

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---



**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DETERMINACIÓN DE LA VÍA DE INDUCCIÓN DE APOPTOSIS  
EN LINFOCITOS T CD8+ ACTIVADOS PROVENIENTES DE PACIENTES  
CON CARCINOMA PULMONAR**

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA  
VÍCTOR SERVANDO GARCÍA REA**



**MÉXICO, D.F.**

**2011**



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:**                    **Profesor: JOSÉ SULIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ**

**VOCAL:**                            **Profesor: ENRIQUE ORTEGA SOTO**

**SECRETARIO:**                   **Profesor: HERIBERTO PRADO GARCÍA**

**1er. SUPLENTE:**               **Profesor: MÓNICA BERENICE HERAS CHAVARRÍA**

**2do. SUPLENTE**                 **Profesor: SONIA MAYRA PÉREZ TAPIA**

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

### **ASESOR DEL TEMA:**

Dr. Heriberto Prado García

---

### **SUSTENTANTE:**

Víctor Servando García Rea

---

## *Dedicatorias*

*A la mujer que ha entregado su vida incondicionalmente para mi hermana y para mí. Que me ha enseñado a vivir con valores, a ser humilde, a ser valiente, a ser generoso, a pensar en los demás. No tengo forma de agradecer todo el amor y el tiempo que me has dado. Este título es una victoria tuya.*

*Gracias Mamá*

*Flor Arminda Rea López*

*Al mejor maestro que la vida y esa energía llamada Dios en su infinita sabiduría me pudieron dar. Ha sido por tu guía, tu amor, tus palabras y consejos que he llegado a ser quien ahora ves.*

*Gracias Papá*

*Víctor Manuel García Bazán*

*A la personita que desde muy corta edad se ha ganado todo mi respeto y admiración a cualquier nivel. Porque tus cualidades son únicas y excepcionales, tus éxitos me han inspirado y alentado a mejorar. Porque llegaste a esta vida a triunfar, a ser feliz y sobre todo, a llenar nuestra familia de amor y alegría.*

*Gracias hermanita*

*Flor Arminda García Rea*

*A LOS TRES PILARES DE MI VIDA*

*SOLO PUEDO DECIRLES QUE LOS AMO*

## Agradecimientos

Al Dr. José Sullivan López González, por sus enseñanzas y consejos desde que fue mi maestro, por la calidad de su trato y los detalles que ha tenido conmigo, porque cada regaño fue por mi bien y para hacer de mi un mejor profesionalista, por permitirme ser parte de su grupo, gracias.

Al Dr. Heriberto Prado García, por haber dirigido este trabajo, por estar dispuesto siempre a enseñarme con gusto y paciencia.

A los amigos que se han convertido en parte de mi familia: Luis Ángel Rosales, Alfonso Osorno y Armando Guerrero. Los nombro por orden de aparición, porque cada uno de ustedes ha marcado mi vida de forma especial con el regalo su amistad.

A Yazmín Saavedra por el tiempo y los momentos compartidos. Porque contigo he comprendido el significado del amor de pareja.

A mi primo Salvador Rea que ha sido como un hermano. Gracias por todas las risas, los abrazos, las bromas y juegos, sabes que te quiero tanto como tú a mí.

A mis primas Mariana García y Alejandra García con quienes crecí entre juegos, cariño, felicidad, juguetes, aventuras, travesuras, cigarros.

A mis maestros y amigos, que con sus enseñanzas han ayudado a moldear mi ser, que me han dado sus conocimientos para hacer de mí una mejor persona sin pedir nada a cambio: el Dr. Armando Romero y Andrés Fonseca.

A mis abuelitas Delfinita Bazán y Mercedes López, las quiero mucho.

A mis tíos Araceli Rea, Jesús Aurelio Rea, Rosalba Rea, Olguita García, Teresita García, Evaristo García y al Dr. Teodoro Cerecedo.

A Ricardo Díaz por esta amistad de tantos años y tantas experiencias.

A mis compañeros del laboratorio, próximos maestros en ciencias: Verónica Rojo, Manuel Meneses y Lorenzo Islas. Gracias por sus consejos y sus palabras. En especial a Lorenzo por todos los problemas que me ha ayudado a resolver.

A mis amigos de la prepa 9: Guillermo Ramos, Jesús Martínez, Edy García, Obed Bustos, Jorge Adrian, Isidro Pollas y Josué Ramos. Porque con ustedes pasé una de las mejores etapas de mi vida.

A los integrantes del laboratorio de cáncer pulmonar: Rubén, Berenice, Fidel, Rodolfo, Erendira, Liliana, Norma, Osvaldo, Ángeles, Susana, Dolores, Héctor, Olivia.

