Al igual que en el intestino, la mayoría de las células T expresan CD8, mientras que las células CD4 se encuentran más frecuentemente en la lámina propia. Ambas subpoblaciones mantienen un fenotipo de célula efectora y/o de memoria, el cual es definido por la presencia de CD45RO. En esta zona aérea también se encuentran mastocitos, células B y células plasmáticas (que producen principalmente IgA) (31).

Parénquima pulmonar: La división progresiva del bronquio da lugar a los bronquiolos que se extienden hasta los ductos alveolares y además se divide en los sacos alveolares finales. Los espacios alveolares se encuentran separados por capilares pulmonares que se encuentran en contacto con el espacio alveolar y con algunas células estromales. Las células del sistema inmune en el parénquima pulmonar se localizan en el epitelio alveolar, en los ductos aéreos terminales y en el parénquima subyacente.

Bajo condiciones normales, la población de leucocitos en el espacio alveolar esta compuesta principalmente por macrófagos alveolares (más del 90% de la población total), el resto de células son células dendríticas y células T. Por otro lado, el parénquima pulmonar contiene macrófagos, células dendríticas y células T, así como también células B y mastocitos localizados de manera dispersa. Adicionalmente, un gran número de células T son retenidas en el lecho vascular del parénquima pulmonar (31).

SISTEMA INMUNE Y CÁNCER

El sistema inmune ejerce tres funciones esenciales en contra de tumores: primero: el sistema inmune puede proteger al huésped de tumores inducidos por virus mediante la eliminación o supresión de las infecciones virales. Lo anterior se logra gracias a su capacidad para reconocer antígenos virales en tumores inducidos por virus oncogénicos; segundo: induce una rápida eliminación de patógenos y una pronta resolución de la inflamación, lo cual previene el establecimiento de un microambiente inflamatorio que conduzca a la tumorigénesis; tercero: el sistema inmune puede específicamente identificar y eliminar células tumorales que expresen antígenos específicos del tumor o moléculas inducidas por estrés celular (32).

En el tercer proceso se incluye a la inmunovigilancia, por medio de la cual el sistema inmune identifica a las células cancerosas y/o precancerosas y las elimina antes de que incrementen su masa tumoral y causen algún daño. Sin embargo, se ha observado que a pesar de la inmunovigilancia, los tumores pueden desarrollarse en presencia del sistema inmune, por lo que se consideró que el concepto de inmunoedición del tumor proporciona una mejor explicación sobre el papel que juega el sistema inmune en el desarrollo del tumor. El concepto de inmunoedición consta de tres fases denominadas: eliminación, equilibrio y escape (33).

Eliminación

La fase de eliminación es exactamente el mismo proceso inicial implicado en la teoría de la inmunovigilancia, donde el sistema inmune detecta y elimina a las células tumorales que se han desarrollado.

El proceso de eliminación incluye una respuesta inmune innata y adaptativa. Por parte de la respuesta inmune innata participan células NK, NKT y linfocitos T $\gamma\delta$. En general, estas células son activadas por citocinas inflamatorias liberadas por macrófagos y células estromales

que rodean al tumor o por las mismas células tumorales en crecimiento. Las citocinas liberadas reclutan más células del sistema inmune, que producen otras citocinas pro-inflamatorias como la IL-12 e IFN- γ . Las células NK reconocen y destruyen el tumor mediante la liberación de perforina-granzimas o por medio de Fas ligando (FasL) y TRAIL, lo que libera antígenos tumorales que inducen una respuesta inmune adaptativa (34-36). En la interacción entre células NK y células dendríticas (DC), las células NK promueven la maduración de las DC y su migración a los ganglios linfáticos (LN), lo que repercute en una mejor presentación de antígenos a las células T *naive* para favorecer la activación de los linfocitos T de ayuda así como linfocitos T citotóxicos (CTLs) (37). Los CTLs específicos en contra del tumor son reclutados al sitio del tumor primario, atacando y eliminando directamente a las células tumorales y produciendo a su vez IFN- γ .

Se han propuesto cuatro fases en el proceso de eliminación (38): 1) *Reconocimiento del tumor por parte de las células del sistema inmune innato y su limitada eliminación*. Cuando el tumor ha crecido de 2-3mm, requiere irrigación sanguínea y una remodelación del estroma, lo que induce señales de alarma y pro-inflamatorias, las cuales reclutan células del sistema inmune innato (células NK, DCs y macrófagos) en el sitio del tumor. Las células transformadas son reconocidas y eliminadas por las células NK, las cuales también producen IFN- γ (39). 2) *Maduración y migración de DCs e interacción con linfocitos T*. El IFN- γ liberado previamente por las células NK presenta efectos antiproliferativos y antiangiogénicos e induce apoptosis, por lo que ejerce una limitada citotoxicidad (40). La combinación de algunas citocinas derivadas de los tumores y de los tejidos circundantes no tumorales bloquea la formación de nuevos vasos sanguíneos, lo que contribuye a la muerte de más células tumorales. Las células tumorales apoptóticas o necróticas son

endocitadas por las DCs inmaduras residentes en el tejido, las cuales inician su migración a los LN, proceso en el cual las DCs maduran bajo condiciones pro-inflamatorias (41). 3) *Generación de linfocitos T tumor-específicos*. Las células NK y macrófagos reclutados en el sitio del tumor continúan produciendo IL-12 e IFN- γ , así como provocando la muerte de más células tumorales mediante la activación de mecanismos citotóxicos como la vía perforina-granzimas, TRAIL/TRAILR y el incremento de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (42). En los LN, las DC presentan los antígenos tumorales a las células T CD4⁺ *naive* que se activan y liberan citocinas tipo Th1 (IL-2, IFN- γ , etc.) que ayudan a la proliferación y maduración de linfocitos T citotóxicos (CD8⁺ [CTLs]) específicos en contra del tumor. 4) *Llegada de los CTLs al sitio del tumor y eliminación de las células tumorales*. Los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ llegan al sitio del tumor donde los CTLs efectoros reconocen y eliminan a las células que expresan los antígenos tumorales así como a aquellas células tumorales con inmunogenicidad reducida, esta acción es exacerbada por la secreción de IFN- γ (43).

En esta fase, la eliminación de las células tumorales puede ser COMPLETA cuando todas han sido eliminadas, o INCOMPLETA cuando solo una fracción variable de células tumorales ha sido eliminada. En el caso de la eliminación incompleta o parcial, la teoría de la inmuoedición considera una siguiente etapa en la cual se mantiene un estado temporal de equilibrio entre la respuesta inmune y el desarrollo del tumor.

Equilibrio.

La fase de equilibrio es el proceso más largo de la inmuoedición y puede transcurrir durante varios años. En esta fase se producen células tumorales capaces de resistir a las células efectoras del sistema inmune. Durante este período de selección darwiniana, muchas variantes de células tumorales son eliminadas pero surgen

nuevas variantes portando diferentes mutaciones que dan como resultado tumores más inestables que incrementan su resistencia al sistema inmune ya que muestran baja inmunogenicidad. Estas células pueden sobrevivir en un ambiente inmunocompetente el cual favorece el crecimiento de clonas con fenotipo no inmunogénico (44). En esta etapa de inmunoselección, los linfocitos T y el IFN- γ tienen un papel crítico.

Escape.

Durante la fase de escape, el sistema inmune ya no es capaz de reprimir el crecimiento del tumor, dando como resultado el crecimiento progresivo del mismo y su manifestación clínica (33).

MECANISMOS DE EVASIÓN TUMORAL

Los tumores presentan una serie de estrategias para evadir la respuesta inmune del huésped. Estas estrategias pueden ser parte del proceso de carcinogénesis o bien el resultado de la presión ejercida por parte del sistema inmune. Estas estrategias son favorecidas durante la inmunoselección.

Pérdida o disminución en la expresión de la molécula de clase I del MHC

El mecanismo de evasión tumoral mejor conocido y estudiado involucra la inhibición de la presentación de antígenos, así como un mal funcionamiento de la maquinaria involucrada en el procesamiento y presentación de antígenos, particularmente por la vía de las moléculas de clase I del MHC.

Algunos mecanismos que pueden provocar la baja o nula expresión de las moléculas de clase I incluyen: mutaciones del gene de la β 2 microglobulina, la baja expresión de las subunidades del complejo multicatalítico del proteasoma (LMP-2 y LMP-7), defectos en los péptidos transportadores TAP-1 y TAP-2, etc. (45-47). Lo anterior,

conlleva a que células con actividad citotóxica (CTLs) no reconozcan a la célula blanco.

Factores solubles derivados del tumor

Durante la inmunoedición, se ejerce una presión selectiva en el microambiente que favorece la progresión tumoral. Una variedad de factores solubles contribuyen al surgimiento de un microambiente inmunosupresivo local y regional, estos factores incluyen al factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), IL-10, TGF- β , prostaglandina E2, fosfatidilserina, Fas, FasL y MICA solubles. Estos factores, presentes en el sitio del tumor primario, pueden extender sus efectos inmunosupresivos a los LN locales, así como al bazo, promoviendo la invasión y metástasis del tumor (48-51).

El VEGF recluta DCs inmaduras y macrófagos, las cuales causan que las células T se supriman a través de la producción de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) y arginasa 1 (52, 53). El Fas y MICA solubles inhiben la eliminación del tumor mediada por FasL y NKG2D, respectivamente (54). La fosfatidilserina induce una respuesta anti-inflamatoria por parte de los macrófagos, ya que favorece la liberación de mediadores anti-inflamatorios como la IL-10 y el TGF- β , los cuales inhiben la respuesta por parte de las DCs y linfocitos T (55).

Señalización defectuosa de los receptores de muerte

Dos receptores de muerte que juegan un papel importante en la inmunovigilancia en contra del desarrollo del tumor son Fas y el receptor para TRAIL (TRAIL-R), los cuales son expresados en las células tumorales (56). Los receptores de muerte tienen secuencias citoplasmáticas llamadas dominios de muerte que son esenciales para la transducción de señales apoptóticas mediante la vía de las caspasas. Una vez unidos el receptor de muerte Fas con su ligando, el dominio de muerte asociado a Fas (FADD) se une a la caspasa 8 que se autoactiva y desencadena la cascada de las caspasas. Una

señalización defectuosa en estos receptores de muerte es un mecanismo que puede contribuir a la supervivencia y proliferación de las células tumorales.

La baja expresión o pérdida de Fas en los tumores también puede contribuir a su resistencia a la apoptosis. El inhibidor celular de la caspasa 8, la proteína inhibitoria FLICE (cFLIP) es expresada en varios tumores. En estos casos, cFLIP puede proporcionar una resistencia a la apoptosis mediada por receptor y llevada a cabo por las células T *in vivo* (57, 58).

Además de la señalización defectuosa de los receptores de muerte, los tumores también pueden bloquear la citotoxicidad mediada por CTLs vía perforina-granzimas, mediante la sobreexpresión de PI-9 (también conocido como SPI-6), proteína inhibidora de las serin-proteasas que inactiva a la granzima B (59).

En las células tumorales, puede haber defectos en múltiples sitios de las vías de los receptores de muerte que favorecen el escape tumoral.

Alteraciones en la transducción de señales de las células efectoras

La transducción de señales a través del complejo TCR/CD3 es importante para iniciar una respuesta inmune eficaz, así como para la polarización a una respuesta de tipo Th1. Cualquier alteración en este complejo produce cambios en la vía de señalización para la activación de las células T; la cadena ζ del CD3 forma parte del complejo TCR/CD3, el cual funciona como transductor de señales, una vez que se une al antígeno.

Alteraciones en moléculas importantes para el reconocimiento y activación de las células del sistema inmune pueden causar la pérdida del reconocimiento de antígenos tumorales. En este sentido, se ha reportado la baja expresión o pérdida de la cadena ζ del CD3 en los linfocitos infiltrantes del tumor (TILs) que ha sido atribuida a la

presencia de citocinas inmunosupresoras inducidas por los mismos linfocitos o por las células tumorales. Además, los defectos en la expresión de la cadena ζ del complejo TCR/CD3 se han asociado con una baja expresión de algunas proteínas anti-apoptóticas (Bcl-xL y Bcl-2). Se ha reportado que la cadena ζ es sustrato de la caspasa 3, por lo que las células tumorales pueden desencadenar una apoptosis dependiente de caspasas en linfocitos T fenómeno que se ha designado como “contraataque tumoral” (60-62).

