



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

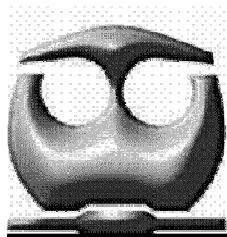
**Determinación de la expresión de los ligandos PD-L1 y
PD-L2 en células tumorales y el receptor PD-1 en
linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ provenientes de pacientes con
adenocarcinoma pulmonar**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A

Norma Citlalli Sandoval Vázquez



MÉXICO, D.F. 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: José Sullivan López González
VOCAL: Enrique Ortega Soto
SECRETARIO: Heriberto Prado García
1er. SUPLENTE: Laura Cecilia Bonifaz Alfonzo
2° SUPLENTE: Sonia Mayra Pérez Tapia

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Este trabajo de Tesis se realizó en el Laboratorio de Cáncer Pulmonar, Departamento de Enfermedades Crónico-Degenerativas del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”, SS. México D. F.

ASESOR DEL TEMA:

DR. HERIBERTO PRADO GARCÍA

SUSTENTANTE:

NORMA CITLALLI SANDOVAL VÁZQUEZ

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se lo dedico a los forjadores de mi vida, de mi esencia de lo que soy, mi familia. A mi mamá Claudia Vázquez, una mujer trabajadora que me ha enseñado a perseverar, me dio el legado de confiar en mí misma y me demostró que nunca hay que rendirse ante las adversidades de la vida, gracias por ser la mejor mamá preciosa. A mi papá Valente Sandoval por transmitirme el deseo del saber y enseñarme los mejores valores: la sencillez y la humildad. A mis hermanos Itzel y Adad por ser amigos inseparables, confidentes y luchadores incansables, gracias por guiar mis pasos a través de los suyos. A Carsten y Yarin por crecer junto con migo. A mi mejor amigo, confidente, compañero de penas y amor de mi vida, Tomás. Muchas gracias a todos por su apoyo y su amor, sin ustedes no lo hubiera podido lograr, esto es para ustedes por que juntos lo hemos trabajado. Los amo.

Les agradezco a mis amigos de la infancia, la banda del hoyo del CCH sur, a todos los QFB que me apoyaron, no sólo como buenos compañeros sino también como amigos, por su aportación de conocimientos de toda índole incluyendo los de la vida, nunca los olvidaré. A Sarahi, Lasse, Pedro y Adriana por obsequiarme lo mejor de sí: su amistad. A todos mis nuevos y viejos amigos por su paciencia, apoyo y espera de espacio en nuestras vidas compartidas. Los quiero mucho.

Le agradezco también a todas aquellas personas que fueron parte de mi vida y se quedaron en el camino de este arduo recorrido, pero que me ayudaron a madurar.

Un agradecimiento especial al Dr. Sullivan por darme la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo, por sus enseñanzas personales y profesionales y a mi asesor Dr. Heriberto Prado, por guiar este bello trabajo, por su dedicación, enseñanzas, apoyo incondicional, paciencia y comprensión.

Y por supuesto a mis amigos y compañeros del INER con los que compartí, y espero seguir compartiendo, más que una sonrisa y un espacio en el laboratorio de Cáncer Pulmonar.

Y por último, le agradezco a mi casa de estudios, la UNAM, en la que pase la mayor parte del tiempo y que no pudo darme mejor regalo en la vida que el ser universitaria y formarme en ella.

PENSAMIENTOS

Soy un investigador común. Cuando estudio los resultados cotidianos que se producen en el laboratorio, me apasiono ante un avance científico y me asombro ante la estética de un resultado experimental. Y de vez en cuando salgo, encuentro seres que tienen otras pasiones, otras estéticas y a veces conversamos. Descubro entonces tanta similitud en nuestras palabras, tal vez en nuestros conceptos, en nuestra voluntad de construir el mundo a partir de nuestro particular enfoque, que me lanzo a la interacción. Entonces surgen las dificultades intensas de comunicación: las mismas palabras no significan las mismas cosas, los conceptos parecen diferentes y no tarda en instaurarse el tedio de los eventos fallidos. Escribo esto a causa de tales frustraciones y para comunicar mi admiración por la investigación...

Wolf. H. Fridman

Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber... Recuerda que lo importante es no dejar de hacer preguntas...

A. Einstein

La ciencia no es más que una suma de errores que conducen a la verdad.

Juan Luis Vives

Hay un libro abierto siempre para todos los ojos: la naturaleza.

Jean Jacques Rousseau



ÍNDICE

INTRODUCCCIÓN	1
Cáncer.....	1
Cáncer de Pulmón.....	4
Incidencia y generalidades del cáncer de pulmón.....	4
Clasificación histológica.....	5
Estadios del carcinoma pulmonar de células no pequeñas.....	6
Derrame Pleural.....	7
Tratamientos generales de cáncer de pulmón.....	7
Generalidades de la respuesta inmune.....	9
Características del linfocito T.....	10
Activación de los linfocitos T.....	10
Respuesta Inmune en Cáncer.....	13
Señal de alarma.....	13
Inmunovigilancia.....	14
Inmunoección.....	14
Mecanismos de evasión tumoral.....	19
ANTECEDENTES	23
Vía PD-1: PD-L1/ PD-L2.....	23
Propiedades de PD-1, PD-L1 y PD-L2.....	23
Vía de señalización de PD-1: PD-L1/PD-L2.....	25
Regulación de la respuesta inmune mediada por PD-1: PD-L.....	26
Vía PD-1: PD-L1/ PD-L2 en la evasión tumoral de la respuesta inmune.....	28
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	33
OBJETIVOS PARTICULARES	34
MATERIALES Y MÉTODOS	35
Líneas celulares.....	36
Células tumorales obtenidas de pacientes con cáncer pulmonar.....	36
Anticuerpos.....	37
Cultivo de líneas celulares.....	37
Inmunotinción de PD-L1 y PD-L2 en células tumorales.....	38
Estímulo de las CMN y determinación del porcentaje de linfocitos TCD4 ⁺ y CD8 ⁺ PD-1 positivos.....	38
Análisis por citometría de flujo.....	39
Análisis estadístico.....	40
RESULTADOS	42
Determinación del porcentaje de células tumorales PD-L1 y PD-L2 positivas... Expresión de PD-L1 y PD-L2 en líneas celulares.....	42 42



Expresión de PD-L1 y PD-L2 en muestras de pacientes con adenocarcinoma pulmonar.....	43
Análisis comparativo de la expresión de PD-L1 entre las muestras de los pacientes y las líneas celulares establecidas.....	46
Determinación del porcentaje de linfocitos TCD4 ⁺ PD-1 ⁺ y TCD8 ⁺ PD-1 ⁺ en pacientes con adenocarcinoma pulmonar.....	47
Porcentaje basal de linfocitos T PD-1 positivos.....	47
Efecto del estímulo con anti-CD3 en el porcentaje de linfocitos T PD-1 positivos.....	48
Inducción específica de PD-1 posterior al tratamiento con anti-CD3 en linfocitos T.....	51
DISCUSIÓN.....	53
Expresión de PD-L1 y PD-L2 en las células tumorales.....	53
Expresión de PD-1 en subpoblaciones de linfocitos T.....	55
CONCLUSIONES.....	59
BIBLIOGRAFÍA.....	61



ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura	Pág.
Fig. 1 Proceso de carcinogénesis pulmonar.....	6
Fig. 2 Estadios de progresión del cáncer pulmonar.....	8
Fig. 3 Activación del linfocito T.....	12
Fig. 4 Supresión extrínseca del tumor por el sistema inmune.....	18
Fig. 5 Mecanismos de evasión tumoral.....	22
Fig. 6 Estructura y vía de señalización de PD-1 y PD-L1.....	25
Fig. 7 Acción inhibitoria de PD-L1 y PD-L2 en la evasión inmune del tumor.....	31
Fig. 8 Análisis representativo de la determinación del porcentaje de células PD-L1 y PD-L2 positivas en líneas celulares.....	40
Fig. 9 Análisis representativo de la determinación de células PD-L1 y PD-L2 positivas en células tumorales provenientes de pacientes con adenocarcinoma pulmonar.....	41
Fig. 10 Análisis representativo de la determinación del porcentaje de linfocitos T PD-1 positivos.....	41
Fig. 11 Porcentajes de células PD-L1 y PD-L2 positivas en las diferentes líneas celulares.....	43
Fig. 12 Histogramas representativos de células tumorales PD-L1 y PD-L2 positivas en las muestras provenientes de pacientes con adenocarcinoma pulmonar.....	44
Fig. 13 Análisis de poblaciones de células tumorales en la muestra M2.....	45
Fig. 14 Porcentajes de células PD-L1 y PD-L2 positivas en las diferentes muestras de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar.....	45
Fig. 15 Porcentajes de células PD-L1 ⁺ en las muestras de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar y las líneas celulares establecidas de cada muestra.....	46
Fig. 16 Porcentajes basales de linfocitos TCD4 ⁺ PD-1 ⁺ y TCD8 ⁺ PD-1 ⁺	48
Fig. 17 Porcentaje de linfocitos TCD4 ⁺ PD-1 ⁺ y TCD8 ⁺ PD-1 ⁺	50
Fig. 18 Porcentaje de inducción específica de PD-1 en linfocitos TCD4 ⁺ y TCD8 ⁺	52
Tabla	
Tabla 1 Expresión de B7-H1 en cánceres humanos y su asociación inmunológica, clínica y patológica.....	29



ABREVIATURAS

AC	Adenocarcinoma
APC	Célula presentadora de antígeno profesional
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Albúmina sérica bovina
BTLA	Atenuador de linfocitos T y B
CDs	Células dendríticas
CMN	Células mononucleares
CMN-LP	CMN de líquido pleural
CMN-SP	CMN de sangre periférica
CTLA-4	Antígeno-4 de linfocito T citotóxico
CTLs	Linfocitos T citotóxicos
DISC	Complejo de señalización de inducción de muerte
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
ICOS	Coestimulador inducible
IFN	Interferón
IL	Interleucina
ITAM	Motivo conservado basado en tirosina
ITIM	Motivo inhibitorio basado en tirosina
ITSM	Motivo de cambio basado en tirosina
LC	Carcinoma de células grandes
LP	Líquido pleural
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
ND	No determinado
NK	Del inglés Natural Killers (asesinas naturales)
NKT	Células T Natural Killer
NSCLC	Carcinoma pulmonar de células no pequeñas
P450	Citocromo P450
PBS	Amortiguador de fosfato salino
PD-1	Receptor de muerte programada 1
PD-L1	Ligando de muerte programada 1
PD-L2	Ligando de muerte programada 2
PE	Ficoeritrina
PECy5	R ficoeritrina cianina 5
PGE2	Prostaglandina E2
PI3K	Fosfoinositidina 3 cinasa
QR	Quantum Red
RE	Retículo endoplásmico
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SC	Carcinoma de células escamosas
SCLC	Carcinoma pulmonar de células pequeñas
SH2	Dominio Src homólogo 2
SMAC	Complejo de activación supramolecular



SP	Sangre periférica
SS	Sujetos sanos
STAT5	Señal del transductor y activador de transcripción 5
TAP	Proteína asociada al transporte de antígenos
TCR	Receptor de célula T
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
Th	Linfocitos T helper (cooperadores)
TILs	Linfocitos infiltrantes de tumor
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral
Treg	Células T reguladoras
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
ZAP70	Proteína cinasa 70 asociada a la cadena zeta



INTRODUCCIÓN

Cáncer

El crecimiento celular normal es regulado por un balance finamente controlado entre las señales de promoción del crecimiento y las señales de limitación del crecimiento. Durante un proceso normal, la diferenciación de las células ocurre de una manera ordenada y la duplicación celular cesa por un largo tiempo cuando no se requiere¹⁴, pero en las células tumorales estos procesos están alterados.

El cáncer es una enfermedad genética^{26, 69} que implica la alteración de un grupo de genes que normalmente actúan suprimiendo o estimulando la activación del ciclo celular; donde la mutación, pérdida o inactivación de estos genes da lugar a una división celular descontrolada y a la formación de tumores².

Para que las células normales se transformen en células tumorales se requieren de seis propiedades fundamentales⁵⁴ que en conjunto se les conoce como marcas del cáncer²⁶:

1) Autosuficiencia proliferativa. Las células normales requieren de señales mitógenas de crecimiento producidas por las células vecinas, para que puedan moverse del estado quiescente al estado activo de proliferación, lo que contrasta con el comportamiento de las células tumorales, las cuales muestran una reducida dependencia de las señales de estimulación de la proliferación, puesto que ellas generan muchas de sus señales de proliferación. Tres estrategias moleculares son evidentes para obtener la autonomía en la proliferación celular: estimulación autocrina, mutaciones en los receptores de los factores de crecimiento o mutaciones en las moléculas intracelulares responsables de la traducción de señales²⁶.

2) Insensibilidad a las señales de inhibición de la proliferación. Dentro del tejido normal operan múltiples señales antiproliferativas que mantienen la quiescencia celular y la homeostasis tisular. Entre las señales antiproliferativas se encuentran la expresión de moléculas de adhesión celular, factores solubles o moléculas embebidas en la matriz extracelular. Las señales antiproliferativas pueden bloquear la proliferación por dos mecanismos: la célula puede ser forzada a salir del ciclo activo de proliferación a un estado quiescente o puede ser inducida a renunciar permanentemente a su potencial



proliferativo. En el caso de las células tumorales, pueden bloquear estas señales y favorecer en su lugar la expresión de las señales proliferativas²⁶.

3) Evasión de Apoptosis: La habilidad de las células tumorales para sobrevivir es determinada no sólo por la velocidad de proliferación celular, sino también por la reducida tasa de eliminación celular, debida principalmente a la apoptosis. La apoptosis se activa en respuesta a la detección de anomalías, entre otros factores se incluyen, daño al DNA, desbalance en la cascada de señalización e insuficiencia en las señales de supervivencia²⁶. La resistencia a la apoptosis puede ser adquirida por las células tumorales a través de una gran variedad de estrategias; sin embargo, la que más comúnmente ocurre es la pérdida de la regulación proapoptótica, a través de mutaciones que se presentan en el gen supresor de tumor TP53²⁶.

4) Potencial replicativo ilimitado. El progresivo acortamiento de los telómeros a través de los consecutivos ciclos de replicación ocasiona la desprotección de las terminaciones cromosómicas, lo que puede resultar en la muerte de la célula. El potencial replicativo ilimitado es un fenómeno esencial que se adquiere durante la progresión maligna del tumor; en el que, las células tumorales pueden sobreexpresar la enzima telomerasa para mantener a los telómeros lo que conduce a que la célula pueda dividirse indefinidamente sin perder los telómeros²⁶.

5) Angiogénesis sostenida. Una vez que el tejido está formado, la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) es transitoria y cuidadosamente regulada. Dentro de una lesión proliferativa aberrante, las células inicialmente carecen de habilidad angiogénica, lo que restringe su capacidad de expansión; sin embargo, debido a la estimulación proliferativa y al aumento de tamaño del tumor, al inicio de las neoplasias, muchas células desarrollan la habilidad angiogénica. La inducción de la angiogénesis y los efectos de los inhibidores de la angiogénesis, indican que la neovascularización es un prerrequisito para la rápida expansión clonal asociada con la formación de tumores macroscópicos²⁶.

6) Invasión tisular y metástasis. Durante la generación de nuevas clonas con variantes genéticas, las células tumorales proliferan descontroladamente y pierden la capacidad de adhesión con las células de su alrededor, lo que les permite invadir tejidos adyacentes y viajar a sitios distantes donde pueden establecer una nueva



generación de clonas (metástasis)²⁶. La capacidad de invasión y metástasis permite a las células tumorales liberarse del tumor primario y colonizar nuevos sitios en el cuerpo donde, al menos inicialmente, el espacio y los nutrientes no serán limitados. Sin embargo, el éxito en la invasión tisular y la metástasis depende de que se adquieran las cinco marcas previamente mencionadas²⁶.

En general, las alteraciones que se presentan en las células tumorales son debidas a que el genoma es modificado en múltiples sitios, sufriendo una desorganización a causa de mutaciones ligeras o puntuales⁶⁷. Las alteraciones en el cáncer son el resultado de interacciones entre factores genéticos (lesiones del DNA ocurridas por la replicación, la desaminación, las metilaciones, el ataque de especies reactivas de oxígeno y la imperfecta reparación del DNA dañado⁴⁰) y los agentes externos (carcinógenos físicos: radiación; carcinógenos químicos: humo del tabaco y carcinógenos biológicos: infecciones por virus). Las interacciones entre ambos factores son responsables de dañar al DNA causando mutaciones².

El cáncer es un proceso de múltiples pasos, en el que las principales alteraciones del DNA, responsables de la tumorigénesis, se presentan en tres tipos de genes: los oncogenes, los genes supresores de tumor y los genes de estabilidad⁶⁷.

Los protooncogenes son genes que codifican para proteínas involucradas en la progresión del ciclo celular y regulación de la proliferación celular; cuando éstos son mutados se desencadena un estado de activación permanente que aumenta su potencial oncogénico y se denominan entonces como oncogenes debido a la ganancia de funciones que presentan. Por otro lado, la inducción oncogénica por los genes supresores de tumor, encargados de detener la división celular e inducir la apoptosis, ocurre a través de la inactivación de proteínas reguladoras del ciclo celular provocando la pérdida de funciones celulares. Finalmente, los genes de estabilidad son responsables del proceso de reparación del DNA, asegurando que se presente la correcta segregación cromosomal durante la mitosis⁶⁷.

La inactivación de los genes supresores de tumor y de los genes de estabilidad, así como la ganancia en la función de los oncogenes conllevan a una inestabilidad y variabilidad genómica y en consecuencia a una generación de células mutantes con ventajas selectivas, que conducen a la proliferación tumoral descontrolada y la



extensión de clonas de las células transformadas, que pueden generar un tumor maligno²⁶.

Cáncer de pulmón

El cáncer es una enfermedad que tiene importancia en el ámbito de la salud a nivel mundial. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) de los 60.7 millones de muertes mundiales que se registraron en el 2007, 7.9 millones (13%) se debieron al cáncer. Los tipos de cánceres que más contribuyeron al índice de mortalidad sin considerar el género son: cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de colon y cáncer de mama⁴⁸.

Incidencia y generalidades del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es la forma más común de cáncer en el mundo⁴⁵, con un estimado de 1.4 millones de defunciones en el año 2007 y con un incremento en el 2008 de 1.8 millones de defunciones, de las cuales el 60% se registraron en países subdesarrollados⁴⁹.

En México, el cáncer de pulmón también representa la principal causa de muerte por cáncer, durante el período de 1998-2004 se registraron 46 mil muertes debidas a esta patología con una edad promedio de defunción de 68 años y un estimado de incidencia de 19 muertes cada 24 hrs⁵⁵. La causa más importante relacionada al cáncer de pulmón es el humo de cigarro, se estima que el 80-90% de los casos, se asocian con el hábito tabáquico; el porcentaje restante corresponde a pacientes que desarrollan cáncer de pulmón con un historial de no fumadores y puede estar relacionado con causas ambientales y hereditarias⁴².

El cáncer de pulmón es una enfermedad que resulta de alteraciones genéticas en el epitelio pulmonar, debidas principalmente a la acumulación de los compuestos químicos mutagénicos y carcinogénicos que tienen los cigarrillos^{40, 42, 44}.

Se han identificado más de 4, 000 sustancias químicas en el humo del cigarro, de las cuales más de 60 son carcinogénicas. Las sustancias químicas que inician la carcinogénesis son de estructura extremadamente diversas e incluyen tanto a productos naturales como sintéticos. De manera general, se pueden clasificar de la



siguiente forma: 1) compuestos de acción directa, que no requieren transformación química para su carcinogenicidad y 2) compuestos de acción indirecta o procarcinógenos, que requieren ser metabolizados *in vivo* para producir compuestos altamente reactivos capaces de inducir cambios genéticos y epigenéticos en las células^{42, 44}.

Los carcinógenos actúan en diferentes etapas de la carcinogénesis: iniciación, promoción y progresión. La iniciación es la secuencia de eventos iniciales que se presentan en el proceso de carcinogénesis, la cual consiste en la transformación de una célula normal a una célula neoplásica, por medio del desarrollo de defectos genéticos. La etapa de promoción es la que la proliferación de la célula neoplásica es de manera descontrolada hacia el tejido adyacente; y la etapa de progresión que se manifiesta con una proliferación sostenida que encausa un crecimiento maligno incontrolable (ver figura 1)⁴².

Clasificación histológica

Los tumores malignos se clasifican de acuerdo a distintas características patológicas, morfológicas, diferencias epidemiológicas, clínicas, radiográficas y pronósticas particulares²⁸.

El carcinoma de pulmón se clasifica histológicamente en cuatro principales tipos: cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), carcinoma de células escamosas (SC), adenocarcinoma (AC) y carcinoma de células grandes (LC). Clínicamente los tres últimos tipos se consideran como carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)⁶⁴. El NSCLC representa el 80% de los casos que se presentan de cáncer de pulmón y el adenocarcinoma es el tipo histológico con mayor frecuencia⁴⁰.