A mis amigos de toda la carrera Erick Cruz y Guillermo Zerón

A Oscar Ortiz e Icken Hernández, porque no se necesita mucho tiempo para formar una gran amistad.

A mis amigos de la facultad: Silvia Cruz, Susana Jano, Araceli Loredó, Diana Leticia, Diana Rivera, Marco Águila, Óscar Lucio y Cynthia Rodríguez.

A mi Universidad, la Universidad de mi país, la UNAM, que aun y con los problemas que tenemos somos la mejor institución de México. Que me ha dado todo, y que con mi trabajo y acciones estoy dispuesto a regresarle cuanto me ha brindado y más.

A todo aquel que ha tenido el tiempo y el gusto de enseñarme.

## ABREVIATURAS

---

ACAD. Muerte celular autónoma de células T activadas.  
AICD. Muerte celular inducida por activación.  
APAF1. Factor 1 de activación de proteasas apoptóticas.  
APC. Células presentadoras de antígenos.  
BH3. Dominio de homología 3.  
BIM. Mediador de muerte celular que interactúa con Bcl-2.  
CARD. Dominio de reclutamiento y activación de caspasas.  
DD. Dominio de muerte.  
DED. Dominio efector de muerte.  
DISC. Complejo señalizador inductor de muerte.  
FADD. Dominio de muerte asociado a FAS  
HPK1. Proteína cinasa hematopoyética 1.  
IAP. Proteína inhibidora de la apoptosis.  
IFN- $\alpha$ . Interferon alfa.  
IFN- $\gamma$ . Interferon gama  
LT $\alpha$ . Linfotoxina alfa.  
MAPK. Proteínas cinasas activadas por mitógeno  
NGF. Factor de crecimiento nervioso.  
NSCLC. Cáncer pulmonar de células no pequeñas.  
PUMA. Modulador de la apoptosis regulado por p53.  
SCCHN. Carcinoma escamoso de cabeza y cuello.  
TCR. Receptor de linfocitos T.  
TIL. Linfocitos infiltrantes de tumor.  
TNF. Factor de necrosis tumoral.  
TRAIL. Ligando inductor de muerte asociado al TNF.  
I $\kappa$ B. Inhibidor de NF- $\kappa$ B.  
LMP2. Polipéptido de baja masa molecular 2.  
LMP7. Polipéptido de baja masa molecular 7.  
TAP. Transportador asociado con el procesamiento antigénico  
VEGF. Factor de crecimiento vascular endotelial.

# ÍNDICE

---

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>I INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
1.1 Cáncer .....	2
1.2 Cáncer de pulmón .....	2
1.2.1 Clasificación del cáncer de pulmón .....	3
<b>1.3 Pleura</b> .....	<b>3</b>
<b>1.4 Derrame pleural</b> .....	<b>4</b>
1.4.1 Derrame en neoplasia.....	4
<b>1.5 Respuesta del sistema inmunitario en cáncer</b> .....	<b>5</b>
<b>1.6 Mecanismos tumorales de evasión al sistema inmunitario</b> .....	<b>7</b>
1.6.1 Alteración en la maquinaria de presentación de antígenos.....	8
1.6.2 Defectos en la señalización en el TCR .....	9
1.6.3 Secreción de factores inmunosupresores .....	9
1.6.4 Inmunosupresión a través de la modulación del catabolismo del triptófano.....	10
1.6.5 Inducción de tolerancia.....	10
1.6.6 Resistencia a la apoptosis e hipótesis del contraataque tumoral .....	12
1.6.7 Interacciones proteína-glicano en el escape inmunitario tumoral.....	12
1.6.8 Sensibilización de linfocitos T a la muerte por AICD .....	13
<b>1.7 Apoptosis</b> .....	<b>13</b>
<b>1.8 Caspasas</b> .....	<b>14</b>
1.8.1 Activación de caspasas .....	14
<b>1.9 Vías de inducción de apoptosis</b> .....	<b>16</b>
1.9.1 Vía extrínseca o del receptor.....	16
1.9.2 Vía intrínseca o de la mitocondria.....	19
<b>1.10 Linfocitos T CD8+</b> .....	<b>20</b>
<b>1.11 Activación y homeostasis de linfocitos T CD8+</b> .....	<b>21</b>
1.11.1 Activación de linfocitos T.....	21
1.11.2 Mecanismos efectores de los linfocitos T CD8+ citotóxicos.....	22
1.11.3 Homeostasis de linfocitos T.....	23
<b>1.12 AICD</b> .....	<b>23</b>
1.12.1 Factores involucrados en la AICD .....	24
<b>1.13 ACAD</b> .....	<b>25</b>
<b>1.14 Muerte de linfocitos T independiente de caspasas</b> .....	<b>26</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	<b>28</b>
2.1 Muerte de linfocitos T efectores mediada por tumor .....	28
2.2 AICD en cáncer .....	30
2.3 AICD en cáncer de pulmón .....	32
<b>III JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>34</b>
<b>IV HIPÓTESIS</b> .....	<b>35</b>
<b>V OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
5.1 Objetivo general .....	36
5.2 Objetivos particulares .....	36