Ignorancia inmunológica y tolerancia en tumores

Una respuesta inmune específica del tumor es regulada por los niveles de antígeno, el estado de maduración de las APC, la capacidad de activación de los linfocitos T, el perfil de citocinas presente en el microambiente tumoral así como por la capacidad de los linfocitos T citotóxicos de producir moléculas presentes en los gránulos citotóxicos. Muchos tumores sólidos expresan antígenos específicos del tumor, los cuales pueden ser blancos de células T efectoras. Los tumores están rodeados por células no tumorales, tales como DCs inmaduras, fibroblastos, células endoteliales y componentes de la matriz extracelular (ECM). En este contexto, los fibroblastos y células endoteliales compiten con las DCs fagocitando cuerpos apoptóticos; además, varios antígenos tumorales disminuyen su expresión durante la progresión del tumor. Las células estromales incrementan la presión del fluido intersticial en el tumor, dando como resultado el escape tumoral al ataque de las células efectoras. Niveles suficientes de antígenos tumorales pueden producir una respuesta inmune; sin embargo, las DCs inmaduras que infiltran el tumor, pueden inhibir la activación de los linfocitos T dando como resultado la tolerancia inmunológica (63-65). Adicionalmente, las DCs inmaduras estimulan a una población de linfocitos llamada linfocitos T reguladores ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) que bloquean, mediante la

producción de factores solubles inhibitorios o por contacto directo, la activación de los linfocitos T.

ANTECEDENTES

CÁNCER

En el año 2001, el cáncer pulmonar ocasionó más de un millón de muertes en el mundo. A pesar de que el vínculo entre el tabaquismo y el desarrollo del cáncer pulmonar está bien establecido, el hábito tabáquico continúa incrementándose por lo que el número de casos con cáncer continúa en aumento, especialmente en el género femenino. En mujeres de 15 a 64 años, el cáncer pulmonar es actualmente una de las principales causas de muerte y en hombres esta enfermedad permanece entre las causas de muerte más comunes por cáncer.

En décadas recientes, diversos autores dan cuenta de un incremento en la frecuencia de cáncer pulmonar en México. Lazcano y colaboradores (66) han reportado un crecimiento importante en la mortalidad observada por cáncer pulmonar entre 1979 y 1993. A través de dicho análisis han considerado que para el año 2010 habrá más de 10,000 muertes por esta causa.

En hospitales especializados como el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), el número de casos atendidos por esta patología va en aumento, observándose que el tipo histopatológico predominante es el adenocarcinoma.

Los trabajos realizados no han ofrecido una adecuada dilucidación de las causas que explicarían la tendencia creciente del cáncer pulmonar en México, dichas causas podrían englobarse en dos grupos: en el primero se encontrarían aquellas no asociadas con un incremento real en el riesgo de desarrollar la enfermedad, como serían su mejor diagnóstico; en cuanto al segundo grupo se encontrarían las causas asociadas a un aumento en el riesgo de desarrollar cáncer pulmonar, como serían una mayor prevalencia, o

intensidad del tabaquismo, o una mayor exposición a otros agentes etiológicos de la enfermedad (67, 68).

LINFOCITOS INFILTRANTES DEL TUMOR (TILs)

La respuesta inmune del huésped en contra de una neoplasia se manifiesta mediante una infiltración de células inmunes; la principal población de células que infiltra la mayoría de los tumores sólidos muestra apariencia linfoide, caracterizada morfológica y fenotípicamente, motivo por el cual se les denominó linfocitos infiltrantes del tumor (TILs). Sin embargo, también es posible detectar otros tipos celulares tales como: macrófagos, células NK, células dendríticas (DCs) y células B, aunque en menor cantidad (69).

Estudios inmunohistoquímicos en una amplia variedad de tumores (cervico uterino, colorectal, de esófago, mama, ovario, renal) han caracterizado a los TILs y correlacionado con el pronóstico y sobrevida de los pacientes. Estos estudios han permitido proponer mecanismos de control tumoral por parte del huésped así como considerar opciones que permitan desarrollar una inmunoterapia efectiva (70-76).

Desafortunadamente existen discrepancias entre los resultados obtenidos por los distintos grupos, algunos pacientes oncológicos con niveles altos de TILs presentan un incremento en la sobrevida, pero no es en todos los casos. Se han propuesto una variedad de explicaciones, incluyendo la naturaleza del infiltrado, la antigenicidad del tumor, la ineficacia de la presentación de antígenos, y la participación de mediadores solubles presentes en el microambiente tumoral.

La etiología de un tumor puede proporcionar una expectativa sobre la influencia del infiltrado tumoral, lo que sugiere que el huésped puede tener múltiples estrategias para fallar o no en el control de los tumores.

El principal mecanismo por el cual los TILs controlan el crecimiento tumoral es por la vía de mecanismos citotóxicos; los TILs también pueden producir citocinas como el IFN- α que potencia la respuesta inmune. En este escenario una infiltración del tumor con un alto número de células T CD8⁺ es lo más deseable. Las células T CD4⁺ también pueden ser requeridas ya que las células CD8⁺ necesitan de una función óptima de las células CD4⁺. La relación CD4/CD8 debe de ser apropiada para el funcionamiento de los TILs; esta relación puede variar dependiendo del tipo de cáncer (70).

Una de las principales funciones de los linfocitos T CD4⁺ esta relacionada con la producción de mediadores solubles (citocinas); estas citocinas proveen a los linfocitos T CD8⁺ de factores de crecimiento que requieren para su activación durante la respuesta inmune.

Las células dendríticas (DCs) son las células presentadoras de antígeno (APCs) más potentes en el cuerpo. Estas células son eficientes para estimular a células T *naive* ya que expresan en su superficie una gran cantidad de moléculas coestimuladoras como B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), y CD40. La ausencia de altos niveles de moléculas coestimuladoras en la APC, provoca que las células T *naive* se vuelvan anérgicas después del primer contacto con el antígeno, lo que conlleva a que el huésped no responda en contra de un antígeno particular. Las DCs también tienen la capacidad de presentar antígenos exógenos a los linfocitos T CD8⁺, y son críticas iniciando una respuesta en contra de algún antígeno tumoral, ya que los tumores expresan niveles bajos de la molécula del MHC clase I en su superficie (77, 78).

TILs EN CÁNCER

Recientemente en cáncer epitelial de ovario (EOC) se ha reportado que la presencia de linfocitos T (CD3⁺) en la región intratumoral se

asocia con una mayor sobrevida (79), y la principal subpoblación relacionada con un buen pronóstico comprende a los linfocitos T CD8⁺ (80), también se ha reportado que un incremento en la infiltración de células T CD3⁺CD4⁺ con propiedades inmunosupresivas (células T reguladoras) reducen la sobrevida (81).

El cáncer de mama es la neoplasia más común en las mujeres, y son varios los estudios que han documentado que ese tipo de cáncer es infiltrado por una población heterogénea de células del sistema inmune, compuesta por diferentes proporciones de células T, células B, células NK y macrófagos (82, 83).

No hay una conclusión definitiva sobre la eficacia del sistema inmune dependiente de las células T, o sobre la correlación entre la extensión y el tipo de infiltración y en la progresión del tumor en el carcinoma de mama. Estas relaciones pueden ser consideradas para tener una visión sobre el papel que juega el sistema inmune en la patogénesis y la progresión de este tipo de cáncer. Estudios previos en cáncer de mama han mostrado que la función de los TILs es disminuida por citocinas inhibitorias, incrementando la actividad de las células T reguladoras, alteraciones en las moléculas del MHC en el tumor, y la expresión aberrante de FasL, entre otros (84).

Los estudios en cáncer de próstata muestran la presencia de células T CD3⁺, incluyendo a las subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺; sin embargo, es difícil estudiar la función de estas células por varias razones: los tumores de próstata son relativamente pequeños, la cirugía es el único método para eliminarlo en estadios tempranos; el aislamiento de TILs es problemático debido a que el infiltrado crece dentro de la glándula prostática; y sobre todo una baja cantidad de TILs es vista en cáncer de próstata. Los estudios que buscan la relación entre la infiltración y la sobrevida muestran controversia en sus datos. Vesalainen *et al.* (85) reporta que los tumores con una alta densidad de linfocitos infiltrantes esta asociado con una mayor sobrevida de

los pacientes con respecto a aquellos con una menor cantidad o ausencia de infiltrado. En contraste, Irani *et al.* (86) reporta que un incremento en el infiltrado inflamatorio dentro del tumor es asociado con un incremento en el riesgo de recurrencia. Recientemente, McArdle *et al.* (87) reporta que la presencia de células T CD4⁺ en el infiltrado es asociado a una baja sobrevida en pacientes con cáncer de próstata.

En cáncer colorectal, el tejido tumoral es infiltrado por linfocitos T CD4⁺ y/o CD8⁺, las células B se encuentran usualmente en los nódulos linfáticos, que ocasionalmente se observan. El infiltrado de linfocitos casi siempre es acompañado por una infiltración de neutrofilos y macrófagos (88, 89). La infiltración principalmente es observada en la región del margen invasivo del tumor, Jass *et al.* (90) encontró que esta infiltración es un factor independiente de la sobrevida y Ropponen *et al.* (91) confirmó el concepto del impacto pronóstico de los TILs en cáncer colorectal. Diederichsen *et al.* (92), mediante citometría de flujo, observó una relación baja de linfocitos T CD4/CD8 y esta relación es un factor pronóstico independiente a la sobrevida, pero a través de este estudio no se puede discriminar la localización precisa *in situ* de los TILs. Menon *et al.* (93) ha reportado un decremento en la expresión de la molécula de clase I del MHC, particularmente la expresión de HLA-A, en células tumorales, la expresión de esta molécula en la superficie celular es un requisito para que las células T reconozcan a las células blanco.

El mismo grupo también confirmó que la pérdida de la molécula de clase I del MHC en las células tumorales es asociada con un alto número de células T intraepiteliales, pero no con la presencia de células NK CD56⁺.

Sandel *et al.* (94) describe que la presencia de DCs en el margen invasivo del tumor es asociado con una menor sobrevida, de igual manera Databayev *et al.* (95) describe células positivas para

moléculas de clase II del MHC, las cuales están distribuidas en el estroma del tumor y los casos con abundantes moléculas de clase II del MHC son asociadas a una corta sobrevida; sin embargo, mencionan que es posible que estas células no sean DCs, ya que las DCs no son muy abundantes en el estroma tumoral (96).

En cáncer de pulmón ha sido estudiado el infiltrado inflamatorio, pero son pocos los estudios que hacen una distinción entre los tipos de células presentes. Johnson *et al.* (97) encontró que una infiltración con abundantes células T (CD3⁺) y células dendríticas (S100⁺) es asociada con una mayor sobrevida post-operativa, Takeo *et al.* (98) reportó que además de los TILs, los macrófagos asociados al tumor (TAM) son células inmunes importantes debido a su capacidad citostática y su presencia es asociada a un buen pronóstico, Takanami *et al.* (99) por su parte encontró que la presencia de células NK era un factor relacionado con un buen pronóstico. Mori *et al.* (100) confirmó que el grado de infiltración de células T CD8⁺ depende del grado de diferenciación del carcinoma pulmonar, encontrando una mayor cantidad de células T CD8⁺ en aquellos tumores pobremente diferenciados y esta infiltración es independiente del pronóstico. Keer *et al.* (101) en su reporte demuestra que las células T CD8⁺ se asocian con una mayor sobrevida sugiriendo un mecanismo de defensa activo por parte del paciente con carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC). Riemann *et al.* (102) muestra que la presencia de células B en pacientes con NSCLC es el marcador más significativo en el pronóstico. Hiraoka *et al.* (103) observó que la infiltración con linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ puede suprimir la progresión del tumor, y que la presencia de ambas poblaciones esta relacionada con un buen pronóstico, mientras que la presencia de una sola población es un factor independiente en el pronóstico.

Por otra parte, existen reportes sobre los métodos de evaluación de la respuesta inmune, estos métodos son muy variados, de ahí la dificultad en la comparación de los resultados; algunos miden la respuesta inmune usando células de sangre periférica (104, 105), otros miden la actividad *in vitro* de células inmunes extraídas de pacientes con cáncer pulmonar (106). Yoshino *et al.* (107, 108) reportó que la función de los TILs en cáncer pulmonar puede estar disminuida debido a la ausencia o disminución de IL-12 o bien por factores derivados de las células tumorales, también detectó un factor con actividad inmunosupresiva en líneas celulares de carcinoma de células escamosas de pulmón, Huang *et al.* (109) demostró que las células provenientes de carcinomas pulmonares de células no pequeñas (NSCLC) producen citocinas tipo 2 *in situ* e *in vitro*.

Li *et al.* (110) estudio la expresión de RNA mensajero (mRNA) de citocinas de tipo 1 y tipo 2 en derrame pleural y tejido tumoral de pacientes diagnosticados con NSCLC, encontrando que la expresión del mRNA para citocinas de tipo 2 (IL-4, IL-10, TGF- α y TGF- β 1) fue mucho mayor que la expresión para citocinas de tipo 1 (IL-2, IL-12, IL-18 e IFN- γ).