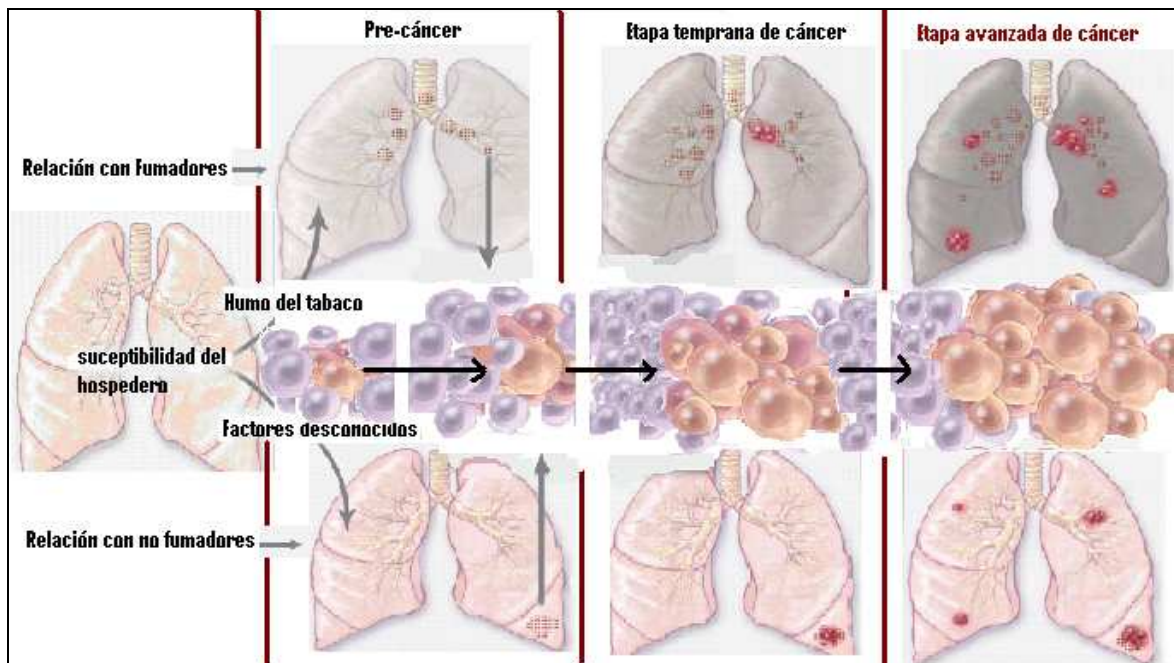


Figura 1. Proceso de carcinogénesis pulmonar. La susceptibilidad del hospedero de padecer cáncer de pulmón está relacionada con el hábito tabáquico en un 90%, mientras que el otro 10% es debido a otros factores. El huésped que desarrolla cáncer de pulmón presenta una progresión celular descontrolada que se manifiesta en diferentes etapas. De acuerdo a la progresión e invasión de las células tumorales (células de color rosa) en la cavidad pulmonar se observa la etapa inicial del cáncer o pre-cáncer, la etapa temprana del cáncer y la etapa avanzada de cáncer ^(Modificada de 27).

Estadios del carcinoma pulmonar de células no pequeñas

El tumor pulmonar presenta diferentes cambios que se manifiestan por etapas: Etapa 0 o tumor *in situ*. Etapa IA, donde el tumor ha alcanzado un tamaño ≤ 3 cm, crece alrededor del pulmón o la pleura visceral, etapa IB si el tumor presenta una dimensión >3 cm y se ha diseminado menos de 2 cm hacia los bronquios. Etapa IIA, en la que el tumor se ha extendido alrededor de los bronquios y ganglios intrapulmonares, etapa IIB si el tumor se ha diseminado hacia el diafragma, la pared pulmonar y pleura. Etapa IIIA, en la que el tumor se extiende por la pared bronquial, la mayoría de los ganglios que se encuentran alrededor de los pulmones y el pericardio, y la etapa IIIB considerada como de estadio avanzado, pues el tumor se ha diseminado hacia el corazón, la tráquea y el esófago; y finalmente la etapa IV en la que se presenta una metástasis distante^{12, 31} (ver figura 2).



Los síntomas causados por el cáncer de pulmón pueden variar dependiendo del tipo de tumor y la etapa o progresión tumoral²⁸. Muchos pacientes pueden presentar inicialmente síntomas sistémicos no específicos como pérdida de peso, fatiga y falta de apetito, posteriormente se pueden presentar síntomas asociados a la presencia del tumor, como dolor torácico y disnea (dificultad para respirar)²⁹.

Derrame pleural

La invasión y extensión del tumor hacia el tejido adyacente puede invadir la pared pulmonar, causando una opresión torácica que genera dolor persistente y disnea¹², síntomas debidos principalmente a la acumulación del líquido pleural en el espacio intratorácico.

El derrame pleural se define como la acumulación anormal de líquido en el espacio pleural, una entidad patológica, resultado del desequilibrio entre la formación del líquido pleural y su reabsorción⁷. Entre las enfermedades más comunes que ocasionan derrame pleural se encuentran el cáncer pulmonar, la neumonía, la insuficiencia cardíaca y la tuberculosis, entre otras⁸.

Un proceso inflamatorio en el espacio pleural puede resultar en un incremento de la permeabilidad pleural vascular llevando a la acumulación del líquido pleural por la presencia del tumor²⁵, lo que altera los parámetros normales bioquímicos y citológicos dentro de la cavidad pleural, observándose un enriquecimiento en el líquido pleural de proteínas, células epiteliales, CMN (células mononucleares) e incluso células tumorales¹.

Tratamientos generales de cáncer de pulmón

Los diferentes tratamientos para el cáncer de pulmón se basan en la funcionalidad de los pulmones, el tipo histológico de cáncer y la etapa en la que se encuentra el paciente. Dentro de las opciones de tratamiento se encuentran la quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, la cirugía y el drenado de la cavidad pleural por toracocentesis, que se emplea como un tratamiento paliativo para remover el exceso de líquido pleural acumulado³¹.



Dentro de las alternativas terapéuticas para el cáncer de pulmón actualmente el sistema inmune es un blanco a desarrollar como tratamiento, particularmente para mejorar los tratamientos convencionales a los que muchos tumores ya han desarrollado resistencia.

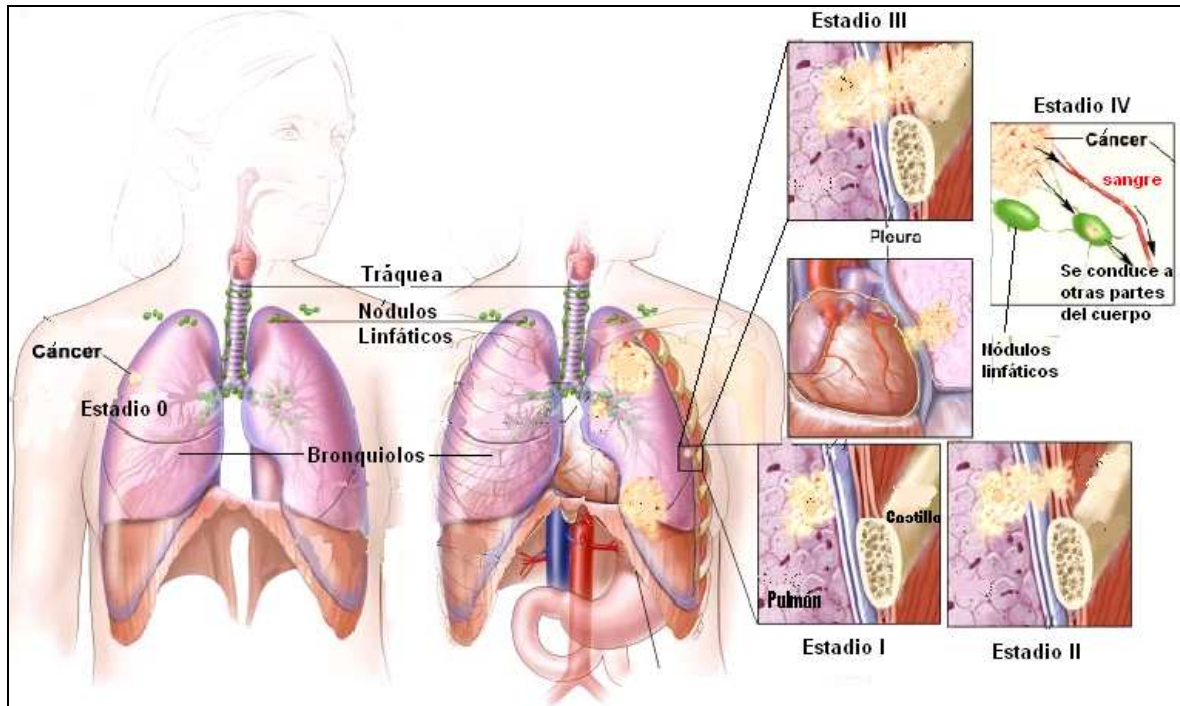


Figura 2. Estadios de progresión del cáncer pulmonar. El desarrollo del tumor se refleja en estadios que indican el nivel de invasión del tumor hacia el tejido circundante normal.



Generalidades de la respuesta inmune

El sistema inmune es una red interactiva de órganos linfoides, células, factores humorales y citocinas, cuya función es la defensa del hospedero, respondiendo a las alteraciones que causan un desequilibrio en la homeóstasis del organismo⁵⁰.

La respuesta inmune se divide en dos grupos: respuesta innata y respuesta adaptativa¹. La respuesta inmune innata provee la primera línea de defensa al hospedero, mediante mecanismos de defensa celulares y moleculares, que se presentan de manera natural en un organismo y están preparados para una rápida acción. Los principales componentes de la inmunidad innata son los siguientes: 1) barreras físicas y químicas, como los epitelios y las sustancias antimicrobianas formadas en sus superficies; 2) células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos) y linfocitos citolíticos naturales (NK, del inglés Natural Killer); 3) factores solubles, como el complemento y los mediadores de la inflamación; y 4) citocinas que regulan y coordinan la respuesta celular¹.

La respuesta inmune adaptativa es una respuesta de memoria, no inmediata, que consiste en reacciones antígeno-específicas mediadas por células linfoides: los linfocitos B y los linfocitos T. Los linfocitos T ya maduros se dividen en dos subpoblaciones diferentes: los linfocitos T CD4⁺ o linfocitos T cooperadores (Th, del inglés T helper), y los linfocitos T CD8⁺ o linfocitos T citotóxicos (CTLs). A su vez, las células Th se pueden subdividir en diferentes poblaciones de acuerdo al patrón de citocinas que secreten. Después de un estímulo, el linfocito precursor Th0 puede diferenciarse a Th1 o Th2 de acuerdo al perfil de citocinas que secretan. Las células de tipo Th1 pueden secretar, entre otras citocinas, Interleucina (IL)-2, que ayuda a las células pre-citotóxicas a proliferar e Interferón (IFN)- γ , que activa a los macrófagos y promueve la diferenciación de los CTLs; en cambio las células de tipo Th2, producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 que pueden ayudar a las células B a diferenciarse a células plasmáticas y secretar anticuerpos⁷¹.

Para generar una respuesta inmune eficaz, las distintas estirpes celulares del sistema inmune cooperan entre sí, mediante interacciones directas entre célula-célula, o bien mediante la secreción de diversas moléculas⁵⁰.



Características del linfocito T

Las células T expresan el receptor de la célula T (TCR), un heterocomplejo formado por las cadenas α y β que se encuentran unidas por un puente disulfuro; ambas cadenas son responsables del reconocimiento del antígeno y son clonalmente variables, permitiendo así un amplio repertorio de los TCRs. Además de estas cadenas, el complejo se complementa por la subunidad multiprotéica designada como CD3⁵⁸.

La subunidad multiprotéica está compuesta por cuatro diferentes polipéptidos que se asocian de manera no covalente entre sí: la cadena CD3 γ , CD3 δ y CD3 ϵ que se asocian a su vez en heterodímeros, y un homodímero invariante de la cadena ζ .

Las cadenas del TCR α y TCR β tienen dominios citoplasmáticos muy cortos, pero todas las proteínas asociadas en el complejo multiproteico tienen terminaciones citoplasmáticas con motivos conservados basados en tirosina (ITAMs) que permiten que se lleven a cabo fosforilaciones para la activación de la célula T⁵⁸.

El TCR también está asociado con las moléculas CD4 o CD8, glicoproteínas que definen el fenotipo del linfocito. Las moléculas CD4 y CD8 son importantes para el reconocimiento de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) que presenta el antígeno a la célula T. El CD4 reconoce la molécula del MHC II, mientras que el CD8 reconoce la molécula del MHC I. Este reconocimiento restringe a los antígenos presentados a las células CD4 o CD8, pues las moléculas de clase I del MHC asocian péptidos endógenos y las moléculas de clase II del MHC asocian antígenos endocitados. La expresión de las moléculas de clase I se presenta en la mayoría de las células nucleadas, mientras que las moléculas de clase II están restringidas a las APC (célula presentadora de antígenos profesionales, por sus siglas en inglés)⁵⁸.

Activación de los linfocitos T

La respuesta inmune mediada por los linfocitos puede dividirse en dos procesos: el reconocimiento de las moléculas asociadas entre el linfocito T y la APC; y la respuesta que genera el linfocito T tras dicho reconocimiento³.

De manera general para que la célula T pueda responder a un antígeno, éstas deben pasar principalmente por dos eventos. Primero, el TCR debe unirse con avidez al



complejo péptido-molécula del MHC de la APC. Segundo las moléculas coestimuladoras en la APC deben unirse a su receptor en la célula T, para confirmar la interacción entre el TCR y el complejo péptido-molécula del MHC y la célula T responda a estas interacciones (ver figura 3)^{30, 43}.

Primera señal: presentación del antígeno al linfocito T

Para que la célula T se active por una interacción del péptido asociado a la molécula del MHC; primero, las moléculas de adhesión deben estar presentes, tanto en el linfocito como en la APC. Las moléculas de adhesión facilitan el conjugado entre ambas células y ayudan a ambas células a permanecer en contacto durante su interacción; y segundo, para la generación de la sinapsis inmunológica, se debe formar una estructura llamada complejo de activación supramolecular (SMAC, por sus siglas en inglés). El SMAC se forma debido a cambios en el citoesqueleto de la célula T y la APC; y está integrado por el complejo TCR-CD3, el complejo péptido-MHC y el coreceptor CD4 o CD8³⁰.

Segunda señal: Coestimulación y coinhibición

Existen dos principales familias de moléculas coestimuladoras: la familia TNF/ TNFR y la familia B7/CD28. La familia TNF/TNFR presenta únicamente moléculas coestimuladoras, mientras que la familia B7/CD28 es heterogénea: presenta tanto moléculas coestimuladoras (CD28 e ICOS) como moléculas coinhibitorias (CTLA-4, PD-1, BTLA y B7-H4)³⁰. Actualmente, en ambas familias se han identificado una amplia variedad de moléculas coestimuladoras. Particularmente, en la familia B7/CD28 se han identificado las moléculas PD-1, PD-L1 y PD-L2, cuya función fisiológica principal es inhibitoria (ver figura 3)³⁰.

La familia de moléculas B7 proveen las principales señales de coestimulación y coinhibición que regulan la respuesta de la célula T. El rol principal de las moléculas coestimuladoras clásicas CD80/CD86: CD28/CTLA4 es regular la respuesta de la célula T naive en una etapa temprana de activación en el tejido linfático^{30, 75}.

La interacción entre el TCR y las moléculas coestimuladoras con sus respectivos ligandos, inducen a una traducción de señales que resulta en cambios en la expresión de genes³.



De manera inmediata, al interactuar el TCR con el complejo péptido-molécula del MHC, se activa la proteína tirosin-cinasa Lck, que se encuentra asociada a las terminaciones citoplasmáticas de las moléculas CD4⁺ y CD8⁺ y se encarga de fosforilar los ITAMs del CD3, en particular las cadenas ζ . Los residuos de tirosina fosforilados del CD3 y las cadenas ζ , se convierten en un sitio específico de acoplamiento para la enzima ZAP-70 con dominios SH2, los cuales se activan al ser fosforilados por la interacción con los dominios intracelulares del complejo multiproteico. A su vez, ZAP-70 recluta otras moléculas de señalización con dominios SH2 para desencadenar una cascada de señalización de fosforilación y desfosforilación, mediada por fosfatasas y tirosin cinasas, para la activación de factores de transcripción de varios genes que codifican para citocinas, receptores para citocinas y proteínas necesarias para la función efectora de las células T³. Algunos de estos genes son activados inmediatamente (en minutos) mientras otros son activados tempranamente (en horas) y otros tardíamente (en días)³⁰.

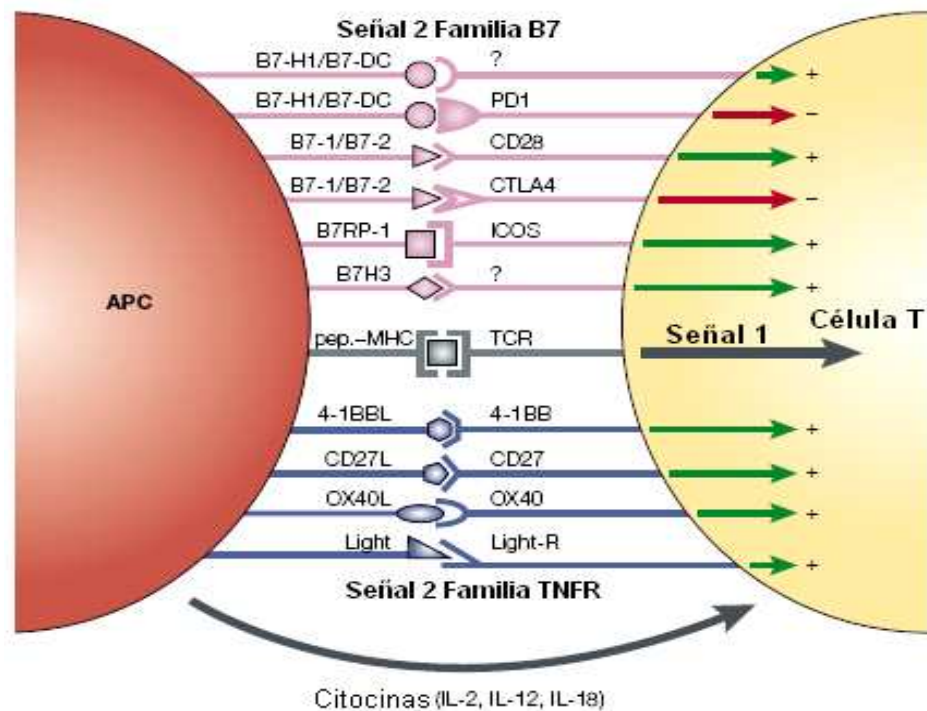


Figura 3. Activación del linfocito T. La activación de la célula T requiere de dos señales. La señal 1 liberada por la interacción entre el complejo TCR-CD3 y el complejo péptido-molécula del MHC y la señal 2 o señal de coestimulación, la cual se da por la asociación de diferentes moléculas pertenecientes a la familia B7/ CD28 y TNF/TNFR (tomada de 49).



Respuesta inmune en Cáncer

El sistema inmunológico está íntegramente involucrado en la homeostasis del tejido. Una alteración en el equilibrio del organismo alerta al sistema inmunológico para restablecer el ambiente; en una patología, tal como el cáncer, las células tumorales emiten señales de peligro que alertan tanto al sistema inmune innato como al adaptativo para reclutar células inmunes al sitio del tumor y montar una respuesta inmune en contra del tumor⁷⁶.

El sistema inmune tiene tres roles principales en la prevención del tumor. Primero, el sistema inmune puede proteger al hospedero de los tumores inducidos por virus, eliminando o suprimiendo la infección viral. Segundo, la oportuna eliminación de patógenos y una pronta resolución de la inflamación pueden prevenir que se establezca un ambiente inflamatorio que favorezca la tumorigénesis. Tercero, el sistema inmune puede identificar específicamente a las células tumorales, que expresan antígenos específicos del tumor o moléculas inducida por el estrés celular y eliminarlas, proceso denominado inmunovigilancia del tumor⁶³.

Por medio de la inmunovigilancia se identifica a las células cancerosas y/o pre-cancerosas y se eliminan antes de que estas puedan causar algún daño. Sin embargo, a pesar de la inmunovigilancia, el tumor prolifera dando pauta a que la respuesta inmune generada cambie y se manifieste dentro de un proceso de varias etapas denominado inmunoección⁶³.

Señales de alarma

El tumor puede dañar o alterar el tejido circundante, desencadenando una respuesta de estrés cuando se ve alterado el suministro normal de oxígeno y nutrientes en el tejido; este proceso puede causar un desequilibrio en el pH que resulta de disturbios en el metabolismo, en la generación de especies reactivas de oxígeno, en la sobre expresión de “factores de protección contra el estrés”, tales como las proteínas de choque térmico, que actúan como mediadores inflamatorios. Estos factores pueden contribuir a la muerte por necrosis o apoptosis, o bien al crecimiento progresivo del tumor y de forma indirecta a la desregularización de eventos genéticos y epigenéticos, conllevando



a la expresión de neoantígenos que le confieren a la célula tumoral una ventaja de supervivencia^{35, 56}.

En general, todos esos factores pueden actuar como “*señales de alarma*” que reclutan y activan células inmunes locales, tales como las células dendríticas (CDs), macrófagos, neutrófilos y células NK, las cuales activan a las células T para montar una respuesta inmune adaptativa en contra del tumor^{35, 56} (ver figura 4).

Inmunovigilancia

El concepto de que el sistema inmune puede reconocer y eliminar células transformadas nacientes, fue originalmente expresado en la hipótesis de Burnet y Thomas a mediados del siglo XX. De acuerdo con diversos modelos de ratones se propuso que el sistema inmune reconoce y protege al organismo en contra del tumor; indicando que el sistema inmune juega un rol crítico en contra de las células malignas transformadas^{17, 56}. Sin embargo, a pesar de que varias líneas de investigación evidenciaban con modelos experimentales la importancia del sistema inmune en controlar a las células transformadas, no se tenía un argumento convincente que explicará el cómo las células inmunes contrarrestaban el desarrollo de la neoplasia^{17, 56}. No obstante, a pesar de la poca credibilidad que se tenía al respecto, los nuevos reportes generados^(17,35,56), claramente demuestran la existencia de una inmunovigilancia tumoral, pero también indican que este proceso puede funcionar como un componente de otro proceso más general denominado inmunoedición⁶³.