<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
6.1 Esquema general de trabajo.....	37
6.2 Población estudiada .....	38
6.3 Separación de células mononucleares .....	38
6.4 Inhibidores de caspasas .....	38
6.5 Citómetros.....	38
6.6 Activación de los linfocitos T.....	39
6.7 Determinación del porcentaje de linfocitos T CD8+ en apoptosis por marcaje con anexina V y yoduro de propidio .....	39
6.8 Determinación del porcentaje de linfocitos T CD8+CD69+ .....	40
6.9 Determinación del porcentaje de las subpoblaciones naïve, memoria y efectora de linfocitos T CD8+ en apoptosis y activación .....	40
6.10 Análisis del porcentaje de linfocitos T CD8+ y sus subpoblaciones en apoptosis y activación .....	41
6.11 Análisis estadístico.....	44
<b>VII RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
7.1 Estandarización del ensayo de detección de apoptosis y de la concentración de los inhibidores de caspasa 8 y caspasa 9.....	45
7.2 Activación de los linfocitos T CD8+ provenientes de derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar .....	47
7.3 Muerte celular inducida por activación en linfocitos T CD8+ provenientes de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma pulmonar.....	48
7.4 Efecto de los inhibidores de caspasa 8, caspasa 9 y su mezcla en la muerte celular inducida por activación de linfocitos T CD8+ provenientes de derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar .....	51
7.5 Porcentaje de activación y apoptosis en las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ provenientes de derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar.....	53
<b>VIII DISCUSIÓN</b> .....	<b>56</b>
<b>IX CONCLUSIONES</b> .....	<b>61</b>
<b>X BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>62</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1.1. Derrame pleural .....	4
Figura 1.2. Principales mecanismos tumorales de evasión al sistema inmunitario.....	8
Figura 1.3. Mecanismo de activación de caspasas.....	15
Figura 1.4. Caspasas efectoras y caspasas iniciadoras .....	16
Figura 1.5. Vía del receptor o extrínseca de la apoptosis .....	18
Figura 1.6. Vía mitocondrial o intrínseca de la apoptosis .....	20
Figura 1.7. Mecanismo citocida de linfocitos T CD8+ efectores dependiente de la vía de gránulos.....	22
Figura 2.1. Muerte de linfocitos T CD8+ mediada por células tumorales.....	28
Figura 6.1. Análisis realizado para cuantificar el porcentaje de apoptosis en linfocitos T CD8+ .....	42
Figura 6.2. Determinación del porcentaje de células T CD8+ activadas .....	42
Figura 6.3. Análisis representativo realizado para la determinación del porcentaje de activación y apoptosis en linfocitos T CD8+ .....	43
Figura 7.1. Análisis de la apoptosis inducida por campotecina, anticuerpo antiFas o luz UV en una muestra representativa de CMN provenientes de sangre periférica de un sujeto sano.....	46
Figura 7.2. Análisis de una muestra representativa del porcentaje de activación de CMN provenientes de derrame pleural de un paciente con adenocarcinoma pulmonar. Porcentaje de activación en linfocitos T CD8+ provenientes de derrame pleural.....	49
Figura 7.3. Porcentaje de activación y apoptosis específica en linfocitos T CD8+ de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma pulmonar.....	50
Figura 7.4. Comparación del porcentaje de apoptosis específica inducida por activación con anticuerpo antiCD3 en linfocitos T CD8+ provenientes de sangre periférica y derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar .....	51
Figura 7.5. Análisis de una muestra representativa de CMN provenientes de derrame pleural de un paciente con adenocarcinoma pulmonar. Porcentaje de apoptosis específica de linfocitos T CD8+ incubados con el anticuerpo antiCD3 por 24h bajo distintos tratamientos .....	53
Figura 7.6. Análisis de una muestra representativa de linfocitos T CD8+ provenientes de derrame pleural maligno.....	55
Figura 7.7. Porcentaje de activación (expresión de CD69) de las subpoblaciones naïve y de memoria de linfocitos T CD8+ provenientes de derrame pleural maligno .....	56

## RESUMEN

---

El cáncer de pulmón es el tipo de cáncer más común en la población mundial. En México, en el periodo de 1990-2010, ha sido una de las principales causas de muerte por tumores malignos.