ANTECEDENTES DIRECTOS

Nuestro grupo ha estudiado las proporciones de células T CD8⁺ *naive*, de memoria y efectoras en sangre periférica y en derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar. Las distintas subpoblaciones fueron identificadas usando combinaciones de distintos anticuerpos. Mediante citometría de flujo, se encontró que las subpoblaciones de linfocitos T CD8⁺ presentes en sangre periférica no presentaban diferencias significativas entre sujetos sanos y pacientes; en contraste, una alta proporción de células con fenotipo de memoria (CD45RA⁻CD45RO⁺CD27⁺CD28⁺) y una baja

proporción de células con fenotipo efector ($CD45RA^+CD45RO^-CD27^-CD28^-$) fueron encontradas en el derrame pleural, ésto con respecto a la sangre periférica. Se observó también que de las células T $CD8^+$ con fenotipo efector un bajo porcentaje expresaba perforina comparada con las células que expresaban Granzima A; adicionalmente, un alto porcentaje de células T $CD8^+$ con fenotipo *naïve* expresaba Fas. Estos estudios sugieren que: el proceso de diferenciación de las células $CD8^+$ es bloqueado, y una expresión de Fas en las células $CD8^+$ puede desencadenar la apoptosis de las células *naïve*; lo anterior puede contribuir a una inadecuada respuesta inmune antitumoral en los pacientes con adenocarcinoma pulmonar (111).

JUSTIFICACIÓN

El cáncer pulmonar representa el 12.3% de todos los cánceres del mundo, presenta una alta incidencia y la más alta tasa de mortalidad; dentro de los carcinomas pulmonares, el adenocarcinoma representa del 30 al 40% y su metástasis a otros órganos es frecuente. A pesar de los grandes esfuerzos hechos por buscar nuevas estrategias terapéuticas que ayuden a la erradicación del cáncer pulmonar, los tratamientos son deficientes y el promedio de supervivencia de 5 años es menor al 15%. Lo anterior podría deberse en parte, a la incompleta comprensión de las interacciones que se establecen entre el sistema inmune y el cáncer. Por ello es necesario estudiar diversos aspectos biológicos en torno a la relación entre el cáncer pulmonar y la respuesta inmune. Los trabajos publicados indican un punto de vista bastante simple: la infiltración del tumor, principalmente con linfocitos es asociada con un resultado positivo y buen pronóstico; pero también se requiere de una función óptima del sistema inmune, definida por la presencia de potentes APCs, citocinas inmunoestimuladoras y una óptima expresión de las moléculas de superficie por parte de las células tumorales y los TILs. En este contexto el conocimiento de la presencia de estas células inflamatorias puede ser complementada por la descripción de: 1) el estatus citotóxico de estas células, definido por la presencia de las moléculas contenidas en los gránulos citotóxicos o receptores de muerte, 2) la expresión de moléculas del MHC en las células tumorales y 3) la localización de estas células inflamatorias en el estroma tumoral o el interior del tumor.

Por otra parte el derrame pleural es considerado como la etapa final en la evolución de un adenocarcinoma, por lo que es importante dilucidar si en los linfocitos infiltrantes de un tumor primario existen las mismas variaciones observadas en las células provenientes de derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma.

HIPÓTESIS

En el derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar se observa una disminución del número de linfocitos T citotóxicos (CTLs), así como una baja proporción de CTLs granzima⁺ y/o perforina⁺; por lo tanto, en los adenocarcinomas pulmonares primarios, los TILs presentarán alteraciones asociadas al grado de diferenciación del tumor.

OBJETIVO

Observar si las alteraciones en los linfocitos T del derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar se presentan en los TILs del tumor primario.

Objetivos particulares

- Cuantificar células dendríticas (S100⁺), células NK (CD57⁺) y linfocitos T totales (CD3⁺) y citotóxicos (CD8⁺) en el infiltrado inflamatorio de adenocarcinomas pulmonares
- Determinar la localización intratumoral (I.T.) o peritumoral (P.T.) de las poblaciones antes mencionadas en el tumor primario
- Determinar la proporción de los linfocitos T presentes en el infiltrado inflamatorio de adenocarcinomas pulmonares con fenotipo de memoria
- Evaluar el potencial citocida de las células NK y CTLs mediante la presencia de GMP-17/TIA-1, granzima-B y perforina

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se estudiaron adenocarcinomas pulmonares provenientes de autopsias de pacientes obtenidos entre 1987 y 2000, proporcionados por el Departamento de Patología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Los adenocarcinomas pulmonares fueron clasificados como bien diferenciados o pobremente diferenciados con base a la morfología de las células tumorales, tomando como bien diferenciados aquellos tumores donde se las células neoplásicas mantenían la función o una estructura semejante a la de las células de origen; mientras que los pobremente diferenciados fueron aquellos tumores donde las células neoplásicas no mantenían organización alguna. La clasificación histológica se basó en los criterios de la Organización Mundial de la Salud (112). Se seleccionaron 10 adenocarcinomas bien diferenciados y 10 pobremente diferenciados, de los cuales se obtuvieron cortes histológicos seriados.

Anticuerpos

Se emplearon los siguientes anticuerpos monoclonales (mAbs) para identificar las distintas poblaciones celulares, así como los marcadores de activación (Tabla 1): mAb dirigido en contra de la proteína S-100 (Cell Marque USA) presente en Células Dendríticas (DCs); mAb dirigido a la cadena épsilon (ϵ) del complejo CD3 (Biocare Medical CA) presente en linfocitos T; mAb dirigido en contra del antígeno CD57 (Chemicon International) presente en células asesinas naturales (NK); Ab policlonal dirigido en contra de la molécula CD8 (abcam Cambridge) presente en la superficie celular de los linfocitos T citotóxicos; mAb dirigido en contra del antígeno leucocitario de superficie CD45RO presente en la subpoblación de linfocitos T con fenotipo de memoria (Chemicon); mAb dirigido en

contra de la serin-proteasa granzima B humana presente en las células NK y linfocitos T citotóxicos activados; mAb dirigido en contra del antígeno GMP-17/TIA-1 (T-cell intracytoplasmic antigen) (Biocare Medical) presente en células con potencial citocida; mAb dirigido en contra de la perforina (Chemicon), una proteína formadora de poros citolíticos, marcador específico de células citotóxicas efectoras. Para conocer la concentración óptima de los anticuerpos primarios a utilizar, se utilizaron distintas diluciones las cuales variaron desde 1:25 hasta 1:100, las diluciones empleadas en cada caso se indican en la Tabla 1.

Tabla 1: Anticuerpos primarios utilizados en la técnica de inmunohistoquímica.

Anticuerpo	Reactividad	Clona	Dilución
anti-S-100	Células Dendríticas (DCs)	-	1:60
anti-CD3	Linfocitos T	PS1	1:50
anti-CD8	Linfocitos T citotóxicos (CTLs)	-	1:60
anti-CD57	Células NK	NK-1	1:25
anti-CD45RO	Células T de memoria	UCHL1	1:50
anti-GrB	Moléculas citotóxicas	GrB-7	1:60
anti-GMP-17 /TIA-1		TIA-1	1:25
anti-Perforina		δG9	1:30

Como anticuerpo secundario se empleó el Ab biotinilado (Dako Corp) dirigido a la fracción Fc de los Abs primarios. Para seleccionar la dilución óptima del Ab secundario dirigido en contra de los mAb

primarios se probaron distintas diluciones, las cuales variaron desde 1:100 hasta 1:1000. La dilución óptima fue 1:250.

Como sistema amplificador se utilizó el complejo Estreptoavidina-Biotina-Peroxidasa (ABCComplex) en una dilución 1:150, como recomienda el fabricante (Dako).

Como sistema revelador se usó peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como sustrato y tetrahidrocloruro de 3,3 diaminobenzidina como cromógeno; en caso de las tinciones dobles se empleó además el kit "Vector VIP substrate kit for peroxidase" (Vector Laboratories USA).

Protocolo de tinción inmunohistoquímica

Los cortes fueron seleccionados tomando en cuenta el infiltrado que presentaron, tras lo cual se procedió a desparafinarlos en un horno a 65°C durante 30 min, posteriormente fueron hidratados mediante baños de xilol, xilol-alcohol, alcohol etílico en diferentes grados y finalmente se mantuvieron en agua destilada.

La reactivación de epítopes se realizó en un buffer de citratos (0.1M, pH=6) durante 15 min a temperatura de ebullición y se dejó enfriar en buffer de citratos. La peroxidasa endógena se bloqueó con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% (v/v) en alcohol metílico durante 30 min. El pegado inespecífico se bloqueó incubando con PBS conteniendo suero de cerdo al 2% y Tritón X-100 al 0.5% (v/v) durante 30 min. Los cortes histológicos fueron incubados con 80 μ l de cada uno de los Abs primarios (anti-CD45RO, anti-GrB, anti-GMP-17/TIA-1, anti-Perforina, anti-S100 o anti-CD57) a excepción de los anticuerpos anti-CD3 y anti CD-8, durante toda la noche. Una vez concluida la incubación, los cortes se lavaron con una solución de PBS conteniendo Tween 20 al 0.1%, durante 5 min y posteriormente con PBS. Los cortes se incubaron con 80 μ l del Ab secundario biotinilado en cámara húmeda a 32°C durante 1 h; después fueron lavados como se mencionó anteriormente. Las laminillas fueron incubadas con el ABCComplex, a una dilución de (1:150) en cámara

húmeda a 32°C por 30 min, tras lo cual los cortes fueron lavados nuevamente. La tinción se reveló con una solución de peróxido de hidrógeno al 0.012% y tetrahidrocloruro de 3,3'diaminobenzidina (DAB) (0.4 µg/mL) en PBS durante 10 min, la reacción fue detenida con agua corriente.

Los cortes donde se realizó una tinción simple fueron contrateñidos con hematoxilina de Mayer virando el color con cloruro de litio, los cortes se deshidrataron usando alcohol etílico y xilol y se montaron para su observación con una resina sintética (Entelan. Merck).

Las laminillas que contenían los anticuerpos anti-S100 o anti-CD57, después de realizar el revelado, fueron sometidas a un segundo ciclo de tinción inmunohistoquímica (doble tinción), para lo cual se realizó nuevamente la reactivación de epítipo como se indicó anteriormente, se bloqueó el pegado inespecífico y, posteriormente a cada laminilla se adicionó 80 µl del Ab primario anti-CD 3 o anti-CD8 y se realizó el procedimiento descrito anteriormente. La reacción se reveló mediante el kit Vector VIP que generó una tinción de color púrpura en la población linfoide, la reacción se detuvo con agua corriente.

Las muestras fueron contrateñidas y montadas como se mencionó anteriormente. La doble tinción permitió contextualizar la localización espacial de dos poblaciones celulares distintas, células NK y linfocitos T o DC y linfocitos T (Figura 10 C, D, E, F; Figura 11 A, B, C, D).

Como control negativo de tinción se utilizó suero de cerdo en lugar del primer anticuerpo. Como controles positivos se utilizaron amígdalas de sujetos con algún proceso inflamatorio.

Clasificación y evaluación del infiltrado inflamatorio

Las células presentes en el infiltrado inflamatorio de los adenocarcinomas pulmonares bien y pobremente diferenciados fueron clasificadas dependiendo de su localización en dos grupos.

Linfocitos intratumorales (I.T.): células inflamatorias dentro de los nidos de células tumorales o en contacto estrecho con la región tumoral

Linfocitos peritumorales (P.T.): células inflamatorias presentes en el estroma, intersticio o en la región circundante al tumor (Figura 10 A, B).

De cada laminilla con tinción doble o simple se tomaron micrografías en un aumento de 40X (magnificación total X 400) con un microscopio óptico Axioscope (Carl Zeiss). En cada tinción se fotografiaron 10 campos con un área de 0.037 mm^2 en la cual se cuantificaron las distintas poblaciones celulares estudiadas tomando en cuenta la marca y la morfología de las células. Se observaron un total de 1800 campos provenientes de las tinciones. Los conteos celulares fueron hechos por tres observadores independientes. Zonas tisulares con necrosis o muy vascularizadas fueron descartadas de la evaluación. El resultado se expresó en células/ mm^2 y se indicó el valor promedio \pm error estándar.

Análisis estadístico

A los datos obtenidos de los conteos celulares se realizó una prueba de normalidad; ya que los datos se comportaban de manera normal se procedió a utilizar la prueba de *t* de Student de dos colas para comparar dos grupos. También se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para comparaciones entre los grupos analizados. Se consideró como diferencia significativa una $p < 0.05$.