Inmunoeedición

La incorporación de la inmunovigilancia dentro del concepto de inmunoeedición se dio porque se encontró que no sólo el sistema inmune protege al hospedero en contra del desarrollo del tumor, sino que también podía esculpir el fenotipo inmunogénico durante el desarrollo tumoral. El concepto de inmunoeedición da una amplia explicación de la participación del sistema inmune en el desarrollo del tumor, definido en tres fases denominadas: eliminación, equilibrio y escape⁶³.

Eliminación. El proceso de eliminación está mediado por la respuesta inmune innata y adaptativa. Esta fase considera que las células NK, NKT y monocitos/macrófagos, en



conjunto con los linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺, detectan y eliminan a las células tumorales que se han desarrollado. En general, estas células son activadas por citocinas pro-inflamatorias liberadas por macrófagos y células del estroma o por moléculas de alarma liberadas por las mismas células transformadas^{17, 56}.

Una vez que el tumor ha adquirido cierto tamaño, además de requerir irrigación sanguínea, que genera una demanda excesiva de nutrientes, es necesaria una remodelación del estroma que induce la liberación de alarminas, quimiocinas y citocinas pro-inflamatorias, por las células estromales y los macrófagos que se encuentran alrededor del tumor. Dichas señales pro-inflamatorias reclutan a las células circundantes del sistema inmune innato (células NK, CDs y macrófagos) al sitio del tumor^{17, 56}.

De manera inmediata las células tumorales que expresan moléculas asociadas al estrés celular o con deficiencias en las moléculas de MHC de clase I son reconocidas por las células NK para llevar a cabo su función efectora. Al ser reconocidas las células transformadas (por disminución o pérdida de la expresión de la molécula MHC-I) pueden ser eliminadas por apoptosis mediante una citotoxicidad limitada o mediante la producción de algunas citocinas con capacidad angiostática potente, lo que bloquea la formación de nuevos vasos sanguíneos dentro del tumor, e induce la muerte por necrosis de más células tumorales. Las células apoptóticas o necróticas expresan o liberan moléculas que favorecen su reconocimiento y fagocitosis por las células dendríticas inmaduras residentes en el tejido^{17, 56}.

Por un lado, las células dendríticas inician su migración a los ganglios linfáticos para efectuar la presentación de antígenos relacionados al tumor y por otro lado, las células NK y los macrófagos que fueron reclutados al sitio del tumor continúan produciendo citocinas principalmente IL-12 e IFN- γ , para potenciar la actividad citolítica tanto de las células NK como de las células T citotóxicas y con ello incrementar la muerte de un mayor número de células tumorales, por la activación de mecanismos citotóxicos, tales como la vía citolítica perforina-granzima, TRAIL/TRAILR, Factor de necrosis tumoral (TNF)- α y el incremento de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno^{56, 63}.

Por otro lado, mientras las células dendríticas viajan hacia los ganglios linfáticos maduran, lo que les permite efectuar la presentación de los péptidos (antígenos-



tumorales asociados a las moléculas MHC de clase II a las células TCD4⁺ naive (inmaduras) para activarlas y que éstas a su vez liberen citocinas que favorezcan una respuesta celular de tipo Th1 (IL-2, IFN- γ , etc.) que ayude a la proliferación y maduración de los linfocitos T citotóxicos, los cuales previamente reconocieron en las células dendríticas péptidos de antígenos tumorales asociados a las moléculas de MHC de clase I^{56, 63}.

Los linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺ activados salen del ganglio linfático, migran por el torrente sanguíneo y llegan al sitio del tumor, donde los CTLs efectores reconocen a las células tumorales y las eliminan; la activación de los CTLs es exacerbada por la producción de IFN- γ por parte de los linfocitos TCD4⁺ y otras células inmunes^{56, 63}.

En esta fase, la eliminación de las células tumorales puede ser *completa*, cuando las células tumorales han sido eliminadas en su totalidad, o bien, *incompleta* cuando sólo una fracción de células tumorales ha sido eliminada. En el caso de que la eliminación sea incompleta o parcial, la teoría de la inmuoedición considera otra fase, en la que existe un estado temporal de equilibrio en el que se puede favorecer la progresión del sistema inmune o del tumor^{56, 63} (ver figura 4).

Equilibrio. En esta fase se producen gradualmente células tumorales capaces de resistir a la acción efectora de diversas células del sistema inmune. Este proceso lleva a la inmunoselección de las células tumorales con una reducción de la inmunogenicidad, pues las células T CD4⁺ y CD8⁺ tumor específicas funcionales, eliminan una alta cantidad de células tumorales inmunogénicas, pero permite que las células tumorales no-inmunogénicas puedan tomar ventaja y proliferar.

Durante este período se lleva a cabo un proceso de selección natural de tipo darwiniana, donde muchas variantes de células tumorales son eliminadas pero surgen nuevas clonas portando diferentes mutaciones que dan como resultado poblaciones tumorales heterogéneas y genéticamente más inestables, las cuales incrementan gradualmente su resistencia al sistema inmune^{56, 63}(ver figura 4).

Dado que esta fase involucra la continua eliminación de las células tumorales y la producción de variantes celulares resistentes a la presión que ejerce la selección del sistema inmune, se considera que este es el proceso más largo de la inmuoedición ya que puede transcurrir durante varios años^{56, 63}.



La respuesta inmune durante esta fase falla, pues no es suficiente para controlar eventualmente la progresión del tumor y no elimina por completo al tumor, lo que resulta en la selección de variantes de las células tumorales, que son capaces de resistir, esquivar o suprimir la respuesta inmune antitumoral, llevando a la fase de escape^{56, 63}.

Escape. Durante esta última fase, el sistema inmune ya no es capaz de reprimir o controlar el crecimiento del tumor, dando como resultado el crecimiento progresivo del mismo y su manifestación clínica. En esta etapa, la gran mayoría de las células tumorales presentan mecanismos de evasión que inhiben o bloquean la participación de la respuesta inmune del huésped^{56, 63} (ver figura 4).

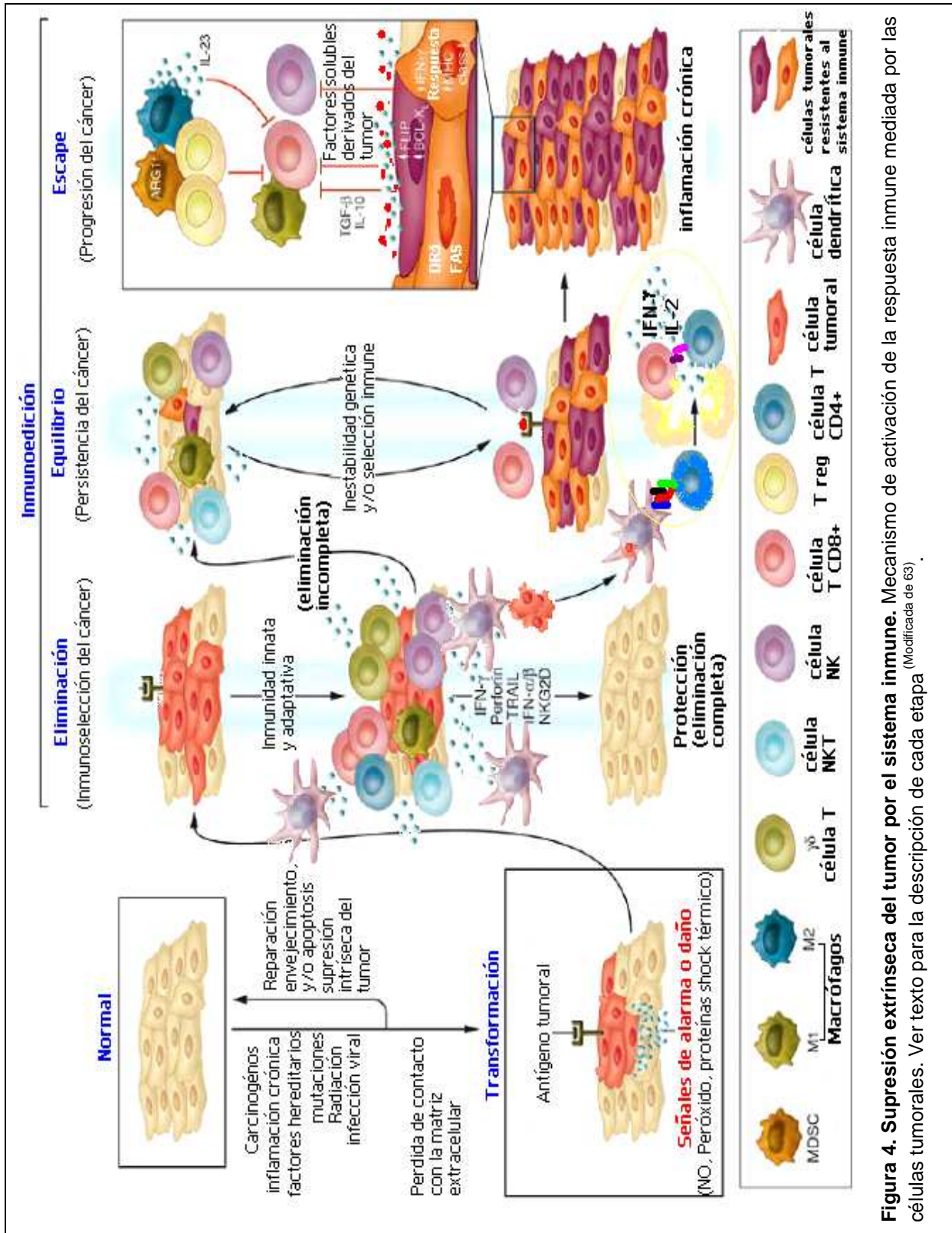


Figura 4. Supresión extrínseca del tumor por el sistema inmune. Mecanismo de activación de la respuesta inmune mediada por las células tumorales. Ver texto para la descripción de cada etapa. (Modificada de 63)



Mecanismos de evasión tumoral

Las células tumorales deben superar barreras intrínsecas y extrínsecas para llevar a cabo la progresión tumoral. Durante este proceso las células tumorales adquieren diferentes características englobadas como mecanismos de evasión tumoral⁵⁷.

Los mecanismos moleculares por los cuales las células cancerosas evaden el sistema inmune del hospedero están involucrados con diferentes funciones celulares. Entre ellos se encuentran: pérdida o disminución en la expresión de las moléculas MHC de clase I, alteraciones en la vía de procesamiento de antígenos, secreción de citocinas inmunosupresoras, señalización defectuosa en la apoptosis, inactivación de las células T y la carencia de coestimulación, entre muchos otros. A continuación se detalla la participación de algunos de estos mecanismos de evasión en la progresión maligna de las células tumorales⁵⁷.

a) Pérdida o disminución en la expresión de las moléculas del MHC clase I y alteraciones en la vía de procesamiento de los antígenos

Se han identificado muchos defectos en los componentes de la vía de procesamiento de antígenos asociados con el escape tumoral, incluyendo la pérdida o disminución de la expresión de las moléculas MHC clase I que conduce a una inmunoresistencia del hospedero por las deficiencias en la presentación de péptidos antigénicos; en las deficiencias debidas a mutaciones en el proteasoma, β_2 -microglobulina, moléculas TAP o moléculas chaperonas. Alteraciones en la vía del procesamiento de antígenos, impide que se lleve a cabo una eficiente presentación de péptidos tumorales a las células T CD8⁺, bloqueando su activación y el posterior reconocimiento de las células tumorales por los CTLs efectoras³⁵ (Ver figura 5 inciso a).

b) Secreción de factores solubles por las células tumorales

Las células tumorales pueden secretar al microambiente factores solubles involucrados con la apoptosis o mediadores de la inflamación que incluyen intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno, prostaglandinas y citocinas inflamatorias⁵⁷.

Dentro del microambiente tumoral la respuesta inmune puede ser regulada de manera anti-inflamatoria por los factores solubles derivados del tumor, como es el caso de la fosfatidil serina soluble (sPS), un aminofosfolípido que media la fagocitosis de las



células apoptóticas por los fagocitos (macrófagos y células dendríticas), desencadenando una respuesta inmune anti-inflamatoria por la liberación de factores como IL-10, factor de crecimiento transformante- β (TGF- β por sus siglas en inglés), y prostaglandina E₂ (PGE₂), que inhiben la respuesta inmune mediada por las CD_s y la célula T y decrece la secreción de citocinas pro-inflamatorias como IL-12⁵⁷.

Durante la respuesta anti-inflamatoria el TGF- β derivado de los macrófagos previene la maduración de las CD_s presentadoras de antígenos, lo que inhibe la activación de las células NK y los CTLs. Adicionalmente a que este factor también promueve la proliferación de las células estromales y los macrófagos, induciéndolos para secretar factores angiogénicos como el VEGF^{35, 57}. Las células estromales por su cuenta producen PGE₂ y citocinas de tipo Th2 (IL-4 e IL-10), que potencian a su vez la expresión de moléculas antiapoptóticas^{35, 57}.

Por un lado, las células tumorales pueden secretar citocinas de tipo Th2, como factores de crecimiento autocrinos para el tumor⁵⁷. Por otro lado, las células inmunes pueden secretar citocinas de tipo Th2, estimuladas por las células tumorales. Un perfil de citocinas tipo Th2, conduce a una ineficiente respuesta inmune antitumoral y lleva a la producción de factores solubles inmunosupresores⁵⁷ (Ver figura 5 inciso b).

c) Evasión de la apoptosis

Las células tumorales pueden adquirir resistencia a las señales de inducción a la apoptosis⁷⁷. La apoptosis se puede iniciar por dos principales vías: la vía mitocondrial, la cual involucra una permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP, por sus siglas en inglés) y la vía mediada por receptor, en la cual se involucra la interacción del ligando-receptor en la membrana plasmática para conducir a la formación del complejo de señalización de inducción de muerte. Ambas vías se caracterizan por típicos cambios morfológicos y conllevan a la activación de las caspasas⁷⁷.

Uno de los mecanismos de evasión tumoral está mediado por la participación de moléculas en forma soluble involucradas con la apoptosis, tal como sFas (Fas en forma soluble); sFas secretado por el tumor puede interactuar con FasL sobre los CTLs e inhibir de esta manera la vía de apoptosis mediada por Fas^{56, 57}. Adicionalmente, una



alteración en la expresión de FasL en las células tumorales es capaz de contraatacar a los CTLs, conduciéndolos a apoptosis^{56, 57}.

Otro mecanismo con el que las células tumorales pueden adquirir resistencia a la apoptosis, implica la expresión de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, las cuales son importantes inhibidores externos de MOMP o también por una baja expresión o mutación en las proteínas pro-apoptóticas como Bax^{76, 77}.

Particularmente, las células tumorales pueden inducir a apoptosis a los linfocitos T por la acción citotóxica producida por el estrés oxidativo en el sitio del tumor o por activación crónica, que conduce a la célula a un estado de agotamiento³⁰ (Ver figura 5 inciso c).

d) Carencia de coestimulación de la célula T

La presencia de moléculas coestimuladoras positivas y negativas provee al organismo un mecanismo natural para controlar al sistema inmunológico¹⁸, por lo que las células tumorales pueden desbalancear este sistema. La carencia de expresión de moléculas coestimuladoras por las células tumorales puede llevar a un estado de anergia a la célula T, que se caracteriza por una hiporespuesta después del encuentro con el antígeno tumoral, además de presentar una inmunoregulación y supresión en la proliferación de la célula T^{11, 35}, o en su defecto, las células tumorales pueden sobreexpresar moléculas coinhibitorias (como PD-L1 y PD-L2) que al interactuar con su receptor en las células T, estas desarrollan una tolerancia inmunológica que las inhabilita para producir o responder a las señales de proliferación o activación celular^{30, 72} (ver figura 5 inciso d).

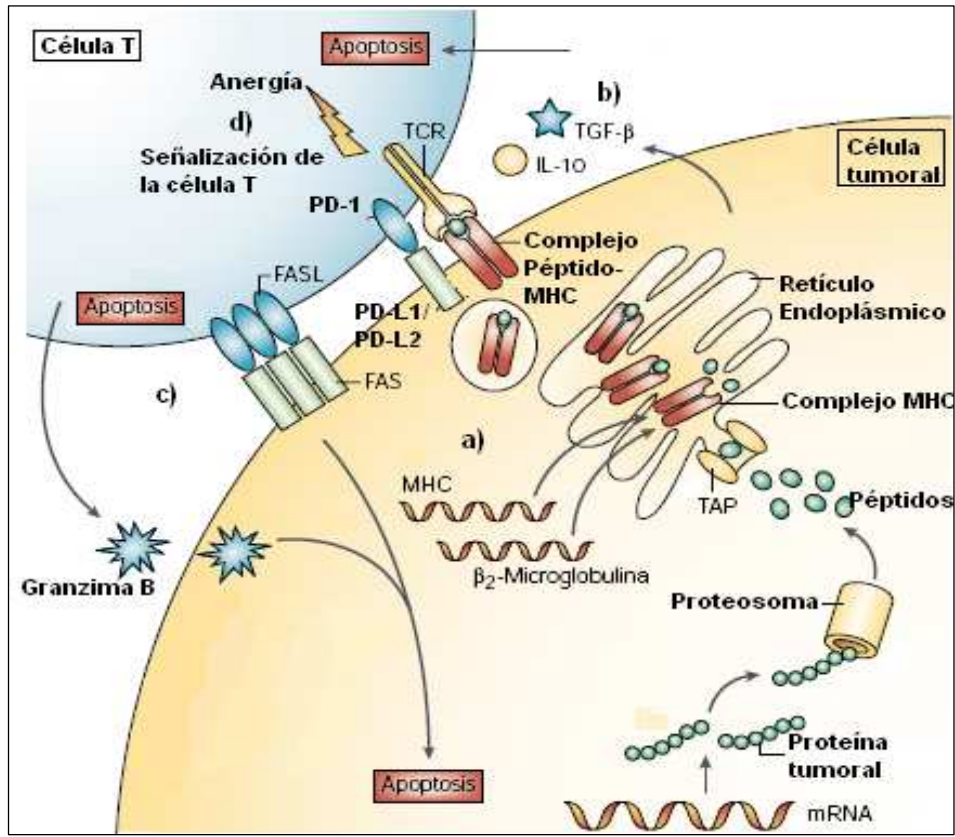


Figura 5. Mecanismos de evasión tumoral. a) Alteraciones en la vía de procesamiento de los antígenos y pérdida o disminución en la expresión de las moléculas MHC de clase I. b) Secreción de factores solubles por las células tumorales. c) Evasión de la apoptosis. d) Carencia de coestimulación de la célula T (Modificada de 74).



ANTECEDENTES

Uno de los factores más importantes que favorecen la supervivencia y propagación de las células tumorales es la evasión a la respuesta mediada por los linfocitos T. Uno de los mecanismos de evasión del tumor hacia los linfocitos T está dado por la vía PD-1: PD-L1/ PD-L2³⁴.

Vía PD-1: PD-L1/ PD-L2

En la familia B7 se han identificado dos vías claves en la regulación de la respuesta de la célula T: la vía mediada por CD80/CD86:CD28/CTLA-4 y la vía de PD-1: PD-L1/PD-L2⁷⁸.

La vía consiste en la interacción del receptor de muerte programada-1 (también conocido como PD-1, PDCD1 o CD279) y sus dos ligandos: PD-L1 (también nombrado B7-H1, B7-H y CD274) y PD-L2 (también llamado B7-DC, B7-H2, PDCD1LG2 y CD273)^{22, 34}. La vía mediada por estas moléculas, tiene una función de regulación negativa y jugar un importante rol en la evasión inmune a las células T tumor específicas^{6, 34}. Dado que el presente trabajo se enfoca a la vía mediada por el receptor PD-1 y sus ligandos PD-L1 y PD-L2, se abordará a detalle en diferentes apartados la información referente a estas moléculas.

Propiedades de PD-1, PD-L1 y PD-L2

Estructura de las proteínas

PD-1, PD-L1 y PD-L2 son monómeros. PD-1 contiene un único ectodominio IgV, dominio típico en la familia de CD28, mientras PD-L1 y PD-L2 están compuestos por dos dominios uno IgV y otro IgC típicos de la familia B7. Las moléculas muestran que existe una relación estequiométrica de receptor-ligando de 1:1, con una interacción entre los dominios IgV²⁰ (ver figura 6).

El gen *Pdcd1*, ubicado en el cromosoma 2, codifica para PD-1, una proteína transmembranal compuesta por un dominio de la superfamilia de las Inmunoglobulinas (Ig), un dominio transmembranal y un dominio intracelular que contiene un motivo



inhibitorio basado en tirosina de inmunoreceptores (ITIM) así como un motivo de cambio basado en tirosina (ITSM)³⁴.

Tanto PD-L1 como PD-L2 son proteínas transmembranales codificadas por los genes *Cd274* y *Pdcd1lg2*, respectivamente, ambos ubicados en el cromosoma 9³⁴. La principal diferencia estructural entre PD-L1 y PD-L2 está dada por la presencia de 14 aminoácidos más en la región IgV de PD-L2, lo que acorta el ángulo de distancia de interacción entre PD-1 y PD-L2²⁰. Se ha demostrado en este sentido, que PD-L2 tiene una afinidad a PD-1 de dos a seis veces mayor que PD-L1⁷¹.

Expresión de PD-1 y sus ligandos

Se ha encontrado que PD-1 es expresado en los timocitos en la etapa de transición de dobles negativos (CD4⁻ CD8⁻) a dobles positivos (CD4⁺ CD8⁺)⁶, en las células T CD4⁺ y CD8⁺, las células B y las células mieloides. Las células NKT también han mostrado que expresan bajos niveles de PD-1³⁴. Además estudios complementarios, han demostrado que en afecciones crónicas como cáncer e infecciones causadas por virus como VIH y virus de la hepatitis B y C, PD-1 es sobreexpresado en las células T virus o tumor específicas^{20, 21}.

Los ligandos de PD-1 tienen diferentes patrones de expresión. PD-L1 y PD-L2 están más ampliamente expresados que otros miembros de la superfamilia B7. PD-L1 se expresa constitutivamente sobre las células B, CDs, macrófagos y mastocitos. Además se expresa en una amplia variedad de tipos celulares no hematopoyéticos, tal como las células del endotelio vascular, células epiteliales, células del músculo, hepatocitos, células del páncreas y astrocitos en el cerebro, así como en sitios inmunoprivilegiados, como la placenta y la córnea⁵⁹.

También se ha observado que PD-L1 está sobreexpresado en células involucradas en infecciones crónicas como: monocitos de sangre periférica y en CDs mieloides en pacientes con hepatitis B, en monocitos y células T en pacientes con VIH³⁴; y en una amplia cantidad de cánceres humanos como cáncer de laringe, pulmón, estómago, colón, mama, cervix, ovario, células renales, vejiga y melanoma^{6, 22}.

La expresión de PD-L2 está restringida a células presentadoras de antígenos profesionales como: las CDs, macrófagos y mastocitos activados^{34, 36}. Aunque



adicionalmente, la expresión de PD-L2 se ha observado en varias líneas tumorales murinas, se conoce poco acerca de su expresión en tumores humanos³⁶.

Vía de señalización de PD-1: PD-L1/PD-L2

En proximidad al complejo de señalización del TCR, PD-1 libera una señal coinhibitoria al interactuar con cualquiera de sus dos ligandos, PD-L1 o PD-L2. La asociación de PD-1 con sus ligandos resulta en la fosforilación de las tirosinas del dominio citoplasmático¹⁹. Las dos fosfatasas SHP-2 y en menor medida SHP-1, pueden unirse a los motivos ITIM e ITSM de PD-1 y afectar directamente la activación de la célula T, por desfosforilaciones en los intermediarios clave de señalización del TCR^{18, 34} (ver figura 6).

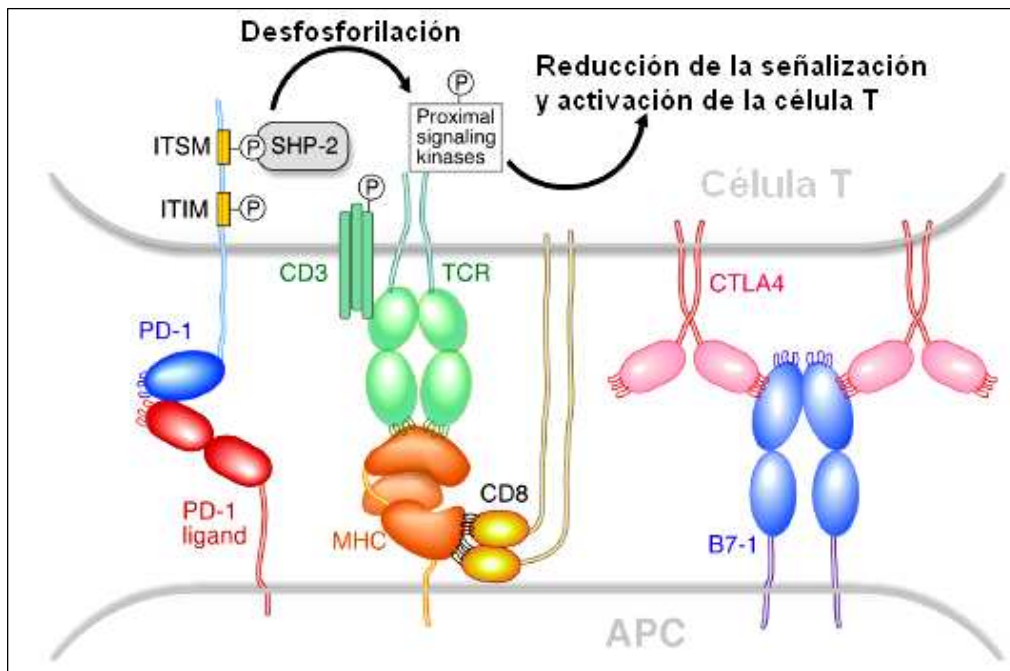


Figura 6. Estructura y vía de señalización de PD-1 y PD-L1. La interacción entre PD-1 y PD-L1 está dada por sus dominios IgV extracelulares. Esta asociación recluta la fosfatasa SHP-2 intracelular, para que se una a los dominios ITSM e ITIM de PD-1 y atenúe la activación de la célula T (Tomada de 20).

La interacción de PD-1/ PD-L inhibe varias vías de señalización citoplasmáticas en la célula T; Se ha demostrado que inhibe directamente la cascada de señalización inicial de la célula T impidiendo la fosforilación de moléculas como CD3 ζ , ZAP70 y PKC θ .



También se ha reportado que inhibe la actividad de PI3K y cascada abajo inhabilita a Akt o puede reducir la activación de Erk; esté último efecto puede ser resultado de la señalización mediada por la desfosforilación de los receptores de citocinas, particularmente citocinas que activan STAT5, tal como IL-2, IL-7 e IL-15^{18, 34}.

Regulación de la respuesta inmune mediada por PD-1: PD-L

Aunque el rol exacto que juegan los miembros individuales de la vía PD-1: PD-L no es claro, nuevos reportes proveen avances de cómo la vía PD-1: PD-L se comporta en condiciones fisiológicas normales o patológicas⁷¹.

Función inmunológica de PD-1

La tolerancia central es la habilidad para identificar y eliminar los linfocitos con receptores autoreactivos en su desarrollo temprano, antes de que ellos puedan causar algún daño. Debido a que este mecanismo no es perfecto, los linfocitos que escapan de esta selección y circulan periféricamente como causantes potenciales de una enfermedad autoinmune, pueden ser regulados por otro proceso denominado tolerancia periférica³⁰. En este sentido, la vía PD-1: PD-L es capaz de generar y mantener la tolerancia inmunológica central y periférica, no sólo durante la fase inicial de activación de las células T, sino también en la expansión de la población de células T o interviniendo en la función efectora de estas células^{38, 59}.

En el timo después de la interacción del TCR, PD-1 se sobreexpresa en los timocitos dobles positivos (CD4⁺ CD8⁺), de tal forma que PD-1 puede participar en la selección del repertorio TCR $\alpha\beta$ al controlar el umbral de señalización del TCR⁵⁹. Las células T autoreactivas que escapan de la selección negativa son controladas en la periferia por la vía PD-1: PD-L. PD-1 controla el encuentro inicial entre la célula T autoreactiva y las CDs, marcando la diferencia entre la activación y la tolerancia. PD-1 parece ser más efectivo en limitar la respuesta en situaciones involucradas con una baja afinidad de los TCRs o con las células T débilmente activadas⁵⁹. PD-L1 en las células no hematopoyéticas parece ser clave para mediar la tolerancia en el tejido y controlar la intensidad de la respuesta de las células T efectoras³⁴. Otro importante mecanismo de tolerancia periférica mediado por la vía PD-1: PD-L implica a las células T reguladoras



(T_{reg}), las cuales pueden suprimir la activación de la célula T bloqueando la proliferación y producción de citocinas^{34, 59}.

La expresión de los ligandos de PD-1 en sitios inmunoprivilegiados como la placenta y la córnea, los protege de la respuesta inmune. Tanto en el ojo como en la placenta PD-L1 inhibe la activación de la célula T, promoviendo en la placenta la tolerancia fetomaterna y en el ojo inhibe la infiltración de las células inflamatorias⁵⁹.

De manera general la función fisiológica de la vía PD-1: PD-L1/PD-L2 es limitar, atenuar o finalizar la respuesta de la célula T, para prevenir la activación de la célula T y el daño a los órganos durante la respuesta inmune^{78, 18}.

Implicación de PD-1 y sus ligandos en patologías

Se ha reportado que PD-1 y sus ligandos juegan un rol importante en regular la respuesta inmune contra microorganismos que causan infecciones agudas y crónicas³⁴.

Los virus que causan patologías crónicas han desarrollado mecanismos para la evasión y/o modificación de la respuesta inmune del hospedero, resultando en la persistencia de la infección¹⁸. Se ha reportado que los virus que causan infecciones crónicas, regulan la función de la célula T virus específica causando una pérdida de las funciones (incluyendo producción de citocinas, potencial citotóxico y potencial de proliferación) y por ende las células T no ejercen una respuesta antiviral eficiente; en este sentido, PD-1 puede participar en la supresión de la respuesta antiviral mediada por los linfocitos TCD8⁺, ocasionando un agotamiento o desregulación funcional en la célula T^{18, 34}. El agotamiento de la célula T CD8⁺ es característico de infecciones virales crónicas como: VIH, hepatitis B y C^{21, 34}.

La vía PD-1: PD-L también juega un papel importante en la cronicidad de la infección por *Helicobacter pylori*, que causa gastritis crónica, úlceras gastroduodenales y es un factor de riesgo para desarrollar cáncer gástrico, pues se ha observado que PD-L1 se sobreexpresa en las células epiteliales gástricas, expuestas a *H. pylori*. Además, se ha observado que PD-L1 está sobreexpresado en la mucosa gástrica de individuos infectados con *H. pylori*, quienes también mostraron un marcado incremento en la población de células T_{reg}. Esto sugiere que PD-L1 puede promover la supresión de la



célula T y la infección puede persistir al controlar la dinámica entre las células T_{reg} y las células T efectoras durante la infección con *H. pylori*³⁴.

Otros reportes indican que en infecciones persistentes con *Mycobacterium tuberculosis* o *Mycobacterium leprae*, la expresión de PD-1 en las células T se asocia con una disminución en la proliferación y alteración en la producción de citocinas^{33, 59}.

Vía PD-1: PD-L1/ PD-L2 en la evasión tumoral de la respuesta inmune

Se ha reportado que PD-L1 se expresa en diversos tumores y que actúa suprimiendo la función de las células T (ver tabla 1)^{18, 34}. Adicionalmente se ha encontrado que PD-1 está sobreexpresado en los linfocitos infiltrantes de tumor, lo que puede también contribuir a la inmunosupresión del tumor³⁴.

Por otro lado, la función de PD-L2 en tumores sigue siendo desconocida y sólo pocos reportes han sugerido que PD-L2 puede también jugar algún rol en la inmunidad del tumor. Un trabajo reciente, mostró que la expresión de PD-L2 por las células tumorales inhibe a las células T tanto en la fase inicial como en la fase efectora de inmunidad antitumoral³⁴. Otro reporte indica que en cáncer esofágico, la expresión de PD-L2 puede ser un factor crítico para promover el crecimiento del tumor y la metástasis, además de estar asociado con un pobre pronóstico⁴⁶. Sin embargo, es poca la información que se tiene acerca de la relevancia clínica de PD-L2⁴⁶, es por eso su importancia de estudio.



Tabla 1. Expresión de B7-H1 en cánceres humanos y su asociación inmunológica, clínica y patológica (Modificada de 78)

Tipo de cáncer humano	Casos B7-H1 ⁺ /total de casos*	Asociación inmunológica, clínica y patológica
Cáncer de mama	24/56	Presencia de células tumorales B7-H1 ⁺ se correlaciona con el tamaño del tumor, etapa y expresión HER2.
Cáncer de colón	16/25	ND
Cáncer Gástrico	45/105	Expresión de B7-H1 se correlaciona con el incremento en el tamaño tumoral, metástasis y poca supervivencia.
Glioma	10/10	Expresión de B7-H1 por las células tumorales que inhiben la activación de las células T <i>in vivo</i>
Leucemia	17/30	Expresión de B7-H1 en células de leucemia no tuvo efecto en la activación de las células T <i>in vitro</i>
Cáncer de pulmón	86/87	Regiones B7-H1 ⁺ de tumores contienen pocas células T en cáncer de pulmón de células no pequeñas
Melanoma	22/22	ND
Mieloma múltiple	82/82	Células plasmáticas B7-H1 ⁺ que inhiben la activación de la célula T <i>in vitro</i>
Cáncer esofágico	18/41	La expresión de B7-H1 está asociada con un pobre pronóstico
Cáncer de ovario	82/93	La expresión de B7-H1 por las células tumorales está asociada con un decremento en el número de células T en el tumor y con un pobre pronóstico. Las CDs B7-H1 ⁺ asociadas al tumor inhiben la función de la célula T
Cáncer pancreático	20/51	La expresión de B7-H1 por las células tumorales está asociada con un decremento en el número de células T tumor específicas y un pobre pronóstico.
Linfoma periférico de células T	7/11	ND
Carcinoma de células renales	130/196	La expresión de B7-H1 por las células tumorales está asociada con un pobre pronóstico.
Neoplasma del timo	28/34	ND
Cáncer urotelial	142/268	La expresión de B7-H1 por las células tumorales está asociada con etapas avanzadas, recurrencia y poca supervivencia

* Los datos de cada tipo tumoral se reunieron de más de un reporte.
ND: No se determinó una asociación inmunológica, clínica o patológica.

Se ha hipotetizado que la expresión de PD-L1 en las células tumorales inhibe a las células T tumor específicas PD-1 positivas mediante la interacción PD-1: PD-L1⁶.

Las células tumorales que expresan PD-L1 pueden evadir la inmunidad de la célula T por distintos mecanismos: evasión de apoptosis, inducción de un estado de anergia, inducción de agotamiento, inducción de la producción de la citocina inmunosupresora IL-10 y promoción de la supresión mediada por las células T_{reg}⁷⁸ (ver figura 7).



Apoptosis. Varios estudios han demostrado que la apoptosis mediada por PD-L1 es un proceso fisiológico común usado por el hospedero para mantener la homeostasis en el tejido periférico. Particularmente, en un reciente reporte indican que líneas de células tumorales PD-L1⁺ en cocultivo con linfocitos T, incrementa la apoptosis de las células T. El mecanismo molecular de la apoptosis mediada por PD-L1 aún no se ha aclarado⁷⁸.

Anergia. La expresión de PD-L1 puede observarse en los tejidos periféricos, mientras que PD-1 se expresa en las células T activadas, por lo que se ha propuesto que como mecanismo de regulación de la respuesta inmune la célula T efectora PD-1⁺, tras la presentación del antígeno en los ganglios linfáticos, migra al tejido periférico y llega a ser funcionalmente anérgica cuando se asocia con PD-L1 expresado en los tejidos periféricos. En el contexto de evasión tumoral, se ha encontrado que las células T infiltrantes de tumor incrementan la expresión de PD-1 y su actividad disminuye al asociarse con PD-L1 expresado por las células tumorales^{39, 78}.

Agotamiento. Este efecto fue revelado en estudios de infecciones crónicas, donde PD-1 es sobreexpresado en las células T antígeno-específicas, que están funcionalmente exhaustas y PD-L1 ha sido detectado en tejido y en órganos linfoides infectados. En este sentido, el cáncer puede ser considerado una enfermedad inflamatoria crónica⁷⁸. Un reciente estudio mostró que PD-1 se sobreexpresa en las células T infiltrantes de tumor en pacientes con melanoma y el bloqueo de PD-1 incrementa la función y proliferación de las células T antígeno-específicas. Estos experimentos, indican que la interacción entre PD-L1 y PD-1 puede resultar en un agotamiento de la célula T tumor específica⁷⁸.

Producción de IL-10. Una amplia variedad de estudios han establecido una correlación entre la sobreexpresión de PD-L1 y el incremento de los niveles de IL-10 en pacientes con patologías crónicas⁷⁸. Recientemente se encontró que las células T activadas que expresan PD-1, al interactuar con PD-L1 sobre las células tumorales incrementan la producción de IL-10, citocina responsable de la reducción de la proliferación de la célula T, inhibe la respuesta inmune, reduce la expresión de moléculas MHC e induce anergia²². Estudios subsecuentes *in vitro* demostraron que



PD-1 en forma soluble incrementa la producción de IL-10 en células TCD4⁺, vía PD-1: PD-L1³⁴.

Supresión mediada por las células T_{reg}. Se ha reportado que los tumores pueden inducir la presencia de las células T_{reg} como mecanismo de evasión de la respuesta inmune. En este sentido, la habilidad de las células T_{reg} para suprimir la activación de la célula T puede ser debida a la interacción de PD-L1 con PD-1. Hay varios mecanismos por los que las células T_{reg} podrían tener un efecto sobre las células T efectoras, incluyendo la activación, diferenciación, migración y supresión. En torno a esto, se ha demostrado que en linfomas las células T_{reg} pueden expresar PD-L1 e inhibir a las células T⁷⁸.

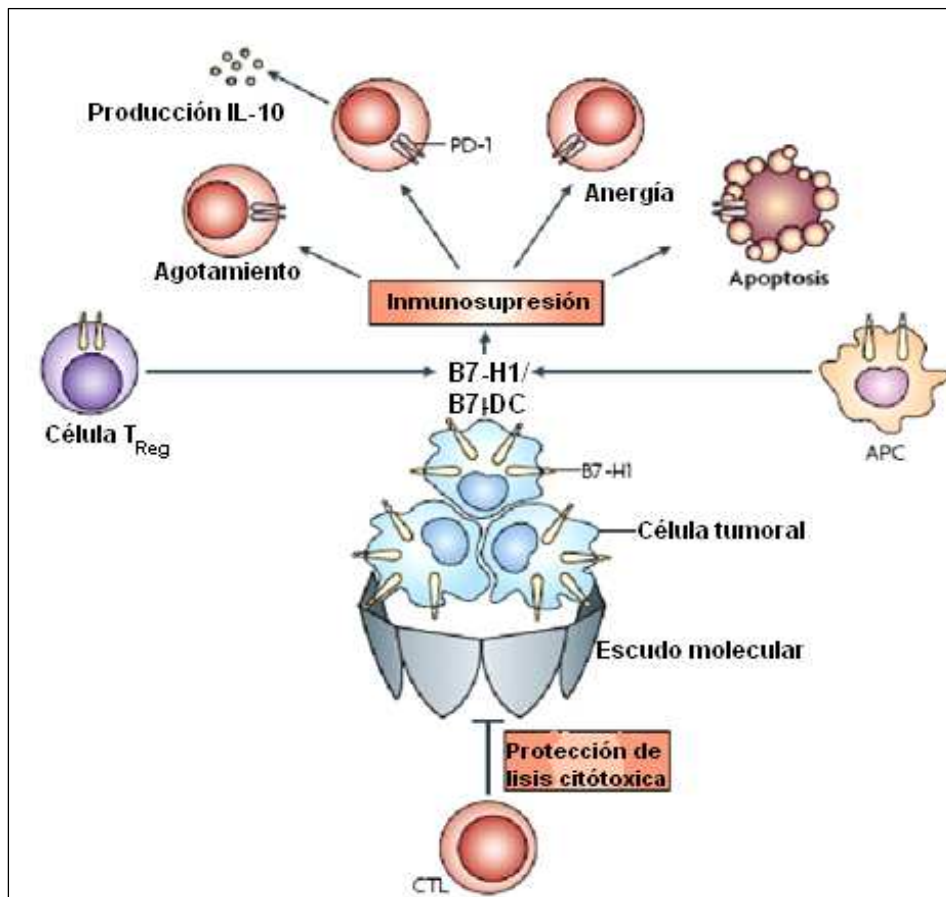


Figura 7. Acción inhibitoria de PD-L1 y PD-L2 en la evasión inmune del tumor. Las células tumorales y APCs PD-L1⁺ y/o PD-L2⁺ pueden inducir a apoptosis, anergia, agotamiento funcional o producción de IL-10 en la célula T. Además, las células T_{reg} asociadas a tumor pueden expresar PD-L1 y mediar la supresión de la célula T a través de la vía PD-1: PD-L1. Ver texto referente para cada apartado (Modificado de 78).



Se ha demostrado que PD-L1 y PD-L2 al interactuar con el receptor PD-1 expresado en los linfocitos T impiden la activación del linfocito T. Sin embargo, en una amplia gama de estudios que se han realizado sobre la participación de la respuesta inmune en cáncer, se han efectuado pocos estudios que analizan la expresión de PD-L1 y PD-L2 en células tumorales de cáncer pulmonar como mecanismo de evasión inmune del tumor.

El determinar si la expresión de PD-L1 y PD-L2 en las células tumorales de cáncer pulmonar así como la expresión de PD-1 en el linfocito T, actúan como un medio para que el tumor altere la funcionalidad del linfocito T (en la que se afecta su proliferación, producción de citocinas y citotoxicidad) como mecanismo de evasión tumoral, permitirá diseñar un estudio clínico enfocado al bloqueo de la interacción PD-1: PD-L1/PD-L2 como un posible tratamiento para controlar la progresión de las células tumorales con la participación eficiente de los linfocitos T.



HIPÓTESIS

En los pacientes con carcinoma pulmonar, las células tumorales expresarán los ligandos PD-L1 o PD-L2 como un mecanismo de evasión tumoral hacia la respuesta inmune, si hay un incremento de los linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺ PD-1 positivos.

OBJETIVOS

Determinar la presencia de PD-L1 y PD-L2 en líneas celulares y en células tumorales obtenidas de derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar.

Determinar el porcentaje de linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺ PD-1 positivos en muestras obtenidas de pacientes con adenocarcinoma pulmonar.