RESULTADOS

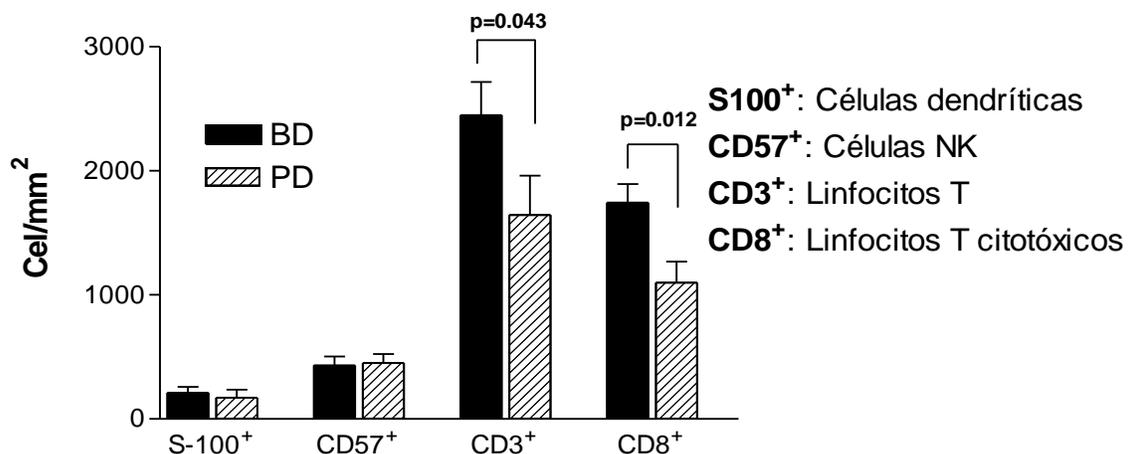
Determinación de las proporciones de las poblaciones celulares en los adenocarcinomas pulmonares

La densidad tisular de las DCs en los adenocarcinomas bien y pobremente diferenciados fue de 210 y 170 cel/mm², respectivamente; estos datos no mostraron diferencia significativa.

Con respecto a las células NK (CD57⁺) la densidad tisular en los adenocarcinomas bien y pobremente diferenciados fue de 430 y 450 cel/mm², respectivamente. La densidad de esta población fue el doble con respecto a la densidad de las DCs.

Los linfocitos T mostraron la mayor densidad celular, de manera particular en los adenocarcinomas pobremente diferenciados estas células mostraron una disminución significativa al compararse con los bien diferenciados. En relación a los CTLs, se observó una disminución de su densidad al compararse con los linfocitos T y ésta siguió una tendencia similar de acuerdo al grado de diferenciación tumoral. Los resultados se ilustran en la siguiente figura.

Figura 3: Densidad celular de poblaciones infiltrantes en adenocarcinomas pulmonares bien y pobremente diferenciados



Distribución regional (intratumoral o peritumoral) de las poblaciones celulares estudiadas

En los adenocarcinomas bien y pobremente diferenciados, las DCs se localizaron principalmente en la región I.T. y solo en los tumores bien diferenciados se observó una diferencia significativa al compararla con la región P.T. No existieron diferencias significativas al comparar los datos obtenidos de la región I.T. o P.T. en los dos grados de diferenciación del tumor. Ver figura 4.

En los adenocarcinomas bien y pobremente diferenciados, la densidad de las células NK en la región I.T. fue muy similar y solo en los tumores bien diferenciados se observó una diferencia significativa al compararla con la región P.T. En la región P.T. de los adenocarcinomas pobremente diferenciados se observó un incremento no significativo de las células NK al compararse con esta misma región en los adenocarcinomas bien diferenciados. Ver figura 5

Figura 4: Distribución regional de las Células Dendríticas

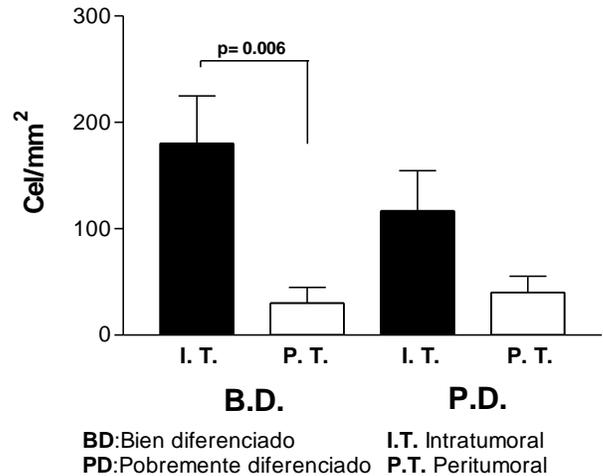
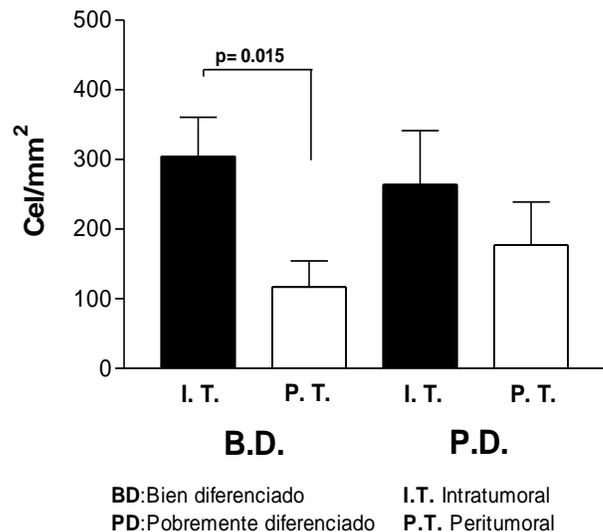


Figura 5: Distribución regional de las Células NK



En los adenocarcinomas bien diferenciados la mayor densidad de linfocitos T se observó en la región I.T. encontrándose una diferencia significativa con respecto a la densidad en la región P.T. En contraste, en los adenocarcinomas pobremente diferenciados la densidad de los linfocitos T se incrementó de manera no significativa en la región P.T. Además, en la región I.T se observó una disminución significativa de la densidad de los linfocitos T al compararse con la misma región de los adenocarcinomas bien diferenciados. Ver figura 6.

En el caso de los CTLs CD8⁺, la distribución en los adenocarcinomas fue muy similar a la de los linfocitos T CD3⁺. De igual forma en los adenocarcinomas bien diferenciados se observó un incremento significativo de los CTLs en la región I.T. con respecto a la P.T. En los tumores pobremente diferenciados, la densidad de los CTLs fue similar en ambas regiones. Al comparar la región I.T. de los adenocarcinomas bien y pobremente

Figura 6: Distribución regional de los Linfocitos T

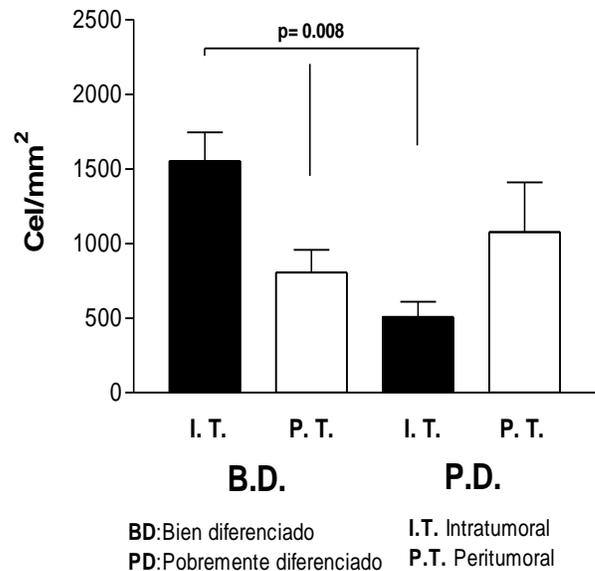
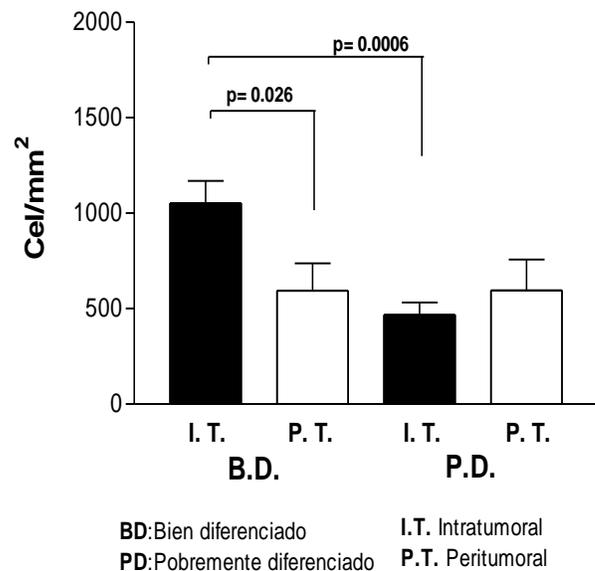


Figura 7: Distribución regional de los Linfocito T citotóxicos

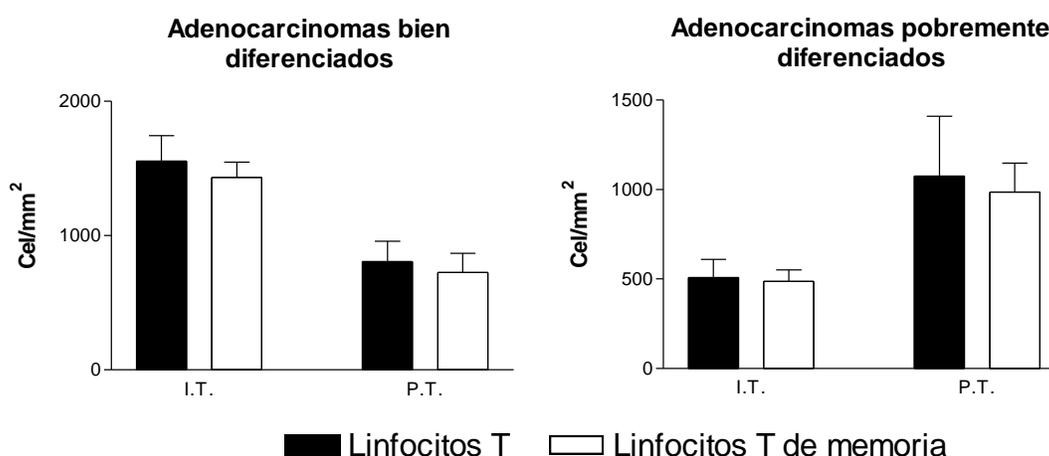


diferenciados se observó una reducción significativa de la densidad de los CTLs en estos últimos. Ver figura 7.

Proporción de linfocitos T con fenotipo de memoria

Una vez conocida la cantidad de linfocitos T presentes en el infiltrado inflamatorio, se procedió a determinar que proporción de éstos mostraba un fenotipo de memoria (CD45RO⁺). Los datos obtenidos indican que prácticamente el 100% de los linfocitos T en el infiltrado inflamatorio de adenocarcinomas bien y pobremente diferenciados presentaban dicho fenotipo en la región intratumoral como en la peritumoral. Ver figura 8.

Figura 8: Proporción de linfocitos T con fenotipo de memoria.



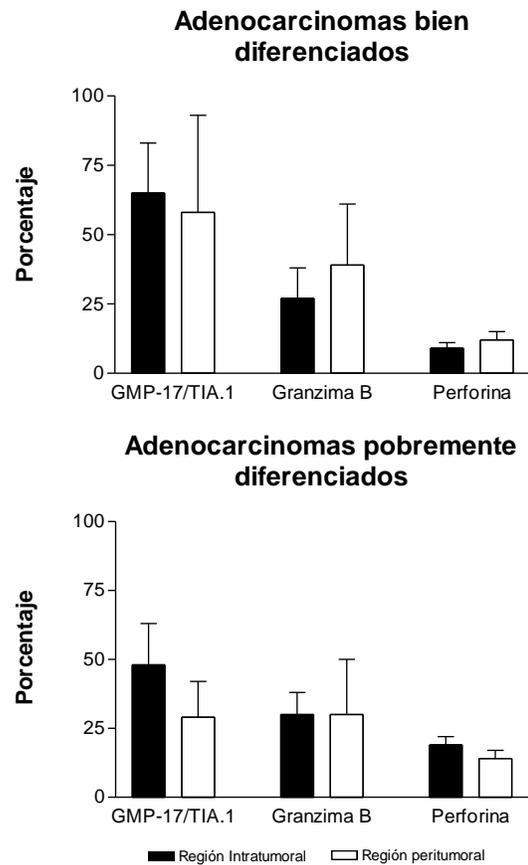
Determinación de proporciones de células citotóxicas con potencial citocida

Dado que un papel importante de las células citotóxicas del sistema inmune en contra del tumor es ejercer una actividad citolítica, se detectó su potencial citocida mediante la tinción de las moléculas GMP-17/TIA-1, granzima B (GrB) y perforina (Figura 12) presentes en gránulos asociados con actividad citotóxica.

Tras cuantificar las células capaces de llevar a cabo una función citotóxica (CTLs y células NK), la región I.T. de los adenocarcinomas bien diferenciados mostró la mayor densidad de estas células. La densidad de las células citotóxicas en la región P.T. fue similar a la observada en ambas regiones de los tumores pobremente diferenciados.

Por otra parte se determinó la proporción de células citotóxicas positivas para cada una de las moléculas estudiadas con respecto a la densidad total de células citotóxicas; observando una disminución en cuanto al número y proporción de células positivas para cada uno de los marcadores. Aproximadamente el 50% de las células citotóxicas fue positivo para el marcador GMP-17/TIA-1. Mientras que aproximadamente el 70% de las células citotóxicas no contenía granzima B y un porcentaje mayor ($\approx 80\%$) carecía de perforina. Ver figura 9.

Figura 9: Porcentaje de células citotóxicas positivas para moléculas asociadas al potencial citotóxica



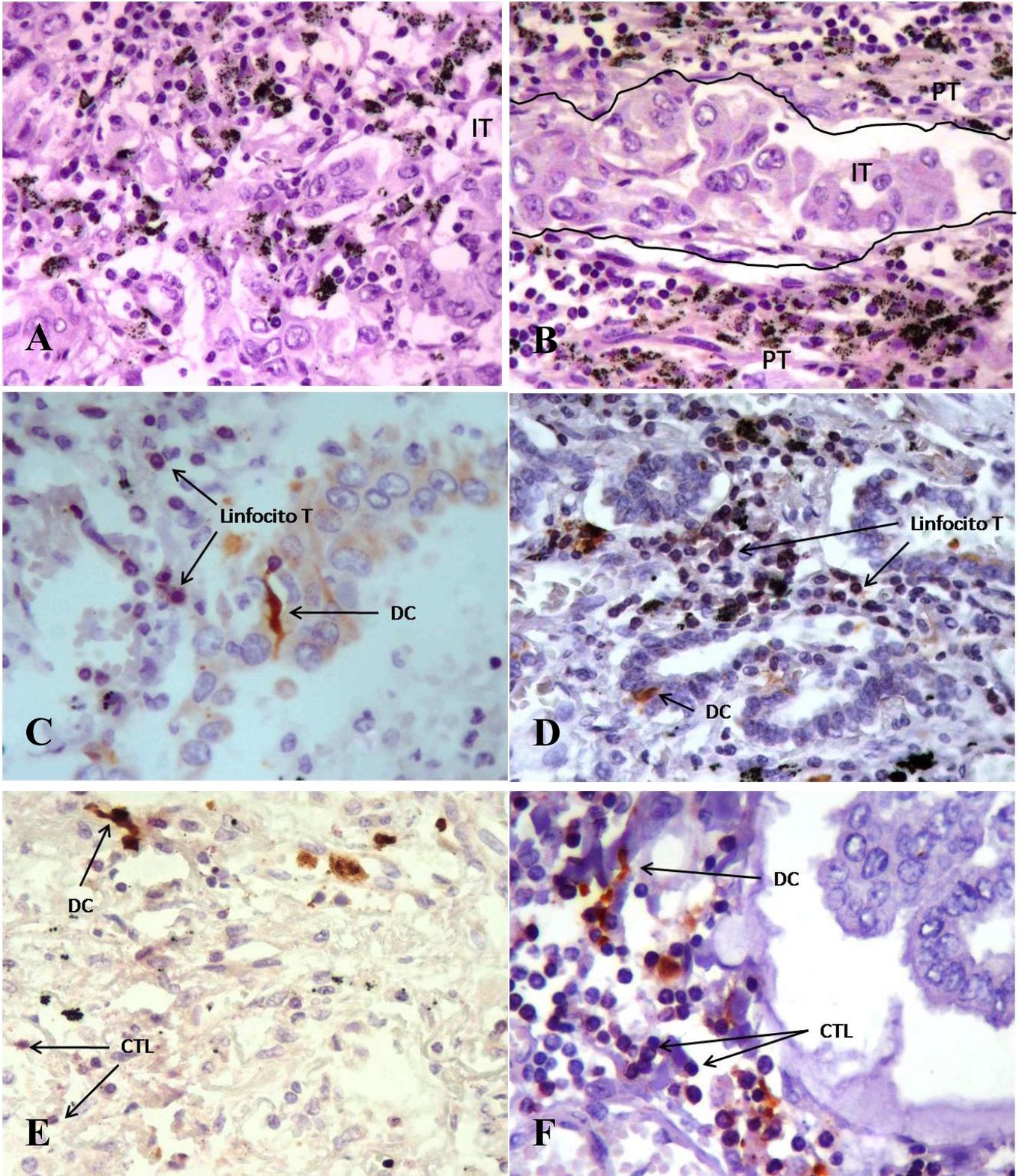


Figura 10: A. TINCIÓN DE HEMAOTOXILINA Y EOSINA (H&E) se muestra la región intratumoral de un adenocarcinoma pobremente diferenciado; B. Tinción H&E se muestra la región intratumoral y peritumoral de un adenocarcinoma pobremente diferenciado. C, D. DOBLE TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA: células dendríticas (DC) color café y linfocitos T totales color morado. C se muestran células teñidas en la región IT de un adenocarcinoma pobremente diferenciado. D se muestran células teñidas en la región PT de un adenocarcinoma bien diferenciado. E, F. DOBLE TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA: células dendríticas (DC) color café y linfocitos T citotóxicos (CTLs) color morado. E se muestran células teñidas en la región IT de un adenocarcinoma pobremente diferenciado. F se muestran células teñidas en la región PT de un adenocarcinoma bien diferenciado. Aumento total X400.

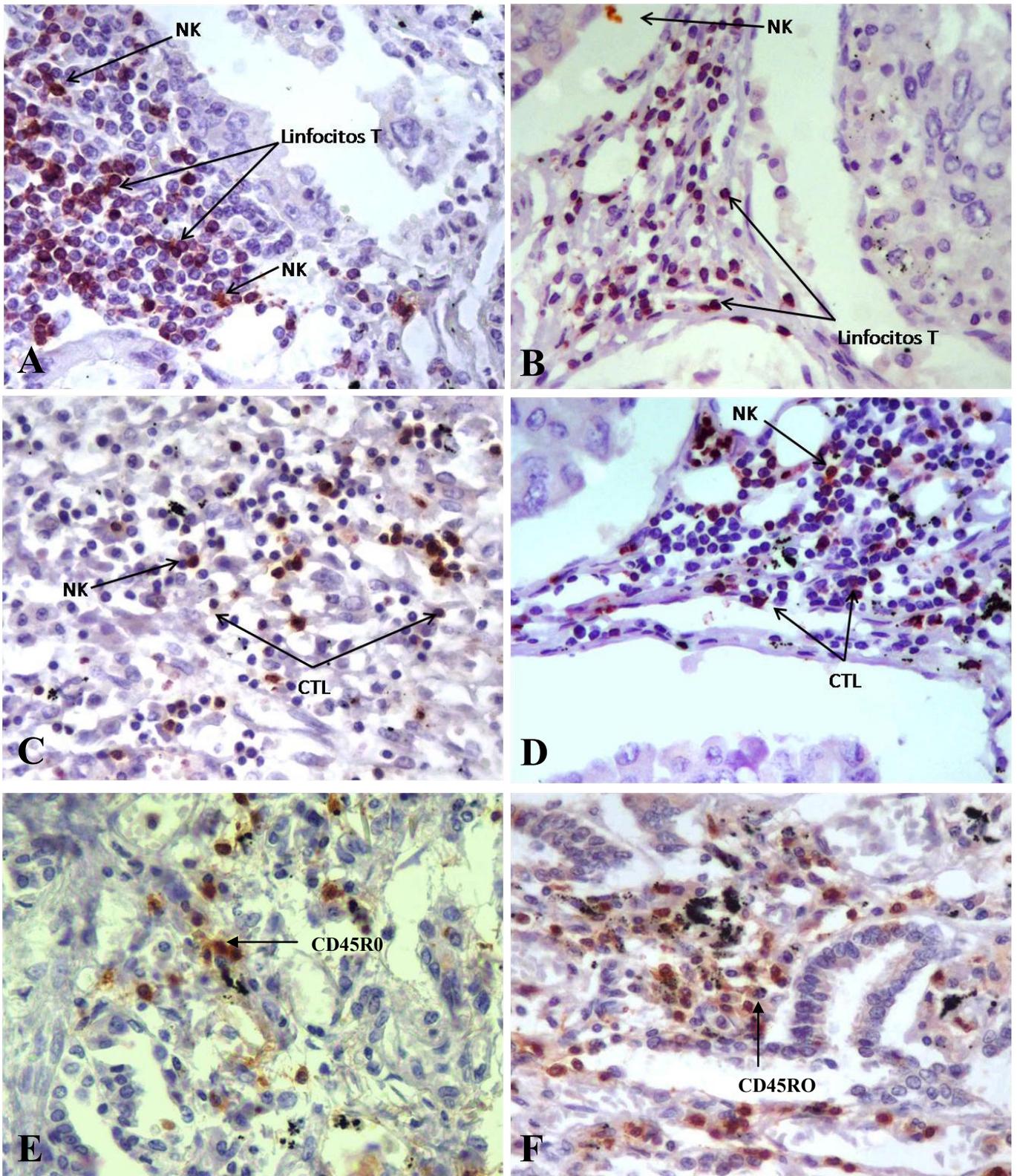


Figura 11: A, B. DOBLE TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA: células NK color café y linfocitos T totales color morado. A células teñidas en la región PT de un adenocarcinoma pobremente diferenciado. B células teñidas en la región PT de un adenocarcinoma bien diferenciado. C, D. DOBLE TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA: células NK color café y linfocitos T citotóxicos (CTLs) color morado. C células teñidas en la región IT de un adenocarcinoma pobremente diferenciado. D células teñidas en la región PT de un adenocarcinoma bien diferenciado. E, F. TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DEL MARCADOR PARA EL FENOTIPO DE MEMORIA CD45RO, color café. E células teñidas en la región IT de un adenocarcinoma pobremente diferenciado. F células teñidas en la región peritumoral de un adenocarcinoma bien diferenciado. Aumento total X400.