OBJETIVOS PARTICULARES

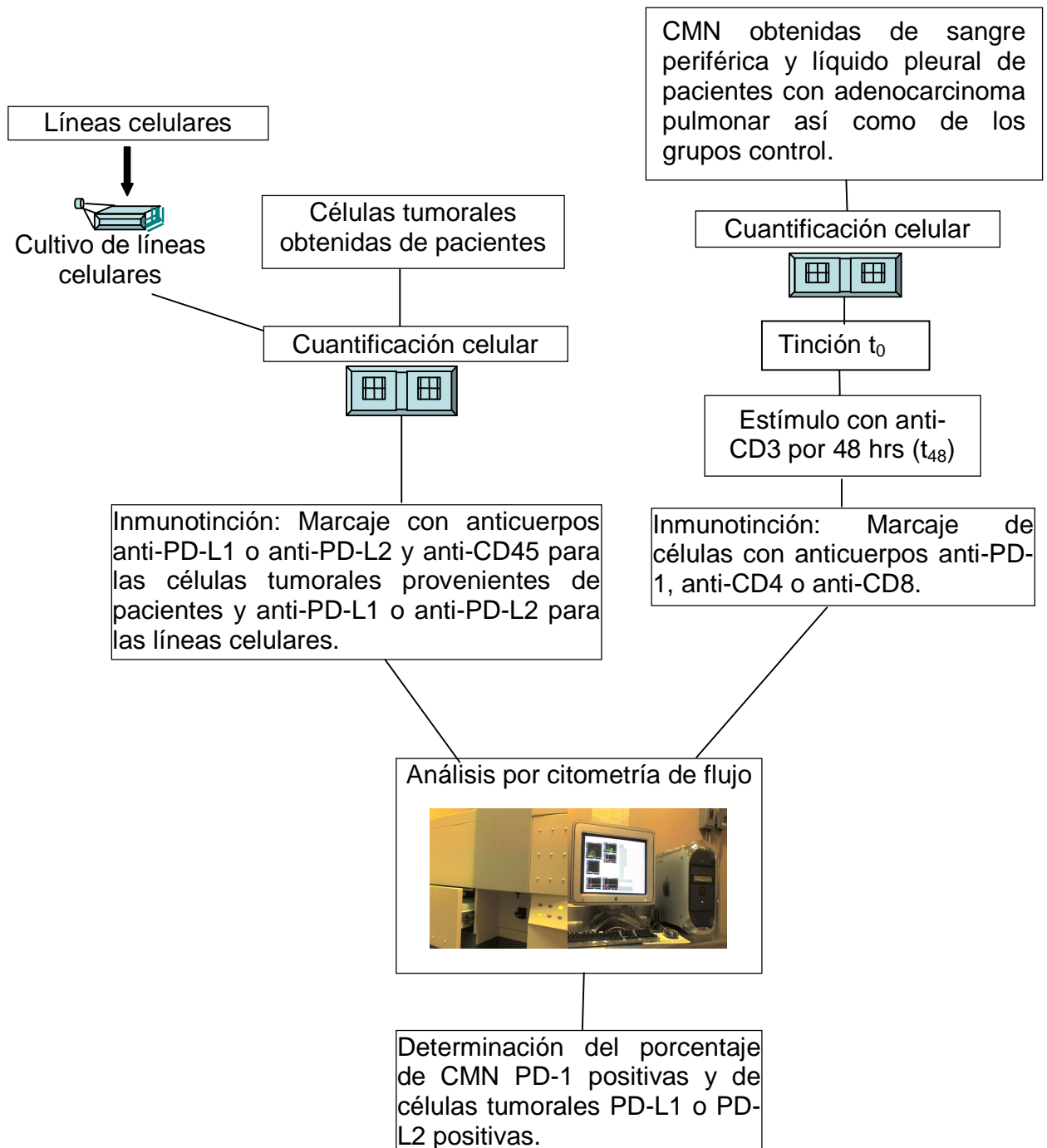
- Evaluar el porcentaje de células PD-L1 y PD-L2 positivas en líneas celulares de carcinoma pulmonar.
- Determinar el porcentaje de células tumorales PD-L1⁺ y PD-L2⁺ provenientes de derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar.
- Determinar el porcentaje de células TCD4⁺ PD-1⁺ y TCD8⁺ PD-1⁺ provenientes de derrame pleural y sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma pulmonar, de derrame pleural de pacientes con patologías no malignas y de sangre periférica de sujetos sanos.
- Comparar a nivel sistémico y pleural el porcentaje de linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺ que expresan PD-1.
- Comparar a nivel sanguíneo el porcentaje de linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺ que expresan PD-1 entre pacientes con adenocarcinoma y sujetos sanos.
- Comparar a nivel pleural el porcentaje de linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺ que expresan PD-1 entre pacientes con adenocarcinoma y patologías de tipo no crónicas.



MATERIALES Y MÉTODOS

Diagrama de flujo

Determinación de la expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2





Líneas celulares

Se utilizaron 14 líneas celulares de carcinoma pulmonar pertenecientes al grupo de carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) para determinar el porcentaje de células PD-L1 o PD-L2 positivas, de las cuales, cinco líneas fueron adquiridas comercialmente de la American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA, tres fueron de adenocarcinoma (A-427, A-549, SKLU-1) y dos de tipo epidermoide (SKMES-1 y CALU-1). Las otras nueve líneas fueron establecidas previamente en el laboratorio de Cáncer Pulmonar del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER) por su grupo de investigación, a partir de derrame pleural de pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar y a las que se les designó como 1.3.11, 1.3.15, 3A5A, 3B1A, OSJV-1, CDS-1, AJG-1, MRO-L1 y MRO-L2.

Células tumorales obtenidas de pacientes con cáncer pulmonar

Para determinar el porcentaje de células PD-L1 o PD-L2 positivas se utilizaron 15 muestras de derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar, conteniendo células tumorales y a las que se les designó como M1- M15.

Adicionalmente, a partir de tres diferentes muestras de células tumorales se lograron establecer cuatro líneas celulares: de la muestra M1 se estableció la línea celular CDS-1, de la muestra M4 la línea AJG-1, y por último la muestra M8 correspondiente a las líneas MRO-L1 y MRO-L2.

Para evaluar el porcentaje de células PD-1 positivas, se emplearon 15 muestras de células mononucleares (CMN) de sangre periférica (SP) y líquido pleural (LP), ambas provenientes de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma pulmonar, con un intervalo de edad de 36-76 años. Se utilizaron además como grupos control CMN provenientes de: a) nueve sujetos sanos no fumadores de 40 a 70 años de edad, y b) nueve pacientes con derrame pleural no maligno con un intervalo de edad de 36 a 80 años. Las muestras de derrames no malignos utilizadas fueron patologías de tipo no crónico, siendo: cuatro neumonías, dos insuficiencias cardíacas, una cardiopatía reumática, un hemotórax izquierdo de causa no específica y una pleuritis fibrosa inespecífica.

El derrame pleural fue obtenido por toracocentesis aséptica practicada por el personal médico del INER. Las células fueron aisladas por el personal de investigación del



Laboratorio de Cáncer Pulmonar de dicha institución mediante centrifugación sobre gradientes discontinuos de densidad.

Anticuerpos

Se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 (clona MIH1), anti-PD-L2 (MIH18), conjugados a ficoeritrina (PE), y anti-PD-1 (clona MIH4) conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC). Todos adquiridos de eBioscience (San Diego, California, USA).

Para distinguir la población de células tumorales de los leucocitos presentes en la muestra de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar se realizó la tinción con un anticuerpo monoclonal anti-CD45 (clona HI30) conjugado a PECy5, obtenido de BD PharMingen (San Diego, California).

Como controles de isotipo se emplearon anticuerpos conjugados a PE o FITC, obtenidos de eBioscience (San Diego, California, USA). El isotipo conjugado a PE se empleó en la determinación de PD-L1 y PD-L2 en células tumorales y el isotipo conjugado a FITC se empleó en la determinación de PD-1 en CMN.

Los linfocitos de las CMN en las muestras de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar se identificaron marcando los linfocitos TCD4⁺ y los linfocitos TCD8⁺, empleando anticuerpos monoclonales anti-CD4 conjugado a PE (clona Q4120) y anti-CD8 conjugado a Quantum Red (QR, clona UCHT-4), obtenidos de Sigma (San Luis, Missouri).

Se empleó el anticuerpo monoclonal anti-CD3 (clona UCHT1) de BD Bioscience (San Diego, CA), a una concentración de 1 µg/ mL para estimular a las CMN.

Cultivo de líneas celulares

Las líneas celulares se mantuvieron en cajas de cultivo celular T-25 (Nunc, Dinamarca) con un volumen de 5 mL de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibióticos (20 000 U/ mL de Penicilina G sódica y 20 µg/ mL de estreptomina). Las células fueron incubadas en atmósfera húmeda con 5 % de CO₂ a 37 °C.

Las líneas celulares de carcinoma pulmonar tienen la característica de crecer adheridas a la superficie de las cajas de cultivo, por lo que una vez que las células alcanzaban aproximadamente el 80 % de confluencia se separaban de las cajas, empleando una



solución de MOPS-EDTA 4 mM y realizando una agitación energética para favorecer el desprendimiento de las células. El EDTA se inactivó adicionando 5 mL de medio de cultivo RPMI 1640, posteriormente se tomó el contenido de la caja de cultivo y se vertió en un tubo cónico Falcon con 5 mL de medio RPMI 1640, el tubo se agitó suavemente y se procedió a lavar las células, centrifugándolas a 1500 rpm por 10 min.

Finalmente, las células tumorales se resuspendieron en solución salina amortiguadora de fosfatos conteniendo 1% de albúmina y 0.1 % de azida de sodio (PBS/BSA/ NaN_3) o medio RPMI 1640 (según fuera el caso). De esta suspensión se tomó una pequeña alícuota para determinar la concentración celular, realizando un conteo en la cámara de Neubauer. La viabilidad celular se determinó con el colorante de exclusión azul de tripano y siempre fue mayor al 85 %.

Inmunotinción de PD-L1 y PD-L2 en células tumorales

A 10^5 células tumorales se les incubó con: 1) el control de isotipo conjugado a PE o 2) con los anticuerpos anti-PD-L1 o anti-PD-L2 (3 μ L de cada uno) tanto para las líneas celulares como para las células tumorales provenientes de las muestras de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar. En el caso de las muestras provenientes de los pacientes, la población celular se incubó con el anticuerpo anti-CD45 (4 μ L) para marcar las células CD45 positivas (leucocitos) y distinguirlas de las CD45 negativas (células tumorales).

Finalmente, los tubos se incubaron durante 30 min a 4°C en ausencia de luz, se lavaron con PBS/BSA/ NaN_3 y se fijaron con paraformaldehído.

Estímulo de las CMN y determinación del porcentaje de linfocitos TCD4⁺ y CD8⁺ PD-1 positivos

Las CMN provenientes de líquido pleural y sangre periférica, tanto de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar como de los grupos control, se ajustaron a una concentración de 1×10^6 células/ mL, y posteriormente se estimularon con el anticuerpo anti-CD3 adsorbido en una placa de 96 pozos.

Para adsorber el anticuerpo anti-CD3 a la placa, los pozos se incubaron con 50 μ L de anti-CD3 (1 μ g/ mL) a 37 °C durante 90 min, una vez finalizada la incubación se realizaron dos lavados con 100 μ L de PBS estéril y se adicionó la suspensión celular



para estimularlas por 48 hrs (t_{48}). Como control se emplearon CMN incubadas en medio de cultivo.

Antes del período de incubación (basal t_0) y una vez finalizada la incubación (t_{48}) se procedió a realizar la determinación de PD-1 en los linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺.

Se colocaron 100 μ L de la suspensión de CMN provenientes del basal (t_0), el control (t_{48}) y el tratamiento (t_{48}) y se tiñeron con anti-PD-1 FITC o el control de isotipo, anti-CD4 PE y anti-CD8 QR, a fin de detectar la expresión de estas moléculas en la superficie celular.

Los tubos se incubaron a 4°C durante 30 min en oscuridad. Las células se lavaron con PBS y finalmente se fijaron con paraformaldehído.

Análisis por citometría de flujo

Todas las muestras se analizaron en un citómetro FACScalibur de Becton Dickinson (San José, California, USA) utilizando el programa CellQuest. Se adquirieron 10, 000 eventos de cada muestra.

Con respecto a las líneas tumorales, se delimitó la población de estas células empleando una gráfica de tamaño vs granularidad, a partir de la región anterior se elaboraron histogramas para determinar el porcentaje de células PD-L1 o PD-L2 positivas (ver figura 8).

En el caso de las muestras obtenidas de los pacientes, y para asegurar que el análisis realizado provenía sólo de las células tumorales y no de leucocitos contaminantes, se adicionó el anticuerpo anti-CD45 PECy5. Después de seleccionar la región de células tumorales en una gráfica de tamaño vs granularidad, se elaboró una gráfica de CD45 PECy5 vs granularidad, por medio de la cual se seleccionó a la población de células tumorales CD45 negativas en una segunda región. A partir de dicha región se elaboraron histogramas para determinar el porcentaje de células tumorales PD-L1 o PD-L2 positivas (ver figura 9).

El análisis para determinar el porcentaje de células PD-1 positivas se realizó efectuando dos gráficas: en la primera gráfica de tamaño vs granularidad se consideró la región de los linfocitos y en la segunda gráfica de CD4 PE vs CD8 QR se seleccionaron las células TCD4⁺ y TCD8⁺ mediante dos regiones diferentes. A partir de la región de



células CD4⁺ o CD8⁺ y empleando histogramas se analizó el porcentaje de células que expresan PD-1 (ver figura 10).

Análisis estadístico

El porcentaje de linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺ PD-1 positivos se analizó estadísticamente con el programa Prism 3.0, empleando como medida de tendencia central la media. La comparación entre las medias de los grupos: sujetos sanos vs los pacientes con adenocarcinoma y pacientes con adenocarcinoma pulmonar vs pacientes con patologías no malignas, se realizó empleando la prueba de *t* no pareada, para ambos grupos sin estímulo y con estímulo. En el caso de la comparación entre sangre periférica (SP) y líquido pleural (LP) de pacientes con adenocarcinoma pulmonar se utilizó la prueba de *t* pareada, también se utilizó para realizar la comparación del porcentaje de células PD-1 positivas a diferentes tiempos entre los diferentes grupos estudiados. Se consideró $P < 0.05$ para la significancia estadística.

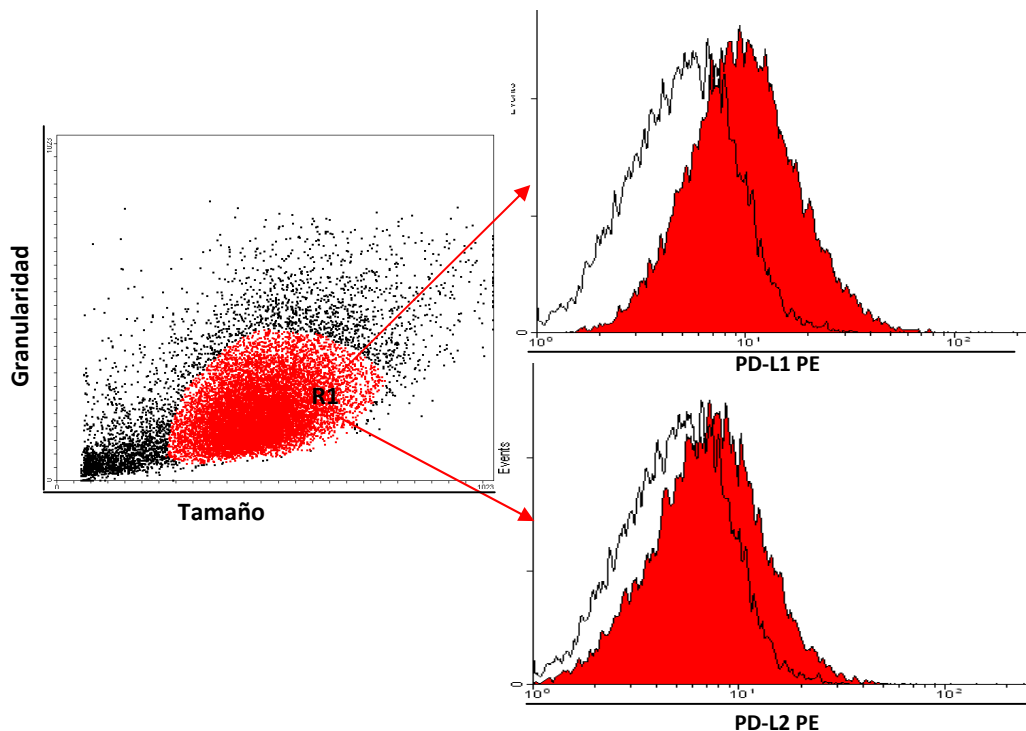


Figura 8. Análisis representativo de la determinación del porcentaje de células PD-L1 y PD-L2 positivas en líneas celulares. En una gráfica de tamaño vs granularidad, se analizó una región (R1) de células tumorales y se elaboraron los histogramas correspondientes para PD-L1 y PD-L2.

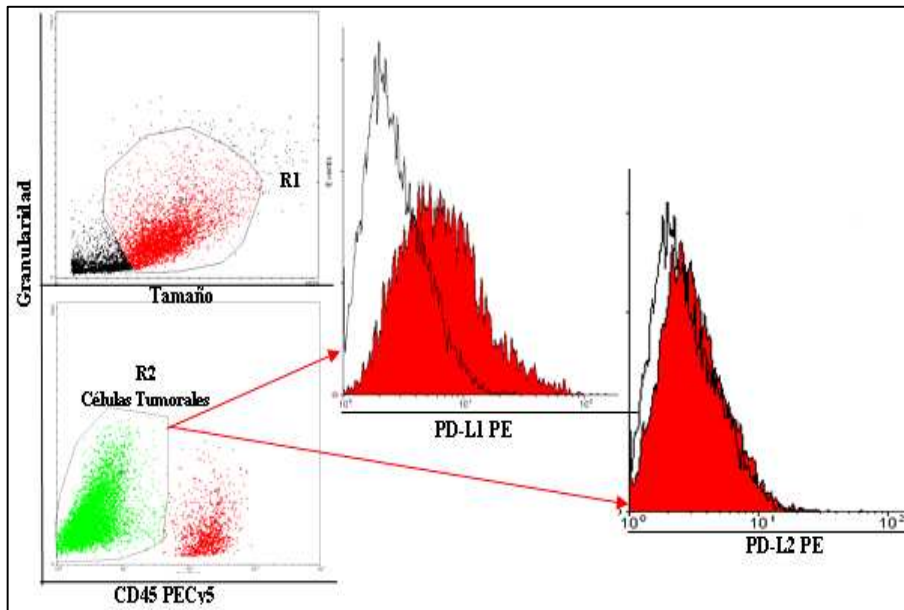


Figura 9. Análisis representativo de la determinación de células PD-L1 y PD-L2 positivas en células tumorales provenientes de pacientes con adenocarcinoma pulmonar. A partir del gráfico de tamaño vs granularidad se delimitó una región de células (R1) y en otro gráfico de CD45 vs granularidad se delimitó la población de células tumorales CD45 negativas (R2) y se elaboró el histograma correspondiente para PD-L1 o PD-L2.

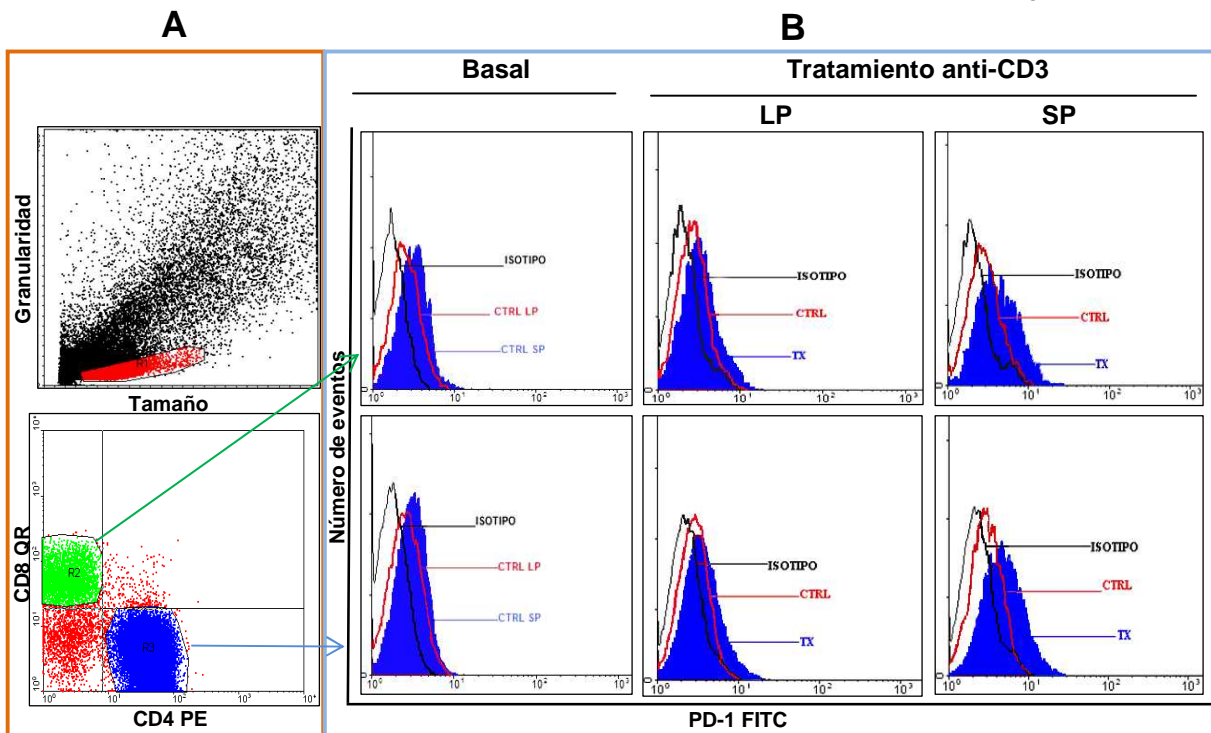


Figura 10. Análisis representativo de la determinación del porcentaje de linfocitos T PD-1 positivos. En la columna superior izquierda (panel A) se observa la región que delimita los linfocitos a partir de la cual en la parte inferior se distinguen las poblaciones de linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺. El panel B muestra los histogramas que se elaboraron para determinar el porcentaje de linfocitos TCD8⁺ PD-1⁺ (fila superior) y TCD4⁺ PD-1⁺ (fila inferior). Adicionalmente en el panel B se distingue el basal (t₀), el control (t₄₈) y el tratamiento (t₄₈) y la muestra de la que provienen las células: líquido pleural (LP) o sangre periférica (SP).



RESULTADOS

Determinación del porcentaje de células tumorales PD-L1 y PD-L2 positivas

Expresión de PD-L1 y PD-L2 en líneas celulares

Se analizaron 14 líneas celulares de carcinoma pulmonar para determinar el porcentaje de células tumorales PD-L1⁺ y PD-L2⁺, dentro de las cuales cinco provenían de líneas celulares comerciales y las otras nueve fueron establecidas en el laboratorio a partir de células tumorales de pacientes con adenocarcinoma pulmonar.

El porcentaje de células tumorales PD-L1 positivas en las líneas comerciales de tipo adenocarcinoma fue menor al 50%, mientras que en las dos líneas de tipo epidermoide PD-L1 se presentó en un porcentaje mayor al 50%.

El análisis efectuado a las nueve líneas celulares establecidas de los pacientes con adenocarcinoma reveló que la expresión de PD-L1 se observó en ocho de nueve líneas celulares en porcentajes entre 30-95 %.

En contraste con estos resultados, PD-L2 se expresó en menor medida, pues sólo dos líneas de cada grupo (las líneas comerciales y las líneas establecidas de los pacientes) dieron positivo para la expresión de PD-L2 y cuyos porcentajes fueron menores al 25 % de las células en ambos casos.

El porcentaje de células que expresaron las dos moléculas de la familia B7 en las líneas celulares mostró patrones diferentes, dado que 13 de las 14 líneas celulares analizadas expresaron PD-L1 en un porcentaje entre el 20-95% de la población, mientras que sólo cuatro de las 14 líneas celulares expresaron PD-L2 en un porcentaje del 10 al 25 % de la población. Sólo la línea celular OSJV-1 no expresó ninguna de las dos moléculas (ver figura 11).

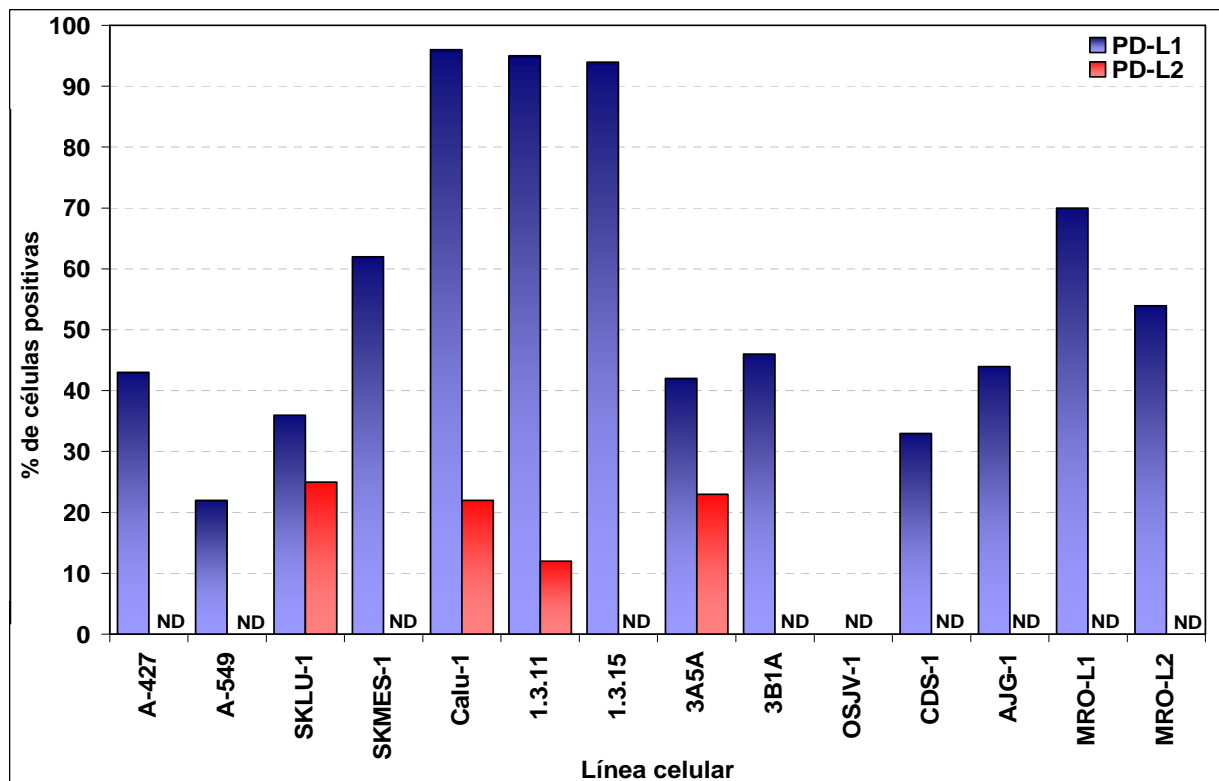


Figura 11. Porcentajes de células PD-L1 y PD-L2 positivas en las diferentes líneas celulares. Las barras de color azul representan de los porcentajes de las células PD-L1 positivas y las barras de color rojo muestran los porcentajes de células PD-L2 positivas. ND (no detectado).

Expresión de PD-L1 y PD-L2 en muestras de pacientes con adenocarcinoma pulmonar

Se analizó el porcentaje de células tumorales PD-L1 o PD-L2 positivas provenientes de derrame pleural de 15 pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar (ver figura 12 para datos representativos). Particularmente, en las muestras M2 y M11 se analizaron dos regiones diferentes de células tumorales (A y B) provenientes de la misma muestra (ver figura 13), debido a su variabilidad en el tamaño y granularidad entre cada una de ellas, por lo que al estudiar los datos de las células PD-L1⁺ y PD-L2⁺ para estas muestras, las dos subpoblaciones de células tumorales se analizaron de forma independiente.

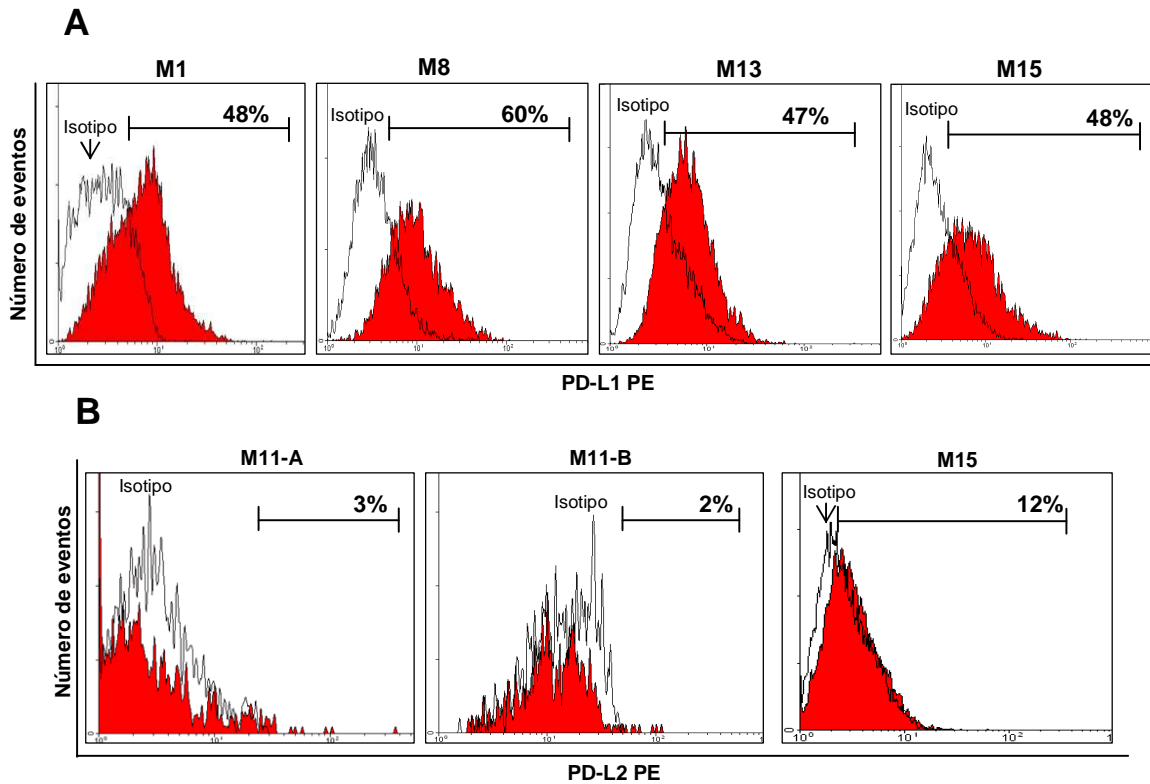


Figura 12. Histogramas representativos de células tumorales PD-L1 y PD-L2 positivas en las muestras provenientes de pacientes con adenocarcinoma pulmonar. En el panel **A** se observan los histogramas de las muestras que expresaron PD-L1 en mayor porcentaje. En el panel **B** se exponen las muestras de células tumorales que fueron PD-L2 positivas. Los porcentajes de células PD-L1⁺ y PD-L2⁺ se muestran en la esquina superior derecha de cada histograma.

Los resultados obtenidos de todas las muestras de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar se observan en la figura 14; 14 de 15 muestras de pacientes con adenocarcinoma presentaron un porcentaje de células PD-L1 positivas entre el 10 y el 60%. Sólo dos de las 15 muestras de células tumorales (M11 y M15) expresaron PD-L2, con un porcentaje menor al 15%. Las células tumorales negativas para la expresión de ambas moléculas corresponden a la subpoblación B de la muestra M2 y la muestra M4 de los pacientes con adenocarcinoma.



M2

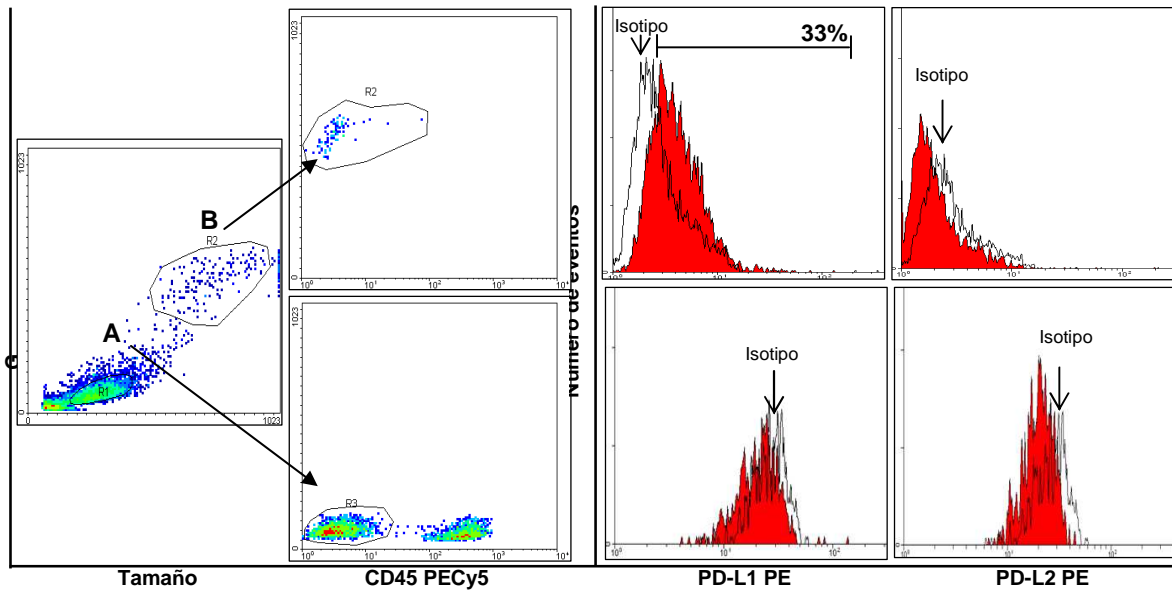


Figura 13. Análisis de las poblaciones de células tumorales en la muestra M2. En el primer gráfico se ve la distribución heterogénea de la población en la muestra, seguido se enmarcan el área de las células tumorales estudiadas y finalmente los histogramas correspondientes para cada molécula. En la fila inferior se observa el análisis efectuado a la población A y en la fila superior el análisis efectuado a la población B.

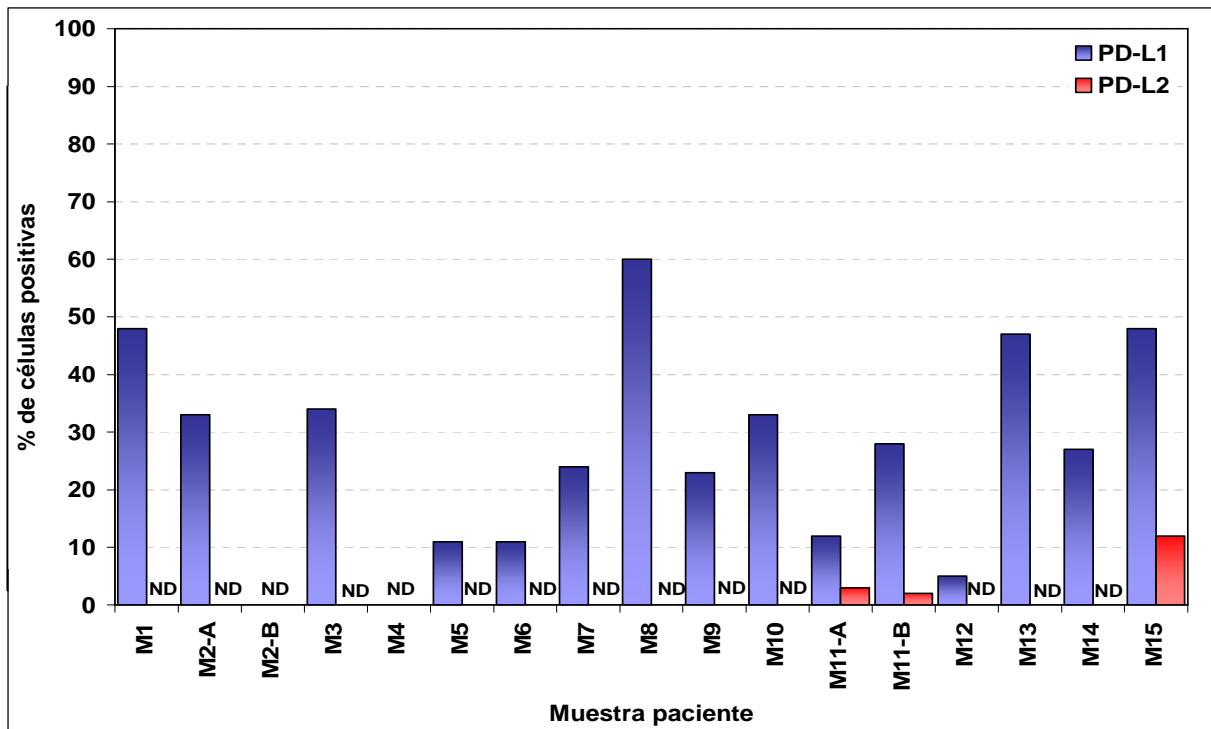


Figura 14. Porcentajes de células PD-L1 y PD-L2 positivas en las diferentes muestras de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar. Los porcentajes de las células PD-L1 positivas se representan en las barras de color azul, mientras que las barras de color rojo muestran los porcentajes de células PD-L2 positivas. ND (no detectado).



Análisis comparativo de la expresión de PD-L1 entre las muestras de los pacientes y las líneas celulares que se establecieron

De manera adicional se realizó una comparación entre las muestras y líneas celulares establecidas en el laboratorio, provenientes de los mismos pacientes, puesto que se observó que entre ambos grupos de células tumorales hay una variabilidad en los porcentajes de células PD-L1 y PD-L2 positivas.

A partir de las muestras M1, M4 y M8 se establecieron cuatro líneas celulares, la CDS-1 y la AJG-1 correspondientes a las dos primeras muestras y las líneas MRO-L1 y MRO-L2 correspondientes a la última muestra. Los porcentajes de células PD-L1 positivas, tanto para las muestras de los pacientes como para las líneas celulares correspondientes a cada muestra, se ilustran en la figura 15.

En los resultados se observó que dos de las tres muestras expresaron PD-L1 entre el 45-60% y solamente la muestra M4 no expresó PD-L1. Sin embargo, al analizar la línea correspondiente a la muestra M4, se aprecia que la línea celular AJG-1 presenta un porcentaje de células PD-L1 positivas equivalente al 44%. Las tres líneas celulares restantes (CDS-1, MRO-L1 y MRO-L2) tienen un porcentaje de células PD-L1 positivas entre el 30 y el 70%. Cabe destacar que tanto en las muestras como en las líneas tumorales la expresión de PD-L2 fue negativa.

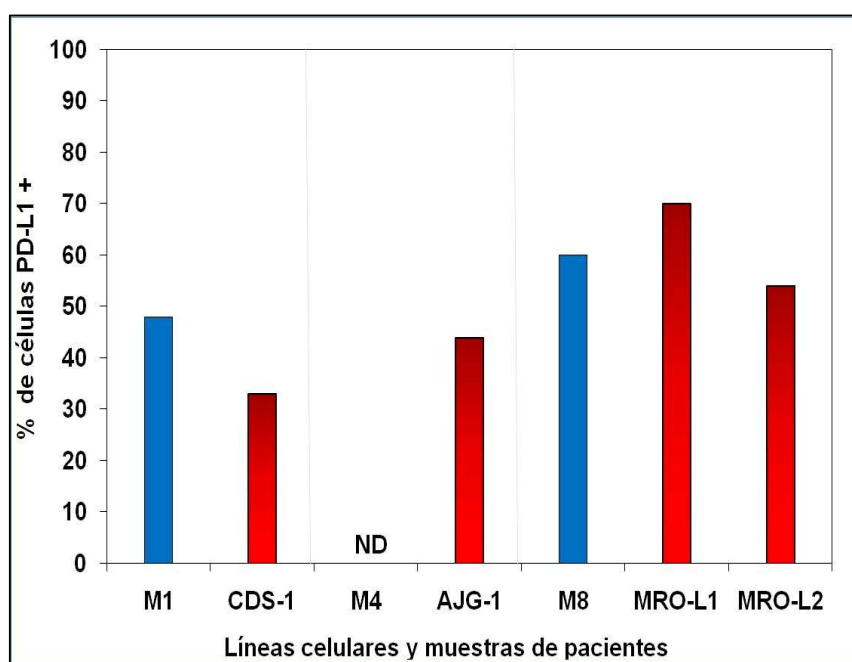


Figura 15. Porcentajes de células PD-L1⁺ en las muestras de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar y las líneas celulares establecidas de cada muestra. Las barras de color azul representan el porcentaje de células tumorales PD-L1⁺ en las muestras de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar, mientras que las barras rojas representan el porcentaje de células PD-L1⁺ en las líneas celulares. ND (no detectado).



Determinación del porcentaje de linfocitos TCD4⁺ PD-1⁺ y TCD8⁺ PD-1⁺ en pacientes con adenocarcinoma pulmonar

Varios artículos han reportado la expresión de PD-1 en linfocitos T activados de pacientes con diferentes tipos de cánceres^{33, 36}; Por lo que, se analizaron muestras de CMN provenientes de derrame pleural y sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma pulmonar, para evaluar el porcentaje de linfocitos TCD4⁺ PD-1⁺ y linfocitos TCD8⁺ PD-1⁺ bajo condiciones basales (t_0) y estimuladas por 48 hrs con anti-CD3.

Porcentaje basal de linfocitos T PD-1 positivos

Se observó que el porcentaje de células TCD4⁺ PD-1⁺ en las muestras de derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar fue mayor con respecto a los linfocitos TCD4⁺ PD-1⁺ de derrames de tipo no crónico ($P=0.030$). Respecto a la población de linfocitos TCD4⁺ de los pacientes con adenocarcinoma hay una tendencia a incrementarse el porcentaje de linfocitos PD-1⁺ provenientes del derrame pleural con respecto a los linfocitos PD-1⁺ provenientes de sangre periférica de los mismos pacientes. Con relación a las células TCD4⁺ de sangre periférica, el porcentaje de células PD-1⁺ tendió a ser mayor en los pacientes con adenocarcinoma pulmonar (figura 16 A).

Ahora bien, en los linfocitos TCD8⁺ provenientes de derrame pleural, el porcentaje de células PD-1 positivas en los pacientes con adenocarcinoma se incrementó con respecto a los linfocitos TCD8⁺ provenientes de los derrames no malignos ($P=0.0465$). No se encontró diferencia en los porcentajes de células PD-1 positivas entre derrame pleural y la sangre periférica de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar. Sin embargo, en sangre periférica, los linfocitos TCD8⁺ de los pacientes con adenocarcinoma presentan un mayor porcentaje de células PD-1 positivas que los provenientes de los sujetos sanos ($P=0.048$, figura 16 B).