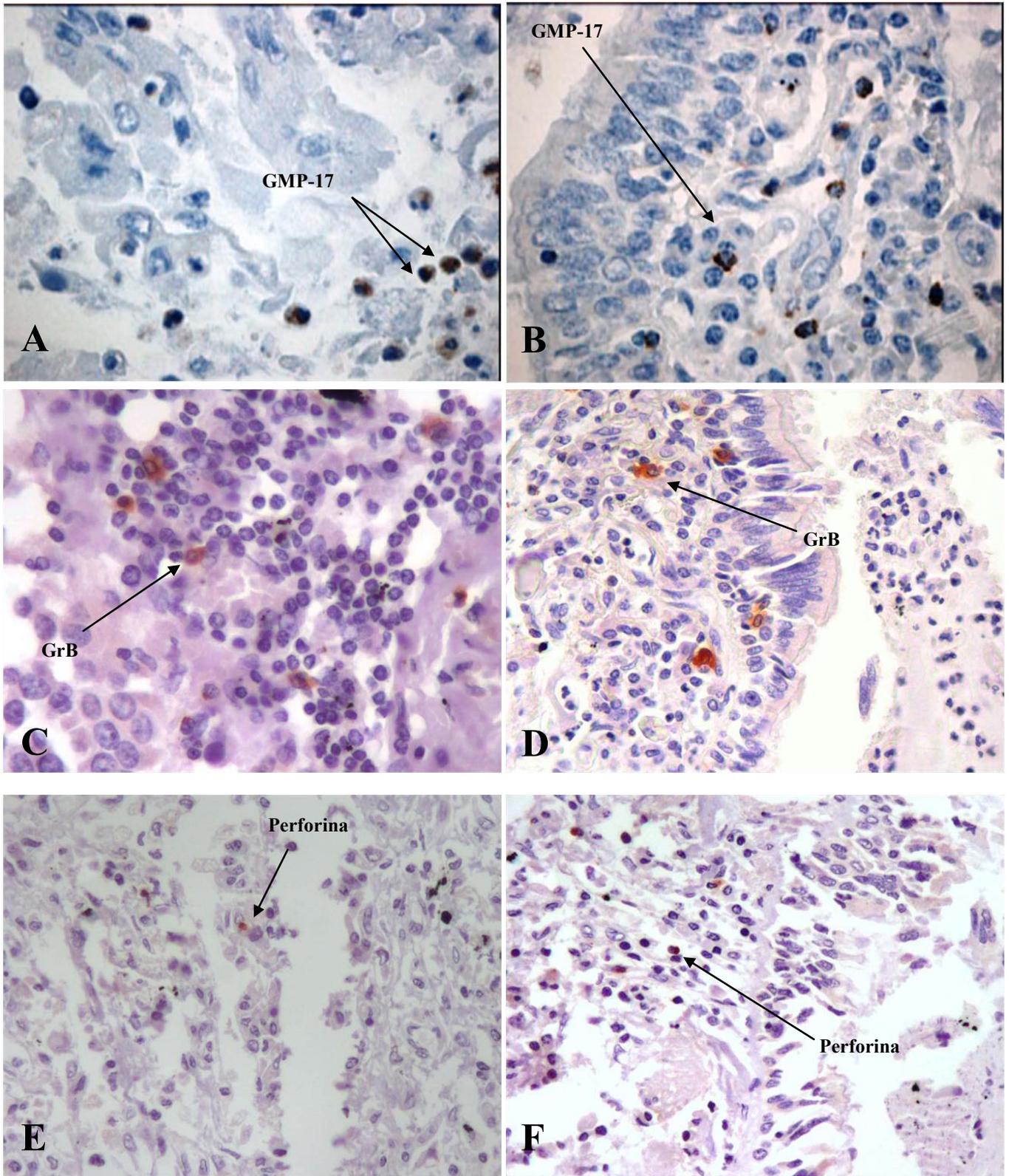


Figura 12: TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE MOLÉCULAS CITOTÓXICAS PRESENTES EN CÉLULAS NK Y CTLs. A, B. GMP-17/TIA-1 color café. A células teñidas en la región IT de un adenocarcinoma pobremente diferenciado. B células teñidas en la región IT de un adenocarcinoma bien diferenciado. C, D. Granzima B (GrB) color café. C células teñidas en la región IT de un adenocarcinoma pobremente diferenciado. D células teñidas en la región IT de un adenocarcinoma bien diferenciado. E, F. Perforina color café. E células teñidas en la región IT de un adenocarcinoma pobremente diferenciado. F células teñidas en la región IT de un adenocarcinoma bien diferenciado. Aumento total X400.

DISCUSIÓN

En varios tipos de cáncer, los linfocitos infiltrantes del tumor (TILs) han sido estudiados a lo largo de 30 años y han sido considerados como una manifestación del sistema inmune en contra de células malignas así como un factor de buen pronóstico, por lo cual representan una gran esperanza en el tratamiento en contra del cáncer. La mayoría de los trabajos publicados muestran, hasta cierto punto, una visión simplista debido a que asocian la presencia de los TILs con mejor pronóstico y mayor supervivencia del paciente con cáncer (113).

En cáncer pulmonar los reportes estudian el infiltrado inflamatorio, y asociaciones entre los TILs con el tamaño del tumor, grado de diferenciación y el impacto en la supervivencia del paciente (97, 100). Dichos estudios son difíciles de comparar ya que algunos expresan sus resultados de manera cualitativa (infiltración alta, baja o moderada) o semicuantitativa (porcentaje de células). Además, los reportes donde analizan de manera más estricta la cantidad de células infiltrantes son pocos y estudian una población en particular. En nuestro caso, cuantificamos cuatro distintas poblaciones celulares presentes en el infiltrado inflamatorio de los adenocarcinomas pulmonares, realizando un análisis de la densidad celular de cada población de manera más estricta y obteniendo un resultado más realista ya que el valor obtenido es independiente de la variación de otra(s) población(es) inmunocelular(es). Aunado a esto, determinamos la distribución de las células inflamatorias en las regiones intratumoral (I.T.) y peritumoral (P.T.).

Densidad de células inflamatorias.

En relación a las células NK, algunos autores mencionan que las células tumorales disminuyen la expresión de moléculas de clase I del MHC como consecuencia de cambios en la expresión de varios

genes así como la presión ejercida por el sistema inmune (47, 114-116). En cáncer de colón (89) se ha observado una correlación inversa entre la proporción de células NK y la expresión de moléculas del HLA, debido a ésto esperaríamos encontrar un incremento en la cantidad de células NK en los tumores pobremente diferenciados, ya que se ha reportado que los carcinomas pulmonares de células no pequeñas en este estadio de diferenciación reducen la expresión de moléculas de clase I (115), lo cual no sucedió. Si nuestros resultados obtenidos para las células NK fuesen presentados en porcentaje (con relación al total de los linfocitos), se observaría un incremento en el porcentaje de células NK en los adenocarcinomas pobremente diferenciados (10% en adenocarcinomas bien diferenciados y 20% en los pobremente diferenciados), dado que disminuyó la población de linfocitos T (ver posteriormente). Sin embargo, al determinar y comparar la densidad de células NK en el infiltrado inflamatorio de los adenocarcinomas bien y pobremente diferenciados no se encontró diferencia y las células NK se encontraron principalmente en la región I.T. Son necesarios más estudios en cáncer pulmonar y en otros tipos de cáncer para corroborar la certeza de nuestros resultados, a fin de definir la participación de las células NK en los tumores desdiferenciados

Con base a nuestros resultados, la población de DCs es la de más baja densidad en el infiltrado inflamatorio. Su presencia, principalmente en la región I.T., sugiere que se trata de DCs inmaduras cuya función es recolectar antígenos tumorales o cuerpos apoptóticos presentes, mientras que la baja cantidad de estas células en la zona P.T. puede deberse a la migración de éstas células a los ganglios linfáticos (LN) para activar a los linfocitos T e inducir una eficiente respuesta inmune en contra de las células tumorales(21), aunque también pueden llevar a cabo otras funciones que se mencionarán más adelante.

Los linfocitos T fueron la población celular con mayor densidad en el infiltrado inflamatorio. Esta población mayoritariamente estaba formada por la subpoblación de linfocitos T citotóxicos. Los resultados obtenidos en este estudio son difíciles de comparar con el bajo número de reportes previos ya que en ellos se reporta el grado de infiltración celular (abundancia o no del infiltrado), o su proporción con respecto a las células tumorales, etc. Mori *et al.* (100) reporta que los adenocarcinomas pobremente diferenciados presenta una mayor infiltración de linfocitos T CD8⁺ que los bien diferenciados; estos resultados son contrarios a los resultados obtenidos por nosotros. En cambio los resultados obtenidos por Trojan (117) concuerdan con nuestros datos. Otra aportación de este estudio es observar una relación directa entre el grado de diferenciación del tumor con la densidad celular en la región I.T. Este hecho pudiera deberse a que los adenocarcinomas pulmonares bien diferenciados liberan factores quimiotácticos que favorecen su infiltración por los linfocitos T, mientras que en los pobremente diferenciados dichos factores se encuentran disminuidos. Otra posibilidad es que los adenocarcinomas pobremente diferenciados induzcan la muerte de los linfocitos T. Se ha reportado que las células tumorales sobreexpresan la molécula FasL la cual induce la apoptosis de los linfocitos T que expresan Fas (contraataque tumoral). Nuestro grupo ha reportado previamente que los linfocitos T expresan de manera temprana Fas, aunque las células tumorales obtenidas de pacientes así como líneas celulares de cáncer pulmonar no expresan FasL, lo que hace poco probable que el contraataque tumoral sea el responsable de la disminución en la densidad de los linfocitos T observada en los adenocarcinomas pobremente diferenciados.

Otra posibilidad de la baja densidad de los linfocitos T en el infiltrado de los adenocarcinomas pobremente diferenciados puede deberse a la muerte celular inducida por activación (AIDC), proceso en el que

los linfocitos T activados de manera crónica coexpresan Fas y FasL induciendo la apoptosis en las células vecinas o en si mismas.

Riechert *et al.* (118) observó en pacientes con carcinoma oral de células escamosas que los TILs presentes en el infiltrado inflamatorio con una baja cantidad de DCs, se asociaban con una disminución en la expresión de la cadena ζ del complejo CD3. Otros grupos han reportado alteraciones de la cadena zeta de linfocitos T infiltrantes de otros tipos de tumores (60). Nuestro grupo reportó previamente que los linfocitos T de pacientes con adenocarcinoma disminuyen la expresión de la cadena ϵ del CD3 (119). Estas alteraciones conducen a defectos en la señalización intracelular de los linfocitos T asociadas a una proliferación disminuida; lo anterior pudiera estar sucediendo en los adenocarcinomas pobremente diferenciados y explica la pobre infiltración por linfocitos T en estos tumores.

Ely *et al.* (120) y Kohlmeier *et al.* (121) han reportado el fenotipo de memoria en los linfocitos T presentes en pulmón sano y su presencia se debe a que el pulmón se encuentra expuesto constantemente a antígenos del exterior debido al intercambio gaseoso que se lleva a cabo en ese órgano. Los linfocitos T infiltrantes de los adenocarcinomas pulmonares estudiados presentan este mismo fenotipo que puede deberse a una estimulación crónica por parte tumor. Este mismo fenotipo se ha encontrado en infecciones crónicas debidas a diversos agentes virales (122).

Potencial citocida de las células citotóxicas

Las células citotóxicas (CTL y NK) son capaces de llevar a cabo su función efectora en contra del tumor mediante la vía mediada por receptor (Fas/FasL) o bien la vía mediada por gránulos (perforina-granzimas). La perforina es una proteína necesaria para la formación de poros en la membrana de las células blanco, una vez hecho este poro, las granzimas (granzimas B en nuestro caso) entran y

desencadenan una serie de eventos que dan como resultado la apoptosis de la célula blanco (123); por otra parte la molécula GMP-17/TIA-1 contribuye a la formación de uniones entre la célula efectora y la célula blanco, seguido de la regulación de canales iónicos requeridos para que se lleve a cabo la función citotóxica (124).

Varios autores han reportado que las células tumorales, así como células estromales activadas por las células tumorales liberan factores solubles que tienen la capacidad de inhibir la función de las células inflamatorias presentes en el microambiente (109, 125). Se ha reportado que el TGF-beta y la IL-10 afectan la expresión de las granzimas. Estos factores son liberados por los tumores pulmonares (125) así como por células T reguladoras, que se ha reportado infiltran a los tumores pulmonares (126, 127).

Ya que los linfocitos T citotóxicos de memoria coexpresan granzima y perforina, la disminución gradual de estas moléculas en los TILs del adenocarcinoma pulmonar sugiere que este tumor altera la producción de estas moléculas en etapas tempranas de su desarrollo. Lo anterior permitirá al tumor evadir la acción de la maquinaria citocida por parte de las células citotóxicas.

CONCLUSIONES

- El infiltrado celular del adenocarcinoma pulmonar esta constituido principalmente por linfocitos T y linfocitos T citotóxicos, la densidad de las células NK y de las células dendríticas es baja
- Las células inflamatorias estudiadas se encuentran en la región intratumoral; en esta región, la densidad de células NK y células dendríticas es similar en los tumores bien y pobremente diferenciados
- Los adenocarcinomas pulmonares pobremente diferenciados se asocian con una disminución en la densidad intratumoral de los linfocitos T que infiltran el tumor con respecto a los adenocarcinomas bien diferenciados
- La mayor proporción de linfocitos T presentes en el infiltrado inflamatorio de los adenocarcinomas pulmonares corresponde al fenotipo de memoria
- En los adenocarcinomas pulmonares, independientemente del grado de diferenciación, se observa una disminución en el porcentaje de células citotóxicas que presentan moléculas citocidas
- Los linfocitos T presentes en el infiltrado inflamatorio del adenocarcinoma pulmonar pobremente diferenciado presentan alteraciones similares a las observadas en linfocitos T del derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar

BIBLIOGRAFÍA

1. Travis, W.D., Travis, L.B., and Devesa, S.S. 1995. Lung cancer. *Cancer* 75:191-202.
2. Richardson, G.E., and Johnson, B.E. 1993. The biology of lung cancer. *Semin Oncol* 20:105-127.
3. Davila, D.G., and Williams, D.E. 1993. The etiology of lung cancer. *Mayo Clin Proc* 68:170-182.
4. Weinberg, R.A. 1996. How cancer arises. *Sci Am* 275:62-70.
5. Baret, J. Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environ Health Perspect* 100:9-20.
6. Pitot, H.C., and Dragan, Y.P. 1991. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *Faseb J* 5:2280-2286.
7. Ruoslahti, E. 1996. How cancer spreads. *Sci Am* 275:72-77.
8. Sekido, Y., Fong, K.M., and Minna, J.D. 2003. Molecular genetics of lung cancer. *Annu Rev Med* 54:73-87.
9. Zöchbauer-Müller, S. 2002. Molecular pathogenesis of lung cancer. *Annu. Rev. Physiol* 64:682-708.
10. Gazdar, A.F., and Minna, J.D. 1997. Cigarettes, sex, and lung adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 89:1563-1565.
11. Minna, J.D., Roth, J.A., and Gazdar, A.F. 2002. Focus on lung cancer. *Cancer Cell* 1:49-52.
12. Farzan, S. 1985. *A concise handbook of respiratory diseases.* : A Prentice Hall Company Reston, Virginia.
13. Hollings N, S.P. 2001. Diagnostic imaging of lung cancer. *Eur Respir Mon* 17:120-150.
14. Robbins, S.L. 1984. *Pathologic basis of disease.*: W.B. Saunders Company, Philadelphia. Third edition. Cap 16 pp.750-755.
15. Chaplin, D.D. 2006. 1. Overview of the human immune response. *J Allergy Clin Immunol* 117:S430-435.
16. William, H.D. 2004. Natural Killer Cells: Biology and clinical use in cancer therapy. *Cel Mol Immunol* 1:12-21.
17. Russell, J.H., and Ley, T.J. 2002. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 20:323-370.
18. Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S.H., Zitvogel, L., and Vivier, E. 2005. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* 106:2252-2258.
19. Janeway, C.A., Jr., and Medzhitov, R. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.
20. Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767-811.
21. Curtis, J.L. 2005. Cell-mediated adaptive immune defense of the lungs. *Proc Am Thorac Soc* 2:412-416.