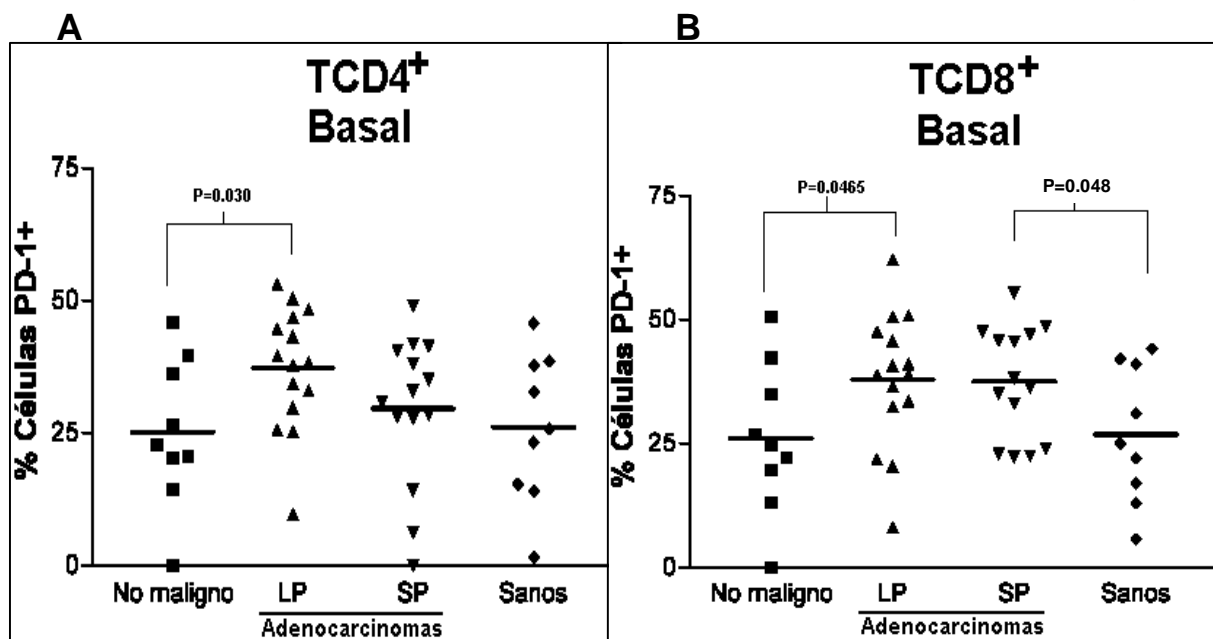


Figura 16. Porcentajes basales de linfocitos TCD4⁺ PD-1⁺ y TCD8⁺ PD-1⁺. Se muestra el porcentaje de células PD-1⁺ en función de los diferentes grupos: derrames de tipo no crónico (■, no maligno), pacientes con adenocarcinoma, en el que se distinguen las células provenientes de derrame pleural (▲, LP) y sangre periférica (▼, SP); y sujetos sanos (◆, sanos). Panel A linfocitos TCD4⁺ PD-1⁺ y panel B linfocitos TCD8⁺ PD-1⁺.

Efecto del estímulo con anti-CD3 en el porcentaje de linfocitos T PD-1 positivos

Dado que PD-1 se expresa en linfocitos T activados⁵⁹, se procedió a estimular a la CMN por 48 hrs con el anticuerpo anti-CD3 y posteriormente se analizó el porcentaje de linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺ PD-1 positivos, además se incluyó como control CMN sin estímulo. Se comparó el porcentaje de los linfocitos TCD4⁺ PD-1⁺ y TCD8⁺ PD-1⁺ de derrame pleural de los pacientes con adenocarcinoma respecto a las patologías de tipo no crónicas, así como entre los pacientes con adenocarcinoma y los sujetos sanos en sangre periférica.

En derrame pleural y sangre periférica de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar, se observó que en ambas subpoblaciones de linfocitos T el porcentaje de células PD-1 positivas disminuyó significativamente en el control sin estímulo con respecto al basal; por otro lado, al estimular las células TCD4⁺ y TCD8⁺, los porcentajes de células PD-1 positivas aumentaron significativamente con respecto al control. Sin embargo, no hubo diferencias entre las subpoblaciones de linfocitos T tratados con anti-CD3 con respecto a los porcentajes basales de células PD-1 positivas (ver panel A y B de la figura 17).



A diferencia de lo anterior, en el derrame pleural proveniente de los sujetos con patologías de tipo no crónico, en ambas subpoblaciones de linfocitos T no hubo diferencias significativas entre los niveles basales de células PD-1 positivas y los controles, además no se observaron diferencias en los porcentajes de células PD-1 positivas entre el control y las células tratadas con anti-CD3 (ver panel C de la figura 17).

Finalmente en los sujetos sanos, los porcentajes de células PD-1 positivas disminuyeron significativamente tanto en las células TCD4⁺ como en las células TCD8⁺ al permanecer sin estímulo por 48 hrs. Por el contrario, al estimular las células con anti-CD3 ambas subpoblaciones de linfocitos T mostraron un aumento significativo en el porcentaje de células PD-1 positivas con respecto al control (ver panel D de la figura 17). No obstante, los porcentajes de células PD-1 positivas posterior al estímulo con anti-CD3 no fueron mayores que los porcentajes basales (ver panel D de la figura 17).

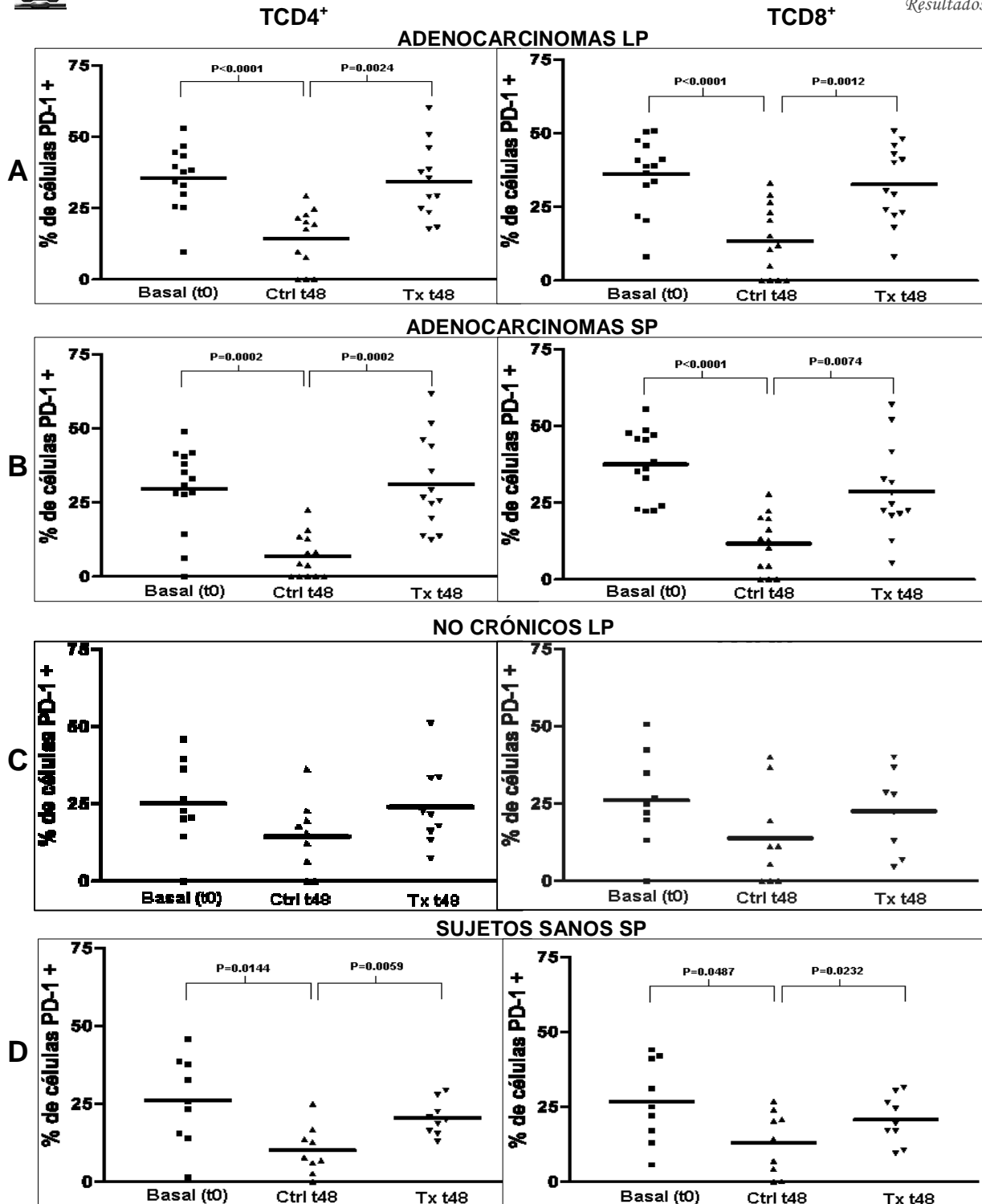


Figura 4.9. Porcentaje de linfocitos TCD4⁺ PD-1⁺ y TCD8⁺ PD-1⁺. Los gráficos representan el porcentaje de células PD-1⁺ en los tres grupos: pacientes con adenocarcinoma, líquido pleural (LP; panel A) y sangre periférica (SP; panel B); pacientes con patologías no crónicas (LP, panel C) y sujetos sanos (SP, panel D); tanto para los porcentajes basales (■, t₀), como para el control (▲, Ctrl t₄₈) y el tratamiento con anti-CD3 (▼, Tx t₄₈). En la columna izquierda se muestran los resultados para las células TCD4⁺, mientras que en la columna derecha se observan los resultados para los linfocitos TCD8⁺.

**Inducción específica de PD-1 posterior al tratamiento con anti-CD3 en linfocitos T**

Para evaluar si las subpoblaciones de linfocitos T de los adenocarcinomas incrementan el porcentaje de células PD-1 positivas al ser estimulados con anti-CD3, se realizó una comparación entre los linfocitos T provenientes de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar con respecto a los linfocitos T de líquido pleural de patologías no crónicas y la sangre periférica de sujetos sanos, para lo cual se determinó el porcentaje de inducción específica de PD-1 en los linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺, empleando la siguiente fórmula (Modificada de ref. 45).

$$\% \text{inducción específica} = \frac{(\text{PD1}_{\text{anti-CD3}}) - (\text{PD1}_{\text{Ctrl}})}{100 - (\text{PD1}_{\text{Ctrl}})} \times 100$$

En derrame pleural, el porcentaje de inducción específica de PD-1 en las células TCD4⁺ de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar tendió a incrementarse con respecto a las células TCD4⁺ de los pacientes con patologías no crónicas. En sangre periférica, se observó que el porcentaje de inducción específica de PD-1 fue mayor en los linfocitos TCD4⁺ provenientes de los pacientes con adenocarcinoma que en los linfocitos TCD4⁺ de los sujetos sanos ($P=0.0257$), como se muestra en la figura 18 A.

En los linfocitos TCD8⁺ de derrame pleural, los porcentajes de inducción específica de PD-1 fueron mayores en los pacientes con adenocarcinoma que en los pacientes con patologías no crónicas ($P=0.047$). Con respecto a los linfocitos TCD8⁺ provenientes de sangre periférica, se observó que los porcentajes de inducción específica de PD-1 tendieron a incrementarse en los pacientes con respecto a los sujetos sanos (ver panel B de la figura 18).

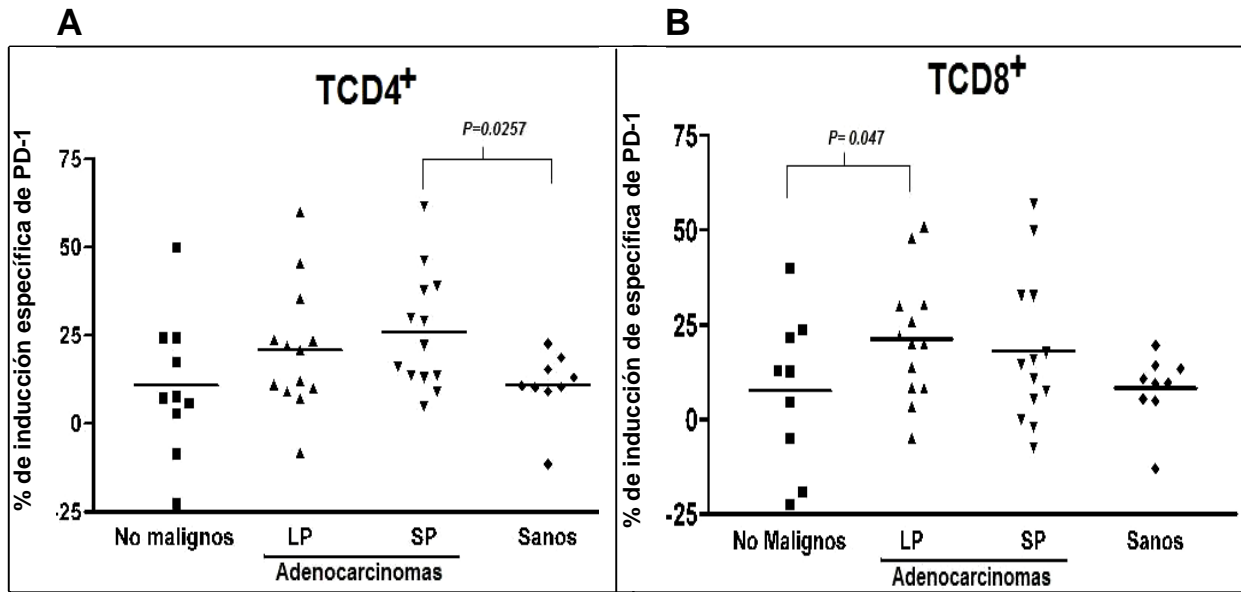


Figura 18. Porcentaje de inducción específica de PD-1 en linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺. Derrames de tipo no crónico (■, no maligno), pacientes con adenocarcinoma, en el que se distinguen las células de derrame pleural (▲, LP) y sangre periférica (▼, SP); y los sujetos sanos (◆, sanos). Panel A linfocitos TCD4⁺ PD-1⁺ y panel B linfocitos TCD8⁺ PD-1⁺. La barra representa la media.



DISCUSIÓN

Los tumores malignos evaden la respuesta inmune del hospedero por varios mecanismos. Estos incluyen secreción de factores inmunosupresores, carencia de coestimulación de la célula T, expresión de ligandos de muerte y/o moléculas coinhibitorias^{17, 78, 36}. Observaciones recientes han sugerido que la actividad inicial y final de la célula T (activación, proliferación, adquisición de memoria y función citolítica vs inducción de anergia, ignorancia y muerte celular programada) son gobernadas por el balance entre la señalización positiva y negativa en las células T, actividades conferidas por la interacción entre varias moléculas coestimuladoras de la célula T y sus ligandos correspondientes⁶⁶. En este sentido, varios estudios han reportado un mecanismo por el que las células tumorales pueden evadir la respuesta inmune del hospedero, el cual está dado por la expresión en membrana de PD-L1 y/o PD-L2 en las células tumorales^{78, 46}. PD-L1 y PD-L2 están involucrados directamente en una regulación negativa de la respuesta inmune celular y humoral al asociarse con su receptor PD-1 sobre los linfocitos T activados^{36, 46}. En el presente estudio se encontró que los ligandos PD-L1 y, en menor medida PD-L2, están expresados en líneas celulares establecidas de carcinoma pulmonar y en células tumorales provenientes del derrame pleural de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma pulmonar. También se detectó que los linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺ provenientes de sangre periférica y derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar presentaron altos porcentajes de células positivas para el receptor PD-1. Lo que lleva a pensar que la expresión de PD-L1 y PD-L2 en las células tumorales, así como la presencia de PD-1 en las subpoblaciones de linfocitos T, pueden actuar como una posible vía por la que las células tumorales de adenocarcinoma pulmonar evaden la respuesta inmune del hospedero.

Expresión de PD-L1 y PD-L2 en las células tumorales

La expresión constitutiva de PD-L1 ha sido observada en líneas celulares provenientes de cáncer de ovario⁷⁸, leucemia mieloide⁶⁵, glioma⁷⁰ y cáncer de mama²³, empleando citometría de flujo; resultados similares se encontraron en este trabajo. Adicionalmente,



se ha reportado que PD-L1 se expresa en varios tipos de tumores²³ entre los que se encuentran cáncer de ovario, cáncer de colon, melanoma, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello⁶², glioma⁷⁰, carcinoma de células renales⁶⁶, cáncer de esofago⁴⁶, cáncer de mama²³ y carcinoma de pulmón de células no pequeñas^{16, 36}. En la mayoría de los carcinomas analizados se encontró que el porcentaje de células PD-L1⁺ es mayor al 50%. En el presente estudio, las células tumorales provenientes de derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar expresaron PD-L1 en la mayoría de los casos analizados, en un porcentaje mayor al 50% de las células. La expresión de PD-L1 en diversos tipos de cánceres sugiere que podría participar en la evasión a la respuesta inmune del hospedero.

De manera contraria, en el caso de PD-L2 hay pocos estudios dedicados a analizar su expresión. Sin embargo, se ha evaluado la presencia de PD-L2 en cortes histológicos de pacientes con adenocarcinoma pulmonar y carcinoma de células escamosas, encontrándose que PD-L2 se expresa en un porcentaje del 8% para los adenocarcinomas y en 11% para los carcinomas epidermoides, en 26 de 52 casos analizados³⁶. En el presente trabajo, PD-L2 se expresó en 2/ 15 muestras de células tumorales analizadas en un porcentaje menor al 20%, y un comportamiento similar se observó en las líneas celulares de carcinoma pulmonar.

La reducida expresión de PD-L2 en la membrana citoplásmica de las células tumorales puede deberse a su limitada expresión tisular. Aunque se ha reportado que el mRNA de PD-L2 se encuentra en diversos tejidos, la expresión en la superficie celular es mucho más restringida, en particular, a las CD4 y los macrófagos^{53, 61}. En este sentido, dado que el mRNA es el molde para la síntesis de proteína y que los patrones de expresión de PD-L1 y PD-L2 difieren entre sí, se requiere estudiar la expresión de los mRNA que codifican para PD-L1 y PD-L2 en las células tumorales, para asociar los niveles de expresión de la proteína en membrana con el mRNA.

Si bien, la regulación de la expresión de PD-L1 y PD-L2 en las células tumorales es desconocida, de acuerdo con varios reportes, la expresión de PD-L1 y PD-L2 puede aumentar bajo ciertas condiciones¹⁶. Una de ellas es el microambiente tumoral, en un medio con presencia de citocinas pro-inflamatorias como el IFN- γ , se incrementa la expresión de PD-L1^{30, 16}; mientras que la expresión de PD-L2 se incrementa en las



células dendríticas y los macrófagos en presencia de IL-4; es decir, una respuesta de tipo Th1 favorece la expresión de PD-L1 mientras que una respuesta tipo Th2 favorece la expresión de PD-L2³⁰. Adicionalmente, se ha reportado que en el líquido pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar, el perfil de citocinas es de tipo Th1⁵².

Otra posible explicación a la baja expresión de PD-L2 que se encontró en las células tumorales es que la expresión de PD-L2 podría promover la respuesta inmune antitumoral, como ha sido reportado previamente en un modelo murino⁴¹. Sin embargo, la funcionalidad de las moléculas de PD-L1 y PD-L2, expresadas por las células tumorales provenientes de las líneas celulares y las muestras obtenidas de los pacientes con carcinoma pulmonar aún necesita ser investigada.

Expresión de PD-1 en subpoblaciones de linfocitos T

PD-1 es una de las proteínas de señalización que contribuyen con una regulación negativa durante la presentación de antígenos a la célula T, modulando su respuesta, así como los niveles y patrones de citocinas producidas³³. Se ha propuesto que la respuesta inmune limita su actividad efectora en contra de las células tumorales, debido a un incremento en la expresión de PD-1 en los linfocitos T⁷⁸. En el caso particular del cáncer de pulmón un reporte demostró en cortes histológicos la presencia de PD-1 en linfocitos T infiltrantes de tumor³⁶. Adicionalmente, dado que tanto la respuesta sistémica de las células T como la respuesta de los linfocitos T en el sitio del tumor son importantes para activar la respuesta inmune del hospedero en contra del cáncer, nosotros estudiamos la expresión de PD-1 en los linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺ a niveles basales y estimulados con anti-CD3 en pacientes con adenocarcinoma pulmonar, en sangre periférica y derrame pleural.

El análisis de los resultados mostró que el porcentaje de células TCD4⁺ PD-1⁺ y TCD8⁺ PD-1⁺ en los pacientes con adenocarcinoma pulmonar, a nivel basal tiende a estar incrementado tanto en derrame pleural como en sangre periférica, en comparación con el porcentaje de células TCD4⁺ PD-1⁺ y TCD8⁺ PD-1⁺ de los grupos control (sujetos con patologías no crónicas y sujetos sanos). Estos resultados sugieren que el tumor tiene un efecto localizado y sistémico en la expresión de PD-1 en las células T de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar. Además, se observó que ambas



subpoblaciones de linfocitos T de sangre periférica y derrame pleural requieren de un estímulo constante para mantener el porcentaje de células PD-1⁺, por lo que la presencia del tumor podría estar estimulando constantemente a los linfocitos T en el espacio pleural y en la periferia, conllevando a un incremento de células PD-1⁺.

En el derrame pleural, la comparación entre los linfocitos T de pacientes con adenocarcinoma pulmonar y las patologías de tipo no crónicas mostró que el tumor podría inducir un incremento en el porcentaje de linfocitos T PD-1⁺, lo que sugiere que el tumor estimula crónicamente a los linfocitos T. Lo anterior concuerda con lo reportado por Golden y cols²⁴ en pacientes infectados con hepatitis C, donde indican que la expresión de PD-1 es mayor en los linfocitos T provenientes de tejido hepático de pacientes con hepatitis C que en los linfocitos T de patologías hepáticas no crónicas²⁴.

Una posible explicación a las diferencias de expresión de PD-1 entre los sujetos con patologías no crónicas y los pacientes con adenocarcinoma pulmonar puede deberse a la secreción de citocinas en el microambiente producidas por las células T localizadas en el espacio pleural³³. Otra posibilidad es que los antígenos tumorales induzcan la expresión de PD-1^{24, 70}. Al respecto, nuestros datos indican que en los pacientes con patologías no crónicas, los porcentajes basales de células PD-1⁺ no disminuyeron transcurridas 48 hrs de incubación, y aún cuando las células se estimularon con anti-CD3 el porcentaje de linfocitos T PD-1 positivos no se modificó, lo que sugiere que las células T no han sido estimuladas crónicamente, ante lo cual no se perturba la expresión de PD-1 por el estímulo con anti-CD3. Por el contrario, en los pacientes con adenocarcinoma pulmonar los porcentajes basales de células PD-1⁺ disminuyeron significativamente después del periodo de incubación; sin embargo, al estimular a los linfocitos T, los porcentajes de células PD-1 positivas se mantienen con respecto a los porcentajes basales, lo que puede estar relacionado con la estimulación crónica de los linfocitos T en el compartimento pleural.

Adicionalmente, nosotros observamos que los porcentajes de inducción específica de PD-1 fueron significativamente mayores en los linfocitos TCD8⁺ con respecto a la subpoblación correspondiente en los sujetos con patologías no crónicas; mientras que en los linfocitos TCD4⁺ de los pacientes con adenocarcinoma sólo se observó una tendencia a incrementar el porcentaje de inducción específica de PD-1. Estas



diferencias pueden ser atribuidas al número de casos considerados, tal vez incrementando el número de pacientes se alcance la significancia estadística en los linfocitos TCD4⁺. No obstante, se puede inferir que la expresión de PD-1 en los linfocitos T tiene un importante rol inmunoregulatorio en la respuesta inmune en el carcinoma pulmonar, suprimiendo la actividad del linfocito T.

En sangre periférica, los linfocitos TCD4⁺ de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar no mostraron diferencias significativas en los porcentajes basales de células PD-1⁺, con respecto a los linfocitos TCD4⁺ de los sujetos sanos, lo que sugiere que los linfocitos TCD4⁺ que se encuentran en la periferia no presentan una disfunción completa, al comportarse de manera similar a los linfocitos TCD4⁺ de los sujetos sanos. Sin embargo, se pudo observar que el porcentaje de inducción específica de PD-1 fue mayor en los linfocitos TCD4⁺ de los pacientes con cáncer que en los linfocitos TCD4⁺ de los sujetos sanos. Una posible explicación a estas diferencias en la inducción específica de PD-1, es que a medida que los linfocitos T de los pacientes con cáncer se van activando por una exposición crónica al antígeno vía TCR se incrementa la expresión de PD-1, lo que a su vez puede llevar a los linfocitos T a un agotamiento funcional^{15, 70}.

Respecto a la población de linfocitos TCD8⁺, los porcentajes basales de células PD-1⁺ fueron mayores en los pacientes con adenocarcinoma que en los sujetos sanos, pero al estimularlos *in vitro* no se encontró un incremento en el porcentaje de inducción específica de PD-1 en los pacientes con cáncer, tal vez incrementando el número de pacientes se alcance la significancia estadística.

Se ha reportado que en infecciones crónicas como la hepatitis C²⁴ y el VIH²¹, los niveles de expresión de PD-1 están incrementados en los linfocitos TCD8⁺ y que además presentan una reducida capacidad de proliferación y una limitada función efectora que las conlleva a un estado de agotamiento permanente²¹. Particularmente en VIH han reportado que las células TCD8⁺ se encuentran en un estado de agotamiento mayor que las células TCD4⁺, debido principalmente a la pérdida en ciertas funciones tales como la producción de citocinas, la capacidad de proliferación y la resistencia a la apoptosis, lo que se refleja en niveles elevados de expresión de PD-1^{21, 24}.



Además, varios grupos han reportado los siguientes defectos en las células TCD8⁺ de sangre periférica y derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar: a) reducción de la tasa de proliferación, b) disminución de la producción de algunas citocinas, c) capacidad reducida de los linfocitos citotóxicos para eliminar las células tumorales^{9, 10, 51 y 52}. Por lo que, nuestros resultados son consistentes con la noción de que la estimulación crónica induce la expresión de PD-1 en los linfocitos TCD8⁺ y se asocian con alteraciones en su funcionalidad²¹.

En resumen, la expresión de PD-1 en los linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺ y la expresión de PD-L1 y PD-L2 en las células tumorales en pacientes con adenocarcinoma pulmonar, puede jugar un rol crítico en la regulación de la respuesta inmune del hospedero. Estudios recientes mostraron que la estimulación prolongada de las células T activadas llevan a un estado de anergia temporal o permanente y a un incremento de la apoptosis dada la elevada expresión de PD-L1 en las células tumorales, ya que la interacción PD-1: PD-L1 inhibe la proliferación y la capacidad efectora de las células T activadas^{21, 61, 68}. Así mismo, se ha reportado que los mediadores inflamatorios, particularmente el IFN- γ , están implicados en la sobreexpresión de PD-L1 sobre las células tumorales. Cabe señalar que la expresión de PD-1 además de ser inducida vía TCR puede también ser inducida por citocinas pro-inflamatorias^{36, 33}, de hecho en un reporte sobre tuberculosis demuestran que la expresión de PD-1 puede ser regulada por citocinas tipo Th1^{36, 33}. Basados en lo anterior, la expresión PD-1 en el linfocito T y sus ligandos PD-L1/ PD-L2 en las células tumorales puede depender del microambiente³⁰, por lo que el comprender la función del IFN- γ en la regulación de la expresión de PD-1 y sus ligandos enriquecería el conocimiento sobre la relación que guarda la respuesta inmune del hospedero en contra del tumor.

Por último, la respuesta inflamatoria crónica podría promover el potencial maligno de las células neoplásicas, lo que está asociado con cambios en los perfiles de las células tumorales, así como con su funcionalidad, incluyendo la supresión de la respuesta mediada por los linfocitos T³². Por lo que aun faltaría relacionar la participación que tienen PD-1 y sus ligandos en la inmunidad de los pacientes y ver la posible contribución de sus interacciones al desarrollo de terapias eficaces.



CONCLUSIONES

- PD-L1 se encontró ampliamente expresado en las líneas celulares (13/14) y en las células tumorales (14/15) provenientes del derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar.
- PD-L2 se expresó en menor medida en las líneas celulares (4/14) y en las células tumorales provenientes del derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar (2/15).
- No hubo diferencias en el porcentaje de células PD-1 positivas en los linfocitos TCD8⁺ y TCD4⁺ entre sangre periférica y líquido pleural de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar, tanto en condiciones basales como estimulados con anti-CD3.
- En líquido pleural, en condiciones basales el porcentaje de linfocitos TCD4⁺ PD-1⁺ y TCD8⁺ PD-1⁺ fue mayor en los pacientes con adenocarcinoma pulmonar que en los pacientes con patologías no crónicas.
- Los linfocitos TCD8⁺ de los pacientes con cáncer pulmonar presentaron una mayor inducción específica de PD-1 que los linfocitos TCD8⁺ de los pacientes con patologías no crónicas.
- En sangre periférica en condiciones basales, los linfocitos TCD8⁺ de los pacientes con adenocarcinoma presentaron un mayor porcentaje de células PD-1⁺ que los linfocitos TCD8⁺ de sujetos sanos.
- Las células TCD4⁺ provenientes de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar presentaron un porcentaje de inducción específica de PD-1⁺ mayor que en los linfocitos TCD4⁺ de los sujetos sanos.



En general, nosotros demostramos que las células tumorales de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar expresaron PD-L1, y en menor cantidad PD-L2, y que los linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺ de pacientes con adenocarcinoma pulmonar presentaron altos porcentajes de células PD-1⁺, respecto a los grupos control. Posiblemente PD-L1 está más ampliamente expresado que PD-L2 debido a las citocina secretadas en el microambiente tumoral y con respecto a PD-1, es probable que las células TCD4⁺ se encuentren en un estado de agotamiento que les impide desempeñar sus actividades efectoras e induce a su vez a que las células TCD8⁺ se encuentren en un estado de anergia.



BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas Abdúl. "Propiedades generales de las respuestas inmunitarias", En: Inmunología celular y molecular. Barcelona, Elsevier 2006; pp. 3-17.
2. Ames, B. N; Gold, L. S. The causes and prevention of cancer: gaining perspective. Environ Health Perspect 1997; 105: 865-873.
3. Andersen, M. H; Schrama, D; Straten, P; Becker, J. C. Cytotoxic T cells. J Invest Dermatol 2006; 126: 32- 41.
4. Barton, M. G. A calculates response: control of inflammation by the innate immune system. J Clin Invest 2008; 118: 413-420.
5. Berenwinkel, N; Antal, T; Dingli, D; Traulsen, A; Kinzler, K. W; Vculescu, V. E; et al. Genetic progression and the waiting time to cancer. PLoS Comput Biol 2007; 3: 2239-2246.
6. Blank, C; Gajewski, T. F; Mackensen, A. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. Cancer Immunol Immunother 2005; 54: 307-314.
7. Camacho, D. F y Garavito, C. E. "Derrame pleural", En: Guía para manejo de urgencias. Bogotá, Universidad El Bosque 2002; pp. 557-562.
8. Cano V. F; Lugo, E; Nuñez, C; Barrios, R; Cardoso, M. Pleura. Universidad Nacional Autónoma de México 1991. pp. 4-18 y 47-1001.
9. Chen, Y. M; Yang, W. K; Whang-Peng, J; Tsai, W. Y; Hung, Y. M; Yang, D.M; et al. Restoration of the immunocompetence by IL-2 activation and TCR-CD3 engagement of the in vivo anergized tumor-specific CTL from lung cancer patients. J Immunother 1997; 20: 354-364.
10. Chen, Y.M; Ting, C. C; Peng, J. W; Yang, W. K; Yang, K. Y; Tsai, C. M; et al. Restoration of cytotoxic T lymphocyte function in malignant pleural effusion: interleukin-15 vs. interleukin-2. J Interferon Cytokine Res 2000; 20: 31-39.
11. Choi, S; Schwartz, R. H. Molecular mechanisms for adaptive tolerance and other T cell anergy models. Semin Immunol 2007; 19: 140-152.
12. Collins, L. G; Haines, C; Perkel, R; Enck, R. E. Lung cancer: diagnosis and management. Am Fam Physician 2007; 75: 56-63.



13. Curiel, T. J; Wei, S; Dong, H; Alvarez, X; Cheng, P; Mottram, P; et al. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nature Med* 2003; 9: 562-567.
14. de Menezes D. R; Machado P. M. Molecular markers in lung cancer: prognostic role and relationship to smoking. *J Bras Pneumol* 2005; 32: 56-65.
15. Dong, H and Chen, X. Immunoregulatory role of B7-H1 in chronicity of inflammatory responses. *Cell Mol Immunol* 2006; 3:179-187.
16. Dong, H; Strome, S. E; Salomao, D. R; Tamura, H; Hirano, F; Filies D. B; et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nature Med* 2002; 8: 793-800.
17. Dunn, G. P; Bruce, A. T; Ikeda, H; Old, L. J; Schreiber, R. D. Cancer immunoediting from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunol* 2002; 3: 991-998.
18. Fife, B. T. and Bluestone, J. A. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev* 2008; 224: 166-182.
19. Frank, S. A. "Carcinogenesis", En: *Dynamics of cancer: Incidence, Inheritance and Evolution*. New Jersey, Princeton University Press 2007; p.192.
20. Freeman, G. J. Structures of PD-1 with its ligands: Sideways and dancing cheek to cheek. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 10275-10276.
21. Freeman, G. J; Wherry, J. E; Ahmed, R. Sharpe, A. H; Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade. *J Exp Med* 2003; 10: 2223-2227.
22. Freeman, G. J; Sharpe, A. H; Kuchroo, V. K. Protect the killer: CTLs need defenses against the tumor. *Nature Med* 2002; 8: 787-789.
23. Ghebeh, H; Mohammed, S; Al-Omair, A; Qattan, A; Lehe, C; Al-Qudaihi, G; et al. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia* 2006; 6:190-198.
24. Golden-Mason, L; Palmer, B; Klarquist, J; Mengshol, J. A; Castelblanco, N; Rosen H. R. Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C



- virus-specific CD8+ T cells associated with reversible immune dysfunction. *J Virol* 2007; 81: 9249-9258.
25. Hai-bo, Y and Huan-zhong, S. T lymphocytes in pleural effusion. *Chin Med J* 2008; 121: 579-580.
26. Hanahan, D; Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
27. Herbst, R. S; Heymach, J. V; Lippman, S. M. Molecular origins of cancer: Lung cancer. *N Engl J Med* 2008; 359: 1367-1380.
28. Hollings, N; Shaw, P. Diagnostic imaging of lung cancer. *Eur Respir J* 2001; 19: 722-742.
29. Inmaculada, C. P; Antonio, R. B. Derrame Pleural. Antonio Trueba, 14, "Villa Cristina", bloque 5, piso 2º nº 1. 29017-Málaga.
30. Inman, B. A; Frigola, X; Dong, H; Kwon, E. D. Coestimulation, coinhibition and cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2007; 7: 15-30.
31. Instituto Nacional del Cáncer. National Cancer Institute. <http://www.cancer.gov/espanol>. Consultado en Febrero 20 de 2009.
32. Johansson, M; DeNardo, D. G; Coussens, L. M. Polarized immune responses differentially regulate cancer development. *Immunol Rev* 2008; 222: 145-154.
33. Jurado, J. O; Alvarez, I. B; Pasquinelli, V. Martínez, G. J; Quiroga, M. F; Abbate, E; et al. Programmed death (PD)-1: PD-Ligand 1/PD-Ligand 2 pathway inhibits T cell effector functions during human tuberculosis. *J Immunol* 2008; 181: 116-125.
34. Keir, M.; Butte, M.; Freeman, G.; Sharpe, A. PD-1 and Its ligands in tolerance and immunity. *Ann Rev Immunol* 2008; 26: 677-704.
35. Khong, H. T; Restifo, N. P. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 2002; 3: 999-1005.
36. Konishi, J.; Yamazaki, K., Azuma, M.; Kinoshita, I.; Dosaka-Akita, H.; Nishimura, M. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin Cancer Res* 2004, 10: 5094-5100.
37. Kopper, L; Tímár, J. Genomics of lung cancer may change diagnosis, prognosis and therapy. *Pathol Oncol Res* 2005; 11: 5-10.



38. Latchman, Y; Wood, C. R; Chernova, T; Chaudhary, D; Borde, M; Chernova, I; et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Immunol* 2001; 2: 261-268.
39. Lechler, R; Chai, J-G; Merelli-Berg, F; Lombardi, G. T-cell anergy and peripheral T-cell tolerance. *Phil Trans R Soc Lond B* 2001; 356: 625-637.
40. Lichtenstein, A. V. On evolutionary origin of cancer. *Cancer Cell Int* 2005; 5:5
41. Liu, X; Gao, X. J; Wen, J; Yin, L; Li. O; Zuo, T; et al. B7DC/PD-L2 promotes tumor immunity by a PD-1-independent mechanism. *J Exp Med* 2003; 197: 1721-1730.
42. MacDonald, F. "General principles and Lung Cancer", En: *Molecular Biology of Cancer*. New York, Bios Scientific Publishers 2004; pp. 1-11 y 102-113.
43. Massion, P. P; Carbone, D. P. The molecular basis of lung cancer: molecular abnormalities and therapeutic implications. *Respir Res* 2003; 4: 1-15.
44. Mescher, M. F; Popescu, F. E; Gerner, M; Hammerbeck, C. D; Curtsinger, J. M. Activation-induced non-responsiveness (anergy) limits CD8 T cell responses to tumors. *Semin Cancer Biol* 2007; 17: 299-308.
45. Minna, J. D; Roth, J. A; Gazdar, A. F. Focus on lung cancer. *Cancer Cell* 2002; 1: 49-52.
46. Mueller, Y. M; De Rosa, S. C; Hutton, J. A; Witek, J; Roederer, M; Altaman, J. D; et al. Increased CD95/Fas-induced apoptosis of VIH-specific CD8+ T cells. *Immunity* 2001; 15: 871-882.
47. Ohigashi, Y; Sho, M; Yamada, Y; Tsurui, Y; Hamada, K; Ikeda, N; et al. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand 2 expression in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2947-2953.
48. Onlamoon, N; Rogers, K; Mayne, A. E; Pattanapanyasat, K; Mori, K; Villenger, F; Ansari, A. A. Soluble PD-1 rescues the proliferative response of simian immunodeficiency virus-specific CD4 and CD8 T cells during chronic infection. *Immunology* 2008; 124: 277-293.
49. Organización Mundial de la Salud. OMS. , Nota No. 297. <http://www.who.int>. Consultado en Febrero 20 de 2009.
50. Pardoll, D. M. Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nature Rev Immunol* 2002; 2: 227-238.



51. Parkin, J; Cohen, B. An overview of the immune system. *Lancet* 2001; 357: 1777-1789.
52. Pluygers, E; Sadowska, A; Chyczewski, L; Niklinski, J; Niklinska, W; Chyczewska, E. The impact of immune responses on lung cancer and the development of new treatment modalities. *Lung Cancer* 2001; 34: S71-7.
53. Prado-García, H; Aguilar-Cazares, D; Flores-Vergara, H; Mandoki, J. J; López-González, J. S. Effector, memory and naïve CD8+ T cells in peripheral blood and pleural effusion from lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer* 2005; 47: 361-371.
54. Radhakrishnan, S; Nguyen, L. T; Ciric, B; Flies, D; Van Keulen, V. P; Tamada, K; et al. Immunotherapeutic potential of B7-DC (PD-L2) cross-linking antibody in conferring antitumor immunity. *Cancer Res* 2004; 64: 4965-4972.
55. Rakoff-Nahoum, S. Why Cancer and Inflammation? *Yale J Biol Med* 2006; 79: 123-130.
56. Ruíz-Godoy, L; Rios, R. P; Cervantes, S. F; Osornio-Vargas, A; García-Cuellar, C; Meneses G. A. Mortality due to lung cancer in Mexico. *Lung Cancer*, 2007; 58: 184-190.
57. Ryungsa, K; Manabu, E; Kazuaki, T. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunol*, 2007; 121: 1-14.
58. Ryungsa, K; Manabu, E; Kazuaki, T; Koji, A. Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. *Cancer Res* 2006; 66: 5527-5536.
59. Santana M. A; Guadarrama, F. E. Cell biology of T cell activation and differentiation. *Int Rev Cytol*, 2006; 250: 217-274.
60. Sharpe, A. H; Wherry, E. J; Ahmed, R; Freeman, G. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nature Immunol* 2007; 8: 239-245.
61. Shimauchi, T; Kabashima, K; Nakashima, D; Sugita, K; Yamada, Y; Hino, R; Tokura, Y. Augmented expression of programmed death-1 in both neoplastic and non-neoplastic CD4+ T-cells in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int J Cancer* 2007; 121: 2585-2590.



62. Shin, T; Yoshimura, K; Shin, T; Crafton, E. M; Tsuchiya, H; Housseau, F; et al. In vivo costimulatory role B7-DC in tuning T helper cell 1 and cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 2005; 10: 1531-1541.
63. Strome, S. E; Dong, H; Tamura, H; Voss, S. G; Flies, D. B; Tamada, K; et al. B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63: 6501-6505.
64. Swann, J. B; Smyth, M. J. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest* 2007; 117: 1137-1146.
65. Syrjänen, K. J. HPV infections and lung cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55: 885-891.
66. Tamura, H; Dan, K; Tamada, K; Nakamura, K; Shioi, Y; Hyodo, H; et al. Expression of functional B7-H2 and B7.2 costimulatory molecules and their prognostic implications in de novo acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5708-5717.
67. Thompson, R. H; Dong, H; Kwon, E. D. Implications of B7-H1 expression in clear cell carcinoma of the kidney for prognostication and therapy. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 709-715.
68. Vilas, M. M; Montequin, F. J; Pérez, P. L; Morales, R. L; Díaz, B. A; García, L. L. Inmunidad celular y estados de anergia: comportamiento en pacientes con pie diabético. *Rev Cubana Angiol Cir Vasc* 2002; 3: 47-53.
69. Vogelstein, B; Kinzler, K. W. Cancer genes and the pathways they control. *Nature Med* 2004; 10: 789-799.
70. Wintterle, S; Schreiner, B; Mitsdoerffer, M; Schneider, D; Chen, L; Meyermann, R; et al. Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: a potential mechanism of immune paralysis. *Cancer Res* 2003; 63:7462-7467.
71. Wong, M. R; Scotland, R. R; Lau, L. R; Wang, Ch. Korman, A. J; Kast, W. M; et al. Programmed death-1 blockade enhances expansion and functional capacity of human melanoma antigen-specific CTLs. *Int Immunol* 2007; 19: 1223-1234.
72. Yadav, D and Sarvetnick, N. Costimulation and pancreatic autoimmunity: The PD-1/PD-L conundrum. *Rev Diabetic Stud* 2006; 3: 6-10.
73. Yamamoto, T; Hattori, M; Yoshida, T. Induction of T-cell activation or anergy determined by the combination of intensity and duration of T-cell receptor



- stimulation, and sequential induction in an individual cell. *Immunol* 2007; 121: 383-391.
74. Yee, C; Greenberg, P. Modulating T-cell immunity to tumors: new strategies for monitoring T-cell responses. *Nature* 2002; 2: 409-419.
75. Zan, X; Allison, J. P. To be or no to be family B7. *J Clin Invest* 2006; 116: 2590-2593.
76. Zitvogel, L; Apetoh, L; Ghiringhelli, F; André, F; Tesniere, A; Kroemer, G. The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? *J Clin Invest* 2008; 118: 1991-2001.
77. Zitvogel, L; Tesniere, A; Kroemer, G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nature Rev Immunol* 2006; 6: 715-725.
78. Zou, W and Chen, L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nature Rev Immunol* 2008; 8: 467-477.