22. Steinman, R.M., Turley, S., Mellman, I., and Inaba, K. 2000. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 191:411-416.
23. York, I.A., Goldberg, A.L., Mo, X.Y., and Rock, K.L. 1999. Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation. *Immunol Rev* 172:49-66.
24. Nemeč, M. 2001. Web alert. Lymphocyte activation and effector functions. *Curr Opin Immunol* 13:265.
25. Nishimura, T., Iwakabe, K., Sekimoto, M., Ohmi, Y., Yahata, T., Nakui, M., Sato, T., Habu, S., Tashiro, H., Sato, M., et al. 1999. Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo. *J Exp Med* 190:617-627.
26. Hung, K., Hayashi, R., Lafond-Walker, A., Lowenstein, C., Pardoll, D., and Levitsky, H. 1998. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med* 188:2357-2368.
27. Prado-Garcia, H., Avila-Moreno, F., and Lopez-Gonzalez, J.S. 2004. [Cytotoxic T lymphocytes in cancer and autoimmunity]. *Rev Invest Clin* 56:629-639.
28. Hamann, D., Baars, P.A., Rep, M.H., Hooibrink, B., Kerkhof-Garde, S.R., Klein, M.R., and van Lier, R.A. 1997. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med* 186:1407-1418.
29. Stumbles, P.A., Thomas, J.A., Pimm, C.L., Lee, P.T., Venaille, T.J., Proksch, S., and Holt, P.G. 1998. Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. *J Exp Med* 188:2019-2031.
30. Jahnsen, F.L., Strickland, D.H., Thomas, J.A., Tobagus, I.T., Napoli, S., Zosky, G.R., Turner, D.J., Sly, P.D., Stumbles, P.A., and Holt, P.G. 2006. Accelerated antigen sampling and transport by airway mucosal dendritic cells following inhalation of a bacterial stimulus. *J Immunol* 177:5861-5867.
31. Strickland, D., Kees, U.R., and Holt, P.G. 1996. Regulation of T-cell activation in the lung: isolated lung T cells exhibit surface phenotypic characteristics of recent activation including down-modulated T-cell receptors, but are locked into the G0/G1 phase of the cell cycle. *Immunology* 87:242-249.
32. Swann, J.B., and Smyth, M.J. 2007. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest* 117:1137-1146.
33. Zitvogel, L., Tesniere, A., and Kroemer, G. 2006. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 6:715-727.
34. Smyth, M.J., Thia, K.Y., Street, S.E., MacGregor, D., Godfrey, D.I., and Trapani, J.A. 2000. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med* 192:755-760.
35. Mori, S., Jewett, A., Murakami-Mori, K., Cavalcanti, M., and Bonavida, B. 1997. The participation of the Fas-mediated cytotoxic pathway by natural killer cells is tumor-cell-dependent. *Cancer Immunol Immunother* 44:282-290.
36. Takeda, K., Smyth, M.J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Yamaguchi, N., Yagita, H., and Okumura, K. 2001. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in NK cell-mediated and IFN-gamma-dependent suppression of subcutaneous tumor growth. *Cell Immunol* 214:194-200.

37. Zitvogel, L., Terme, M., Borg, C., and Trinchieri, G. 2006. Dendritic cell-NK cell cross-talk: regulation and physiopathology. *Curr Top Microbiol Immunol* 298:157-174.
38. Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3:991-998.
39. Smyth, M.J., Godfrey, D.I., and Trapani, J.A. 2001. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2:293-299.
40. Qin, Z., Schwartzkopff, J., Pradera, F., Kammertoens, T., Seliger, B., Pircher, H., and Blankenstein, T. 2003. A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells. *Cancer Res* 63:4095-4100.
41. Angiolillo, A.L., Sgadari, C., Taub, D.D., Liao, F., Farber, J.M., Maheshwari, S., Kleinman, H.K., Reaman, G.H., and Tosato, G. 1995. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* 182:155-162.
42. Sinha, R., Said, T.K., and Medina, D. 1996. Organic and inorganic selenium compounds inhibit mouse mammary cell growth in vitro by different cellular pathways. *Cancer Lett* 107:277-284.
43. Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. 2001. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410:1107-1111.
44. Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. 2004. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21:137-148.
45. Wang, Z., Cao, Y., Albino, A.P., Zeff, R.A., Houghton, A., and Ferrone, S. 1993. Lack of HLA class I antigen expression by melanoma cells SK-MEL-33 caused by a reading frameshift in beta 2-microglobulin messenger RNA. *J Clin Invest* 91:684-692.
46. Blanchet, O., Bourge, J.F., Zinszner, H., Israel, A., Kourilsky, P., Dausset, J., Degos, L., and Paul, P. 1992. Altered binding of regulatory factors to HLA class I enhancer sequence in human tumor cell lines lacking class I antigen expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3488-3492.
47. Doyle, A., Martin, W.J., Funa, K., Gazdar, A., Carney, D., Martin, S.E., Linnoila, I., Cuttitta, F., Mulshine, J., Bunn, P., et al. 1985. Markedly decreased expression of class I histocompatibility antigens, protein, and mRNA in human small-cell lung cancer. *J Exp Med* 161:1135-1151.
48. Beck, C., Schreiber, H., and Rowley, D. 2001. Role of TGF-beta in immune-evasion of cancer. *Microsc Res Tech* 52:387-395.
49. He, X., and Stuart, J.M. 1999. Prostaglandin E2 selectively inhibits human CD4+ T cells secreting low amounts of both IL-2 and IL-4. *J Immunol* 163:6173-6179.
50. Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., Uchida, Y., and Toge, T. 2004. The role of Fas ligand and transforming growth factor beta in tumor progression: molecular mechanisms of immune privilege via Fas-mediated apoptosis and potential targets for cancer therapy. *Cancer* 100:2281-2291.
51. Kim, R. 2006. Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. *Cancer Res.* 66:5527-5536.
52. Bellamy, W.T., Richter, L., Sirjani, D., Roxas, C., Glinzmann-Gibson, B., Frutiger, Y., Grogan, T.M., and List, A.F. 2001. Vascular endothelial cell growth factor is an

- autocrine promoter of abnormal localized immature myeloid precursors and leukemia progenitor formation in myelodysplastic syndromes. *Blood* 97:1427-1434.
53. Munn, D.H., Sharma, M.D., Lee, J.R., Jhaver, K.G., Johnson, T.S., Keskin, D.B., Marshall, B., Chandler, P., Antonia, S.J., Burgess, R., et al. 2002. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* 297:1867-1870.
 54. Doubrovina, E.S., Doubrovin, M.M., Vider, E., Sisson, R.B., O'Reilly, R.J., Dupont, B., and Vyas, Y.M. 2003. Evasion from NK cell immunity by MHC class I chain-related molecules expressing colon adenocarcinoma. *J Immunol* 171:6891-6899.
 55. Kim, R. 2005. Cancer cell immune escape and tumor progression by exploitation of anti-inflammatory and pro-inflammatory responses. *Cancer Biol. Ther.* 4:924-933.
 56. Takeda, K., Smyth, M.J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Kayagaki, N., Yagita, H., and Okumura, K. 2002. Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J Exp Med* 195:161-169.
 57. Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., et al. 1997. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388:190-195.
 58. Medema, J.P., de Jong, J., van Hall, T., Melief, C.J., and Offringa, R. 1999. Immune escape of tumors in vivo by expression of cellular FLICE-inhibitory protein. *J Exp Med* 190:1033-1038.
 59. Medema, J.P., de Jong, J., Peltenburg, L.T., Verdegaal, E.M., Gorter, A., Bres, S.A., Franken, K.L., Hahne, M., Albar, J.P., Melief, C.J., et al. 2001. Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11515-11520.
 60. Schmielau, J., Nalesnik, M.A., and Finn, O.J. 2001. Suppressed T-cell receptor zeta chain expression and cytokine production in pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res* 7:933s-939s.
 61. Lockhart, D.C., Chan, A.K., Mak, S., Joo, H.G., Daust, H.A., Carritte, A., Douville, C.C., Goedegebuure, P.S., and Eberlein, T.J. 2001. Loss of T-cell receptor-CD3zeta and T-cell function in tumor-infiltrating lymphocytes but not in tumor-associated lymphocytes in ovarian carcinoma. *Surgery* 129:749-756.
 62. Gastman, B.R., Johnson, D.E., Whiteside, T.L., and Rabinowich, H. 1999. Caspase-mediated degradation of T-cell receptor zeta-chain. *Cancer Res* 59:1422-1427.
 63. Ochsenbein, A.F., Klenerman, P., Karrer, U., Ludewig, B., Pericin, M., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. 1999. Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2233-2238.
 64. Spiotto, M.T., Yu, P., Rowley, D.A., Nishimura, M.I., Meredith, S.C., Gajewski, T.F., Fu, Y.X., and Schreiber, H. 2002. Increasing tumor antigen expression overcomes "ignorance" to solid tumors via crosspresentation by bone marrow-derived stromal cells. *Immunity* 17:737-747.
 65. Mahnke, K., Schmitt, E., Bonifaz, L., Enk, A.H., and Jonuleit, H. 2002. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 80:477-483.

66. Lazcano Ponce, E.C., Tovar Guzman, V., Meneses Gonzalez, F., Rascon Pacheco, R.A., and Hernandez Avila, M. 1997. Trends of lung cancer mortality in Mexico. *Arch Med Res* 28:565-570.
67. Medina, F.M., Barrera, R.R., Morales, J.F., Echegoyen, R.C., Chavarria, J.G., and Rebora, F.T. 1996. Primary lung cancer in Mexico city: a report of 1019 cases. *Lung Cancer* 14:185-193.
68. Medina-Morales, F., and Salazar-Flores, M. 2000. [Changing pattern and frequency of lung cancer in Mexico]. *Salud Publica Mex* 42:333-336.
69. Chiou, S.H., Sheu, B.C., Chang, W.C., Huang, S.C., and Hong-Nerng, H. 2005. Current concepts of tumor-infiltrating lymphocytes in human malignancies. *J Reprod Immunol* 67:35-50.
70. Sheu, B.C., Hsu, S.M., Ho, H.N., Lin, R.H., Torng, P.L., and Huang, S.C. 1999. Reversed CD4/CD8 ratios of tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with the progression of human cervical carcinoma. *Cancer* 86:1537-1543.
71. Mann, B., Gratchev, A., Bohm, C., Hanski, M.L., Foss, H.D., Demel, G., Trojanek, B., Schmidt-Wolf, I., Stein, H., Riecken, E.O., et al. 1999. FasL is more frequently expressed in liver metastases of colorectal cancer than in matched primary carcinomas. *Br J Cancer* 79:1262-1269.
72. Okada, K., Komuta, K., Hashimoto, S., Matsuzaki, S., Kanematsu, T., and Koji, T. 2000. Frequency of apoptosis of tumor-infiltrating lymphocytes induced by fas counterattack in human colorectal carcinoma and its correlation with prognosis. *Clin Cancer Res* 6:3560-3564.
73. Mennett, M. 1998. The fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with the fas ligand expression by human esophageal carcinoma. *J Immunol* 160:5669-5675.
74. Fisk, B., Anderson, B.W., Gravitt, K.R., O'Brian, C.A., Kudelka, A.P., Murray, J.L., Wharton, J.T., and Ioannides, C.G. 1997. Identification of naturally processed human ovarian peptides recognized by tumor-associated CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* 57:87-93.
75. Linehan, D.C., Goedegebuure, P.S., Peoples, G.E., Rogers, S.O., and Eberlein, T.J. 1995. Tumor-specific and HLA-A2-restricted cytolysis by tumor-associated lymphocytes in human metastatic breast cancer. *J Immunol* 155:4486-4491.
76. Puccetti, L., Manetti, R., Parronchi, P., Piccinni, M.P., Mavilia, C., Carini, M., Romagnani, S., and Maggi, E. 2002. Role of low nuclear grading of renal carcinoma cells in the functional profile of tumor-infiltrating T cells. *Int J Cancer* 98:674-681.
77. Schwaab, T., Weiss, J.E., Schned, A.R., and Barth Jr, R.J. 2001. Dendritic Cell Infiltration in Colon Cancer. *J Immunother* 24:130-137.
78. Zeid, N.A., and Muller, H.K. 1993. S100 positive dendritic cells in human lung tumors associated with cell differentiation and enhanced survival. *Pathology* 25:338-343.
79. Zhang, L., Conejo-Garcia, J.R., Katsaros, D., Gimotty, P.A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M.N., et al. 2003. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 348:203-213.
80. Sato, E., Olson, S.H., Ahn, J., Bundy, B., Nishikawa, H., Qian, F., Jungbluth, A.A., Frosina, D., Gnjatic, S., Ambrosone, C., et al. 2005. Intraepithelial CD8+ tumor-

- infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18538-18543.
81. Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., et al. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10:942-949.
 82. Aaltomaa, S., Lipponen, P., Eskelinen, M., Kosma, V.M., Marin, S., Alhava, E., and Syrjanen, K. 1992. Lymphocyte infiltrates as a prognostic variable in female breast cancer. *Eur J Cancer* 28A:859-864.
 83. Vgneoulou, S. 2003. Immunohistochemical evaluation of immune response in invasive ductal breast cancer of not-otherspecified type. *Breast* 12:172-178.
 84. Reome, J.B., Hyland, J.C., Dutton, R.W., and Dobrzanski, M.J. 2004. Type 1 and type 2 tumor infiltrating effector cell subpopulations in progressive breast cancer. *Clin Immunol* 111:69-81.
 85. Vesalainen, S., Lipponen, P., Talja, M., and Syrjanen, K. 1994. Histological grade, perineural infiltration, tumour-infiltrating lymphocytes and apoptosis as determinants of long-term prognosis in prostatic adenocarcinoma. *Eur J Cancer* 30A:1797-1803.
 86. Irani, J., Goujon, J.M., Ragni, E., Peyrat, L., Hubert, J., Saint, F., and Mottet, N. 1999. High-grade inflammation in prostate cancer as a prognostic factor for biochemical recurrence after radical prostatectomy. Pathologist Multi Center Study Group. *Urology* 54:467-472.
 87. McArdle, P.A., Canna, K., McMillan, D.C., McNicol, A.M., Campbell, R., and Underwood, M.A. 2004. The relationship between T-lymphocyte subset infiltration and survival in patients with prostate cancer. *Br J Cancer* 91:541-543.
 88. Ohtani, H., Naito, Y., Saito, K., and Nagura, H. 1997. Expression of costimulatory molecules B7-1 and B7-2 by macrophages along invasive margin of colon cancer: a possible antitumor immunity? *Lab Invest* 77:231-241.
 89. Menon, A.G., Janssen-van Rhijn, C.M., Morreau, H., Putter, H., Tollenaar, R.A., van de Velde, C.J., Fleuren, G.J., and Kuppen, P.J. 2004. Immune system and prognosis in colorectal cancer: a detailed immunohistochemical analysis. *Lab Invest* 84:493-501.
 90. Jass, J.R., Love, S.B., and Northover, J.M. 1987. A new prognostic classification of rectal cancer. *Lancet* 1:1303-1306.
 91. Ropponen, K.M., Eskelinen, M.J., Lipponen, P.K., Alhava, E., and Kosma, V.M. 1997. Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer. *J Pathol* 182:318-324.
 92. Diederichsen, A.C., Hjelmborg, J.B., Christensen, P.B., Zeuthen, J., and Fenger, C. 2003. Prognostic value of the CD4+/CD8+ ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cells. *Cancer Immunol Immunother* 52:423-428.
 93. Menon, A.G., Morreau, H., Tollenaar, R.A., Alphenaar, E., Van Puijenbroek, M., Putter, H., Janssen-Van Rhijn, C.M., Van De Velde, C.J., Fleuren, G.J., and Kuppen, P.J. 2002. Down-regulation of HLA-A expression correlates with a better prognosis in colorectal cancer patients. *Lab Invest* 82:1725-1733.
 94. Sandel, M.H., Dadabayev, A.R., Menon, A.G., Morreau, H., Melief, C.J., Offringa, R., van der Burg, S.H., Janssen-van Rhijn, C.M., Ensink, N.G., Tollenaar, R.A., et

- al. 2005. Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells in colorectal cancer: role of maturation status and intratumoral localization. *Clin Cancer Res* 11:2576-2582.
95. Databayev, A. 2004. Dendritic cells in colorectal cancer correlated with other tumor-infiltrating immune cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 53:978-986.
 96. Suzuki, A., Masuda, A., Nagata, H., Kameoka, S., Kikawada, Y., Yamakawa, M., and Kasajima, T. 2002. Mature dendritic cells make clusters with T cells in the invasive margin of colorectal carcinoma. *J Pathol* 196:37-43.
 97. Johnson, S.K., Kerr, K.M., Chapman, A.D., Kennedy, M.M., King, G., Cockburn, J.S., and Jeffrey, R.R. 2000. Immune cell infiltrates and prognosis in primary carcinoma of the lung. *Lung Cancer* 27:27-35.
 98. Takeo, S., Yasumoto, K., Nagashima, A., Nakahashi, H., Sugimachi, K., and Nomoto, K. 1986. Role of tumor-associated macrophages in lung cancer. *Cancer Res* 46:3179-3182.
 99. Takanami, I., Takeuchi, K., and Giga, M. 2001. The prognostic value of natural killer cell infiltration in resected pulmonary adenocarcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 121:1058-1063.
 100. Mori, M., Ohtani, H., Naito, Y., Sagawa, M., Sato, M., Fujimura, S., and Nagura, H. 2000. Infiltration of CD8+ T cells in non-small cell lung cancer is associated with dedifferentiation of cancer cells, but not with prognosis. *Tohoku J Exp Med* 191:113-118.
 101. Kerr, K.M., Johnson, S.K., King, G., Kennedy, M.M., Weir, J., and Jeffrey, R. 1998. Partial regression in primary carcinoma of the lung: does it occur? *Histopathology* 33:55-63.
 102. Riemann, D., Wenzel, K., Schulz, T., Hofmann, S., Neef, H., Lautenschlager, C., and Langner, J. 1997. Phenotypic analysis of T lymphocytes isolated from non-small-cell lung cancer. *Int Arch Allergy Immunol* 114:38-45.
 103. Hiraoka, K., Miyamoto, M., Cho, Y., Suzuoki, M., Oshikiri, T., Nakakubo, Y., Itoh, T., Ohbuchi, T., Kondo, S., and Katoh, H. 2006. Concurrent infiltration by CD8+ T cells and CD4+ T cells is a favourable prognostic factor in non-small-cell lung carcinoma. *Br J Cancer* 94:275-280.
 104. Malygin, A.M., Redjko, A.A., Pogodina, O.N., Karaseva, N.A., Koval, Y.F., and Timonen, T. 1993. Prognostic value of non-MHC-restricted killer cell activity in lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 36:61-64.
 105. Watanabe, Y., Shimizu, J., Hashizume, Y., Tsunamura, Y., Yamada, T., Iwa, T., Sakai, S., Murayama, T., Koshimura, S., and Saito, M. 1990. Immune reactivity in bronchogenic carcinoma and its relation to 5-year survival rate. *J Surg Oncol* 45:103-109.
 106. Yasumoto, K., Takeo, S., Yano, T., Nakahashi, H., Nagashima, A., Sugimachi, K., and Nomoto, K. 1988. Role of tumor-infiltrating lymphocytes in the host defense mechanism against lung cancer. *J Surg Oncol* 38:221-226.
 107. Yoshino, I., Yano, T., Miyamoto, M., Yamada, K., Kajii, Y., Onodera, K., Ishida, T., Sugimachi, K., Kimura, G., and Nomoto, K. 1993. Characterization of lung squamous cell carcinoma-derived T-cell suppressive factor. *Cancer* 72:2347-2357.
 108. Yoshino, I., Yano, T., Murata, M., Ishida, T., Sugimachi, K., Kimura, G., and Nomoto, K. 1992. Tumor-reactive T-cells accumulate in lung cancer tissues but fail to respond due to tumor cell-derived factor. *Cancer Res* 52:775-781.

109. Huang, M., Wang, J., Lee, P., Sharma, S., Mao, J.T., Meissner, H., Uyemura, K., Modlin, R., Wollman, J., and Dubinett, S.M. 1995. Human non-small cell lung cancer cells express a type 2 cytokine pattern. *Cancer Res* 55:3847-3853.
110. LI, R. 2003. Analysis of the immunological microenvironment at the tumor site in patients with non-small cell lung cancer. *Langenbecks Arch. Surg.* 388:406-412.
111. Prado-Garcia, H., Aguilar-Cazares, D., Flores-Vergara, H., Mandoki, J.J., and Lopez-Gonzalez, J.S. 2005. Effector, memory and naive CD8+ T cells in peripheral blood and pleural effusion from lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer* 47:361-371.
112. Brambilla, E., Travis, W.D., Colby, T.V., Corrin, B., and Shimosato, Y. 2001. The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J* 18:1059-1068.
113. Drescher, K.M., and Lynch, H.T. 2005. Tumor infiltrating lymphocytes (TILs): Lessons learned in 30 years of study. *Clin Appl Immunol Rev* 5:149-166.
114. Garcia-Lora, A., Algarra, I., and Garrido, F. 2003. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol* 195:346-355.
115. Korkolopoulou, P., Kaklamanis, L., Pezzella, F., Harris, A.L., and Gatter, K.C. 1996. Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer. *Br J Cancer* 73:148-153.
116. Rees, R.C., and Mian, S. 1999. Selective MHC expression in tumours modulates adaptive and innate antitumour responses. *Cancer Immunol Immunother* 48:374-381.
117. Trojan, A., Urosevic, M., Dummer, R., Giger, R., Weder, W., and Stahel, R.A. 2004. Immune activation status of CD8+ T cells infiltrating non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 44:143-147.
118. Reichert, T.E., Scheuer, C., Day, R., Wagner, W., and Whiteside, T.L. 2001. The number of intratumoral dendritic cells and zeta-chain expression in T cells as prognostic and survival biomarkers in patients with oral carcinoma. *Cancer* 91:2136-2147.
119. Prado-Garcia, H., Aguilar-Cazares, D., Meneses-Flores, M., Morales-Fuentes, J., and Lopez-Gonzalez, J.S. 2008. Lung carcinomas do not induce T-cell apoptosis via the Fas/Fas ligand pathway but down-regulate CD3 epsilon expression. *Cancer Immunol Immunother* 57:325-336.
120. Ely, K.H., Cookenham, T., Roberts, A.D., and Woodland, D.L. 2006. Memory T cell populations in the lung airways are maintained by continual recruitment. *J Immunol* 176:537-543.
121. Kohlmeier, J.E., and Woodland, D.L. 2006. Memory T cell recruitment to the lung airways. *Curr Opin Immunol* 18:357-362.
122. Appay, V., Dunbar, P.R., Callan, M., Klenerman, P., Gillespie, G.M., Papagno, L., Ogg, G.S., King, A., Lechner, F., Spina, C.A., et al. 2002. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med* 8:379-385.
123. Cullen, S.P., and Martin, S.J. 2008. Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ* 15:251-262.
124. Medley, Q.G., Kedersha, N., O'Brien, S., Tian, Q., Schlossman, S.F., Streuli, M., and Anderson, P. 1996. Characterization of GMP-17, a granule membrane protein

- that moves to the plasma membrane of natural killer cells following target cell recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:685-689.
125. Ortelgel, J.W., Staren, E.D., Faber, L.P., Warren, W.H., and Braun, D.P. 2002. Modulation of tumor-infiltrating lymphocyte cytolytic activity against human non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 36:17-25.
 126. Esendagli, G., Bruderek, K., Goldmann, T., Busche, A., Branscheid, D., Vollmer, E., and Brandau, S. 2008. Malignant and non-malignant lung tissue areas are differentially populated by natural killer cells and regulatory T cells in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 59:32-40.
 127. Woo, E.Y., Chu, C.S., Goletz, T.J., Schlienger, K., Yeh, H., Coukos, G., Rubin, S.C., Kaiser, L.R., and June, C.H. 2001. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 61:4766-4772.