Se ha reportado que los linfocitos T CD8+ de pacientes con cáncer están sensibilizados a la apoptosis. La AICD, o muerte celular inducida por activación, es un mecanismo que regula la homeostasis del linfocito T; donde las células T crónicamente estimuladas son eliminadas por apoptosis. La AICD se ha propuesto como un posible mecanismo de evasión tumoral a la respuesta inmune en cáncer pulmonar.

En el presente trabajo se determinó la participación de las caspasas iniciadoras 8 (vía del receptor) y 9 (vía de la mitocondria) en el proceso de AICD mediada por el anticuerpo antiCD3 en linfocitos T CD8+ provenientes de derrame pleural de pacientes con carcinoma pulmonar.

Los linfocitos T CD8+ provenientes de líquido pleural de pacientes con carcinoma pulmonar, fueron estimulados con el anticuerpo antiCD3 e incubados por 24 h con inhibidores específicos de las caspasa iniciadoras 8 ó 9. Los porcentajes de células apoptóticas se determinaron en la población total de linfocitos T CD8+, así como en las subpoblaciones naïve y de memoria, mediante el ensayo de unión a anexina V por citometría de flujo.

En los linfocitos T CD8+ de derrame pleural estimulados con el anticuerpo antiCD3, se observó un incremento significativo en el porcentaje de células apoptóticas, el cual disminuyó en presencia de ambos inhibidores. En la subpoblación naïve (CD45RA+CD27+), se observó una reducción significativa en la apoptosis con los dos inhibidores; sin embargo, en la subpoblación de memoria (CD45RA-CD27+), solo el inhibidor de caspasa 8 disminuyó el porcentaje de células apoptóticas.

En los pacientes con carcinoma pulmonar, los linfocitos T CD8+ provenientes de líquido pleural, después de ser activados con el anticuerpo antiCD3 entran en apoptosis dependiente de la vía del receptor. En particular, en la subpoblación naïve se lleva a cabo la señalización de células tipo II, con una amplificación de la señal apoptótica por la mitocondria; y en la subpoblación de memoria la señalización es de tipo I, dependiente únicamente de la caspasa 8 activada por la vía del receptor.

## I INTRODUCCIÓN

---

### 1.1 Cáncer

El término cáncer se utiliza para agrupar aproximadamente 200 enfermedades que se caracterizan por la replicación celular descontrolada.<sup>1</sup> El cáncer se origina por el proceso multietapas de acumulación de cambios genéticos y epigenéticos en la célula, principalmente en genes supresores de tumor y protooncogenes. Lo anterior incrementa la inestabilidad genómica, proporcionando a la célula ganancia o pérdida de funciones que culminan en la proliferación continua de la célula y el desarrollo de un tumor.<sup>1,2</sup>

La inestabilidad genética favorece la expansión de las clonas mutadas que entre las ventajas que tienen sobre las células normales se encuentran: Capacidad de proliferación independientemente de mitógenos exógenos, capacidad para proliferar en presencia de señales inhibitorias, resistencia a la apoptosis, potencial proliferativo sin restricción (inmortalidad), capacidad para formar vasculatura (angiogénesis), y la habilidad para invadir tejido circundante y eventualmente metástasis.<sup>3</sup>

El cáncer es un importante problema de salud ya que es responsable del 10% al 25% de las muertes mundiales.<sup>1</sup> Se estima que en el año 2005, fallecieron 7.6 millones de personas por cáncer y en 2007 se presentaron 11.3 millones de casos y se espera que esta cifra siga en aumento.<sup>4</sup>

En México, en el período de 2004 a 2007, los casos de cáncer se incrementaron, pasando de 136 800 casos a 153 800.<sup>5</sup>

### 1.2 Cáncer de pulmón

Entre todos los tipos de cáncer, el de pulmón se mantiene a nivel global como el más común, con una prevalencia de 1.2 millones de casos por año.<sup>6,7,8</sup>

La incidencia de cáncer pulmonar aumentó considerablemente durante el siglo XX sobre todo en países occidentales. Este aumento está claramente relacionado con el tabaquismo,<sup>7</sup> el cual causa el 80-90% de los casos. El humo del tabaco contiene más de 20 sustancias que actúan como carcinógenos entre ellos se encuentran los hidrocarburos policíclicos aromáticos y las nitrosaminas. Estos carcinógenos se unen al DNA formando aductos que llevan a mutaciones, especialmente transversiones G-T, las

cuales al no ser reparadas, se acumulan gradualmente y favorecen la proliferación celular descontrolada.<sup>6</sup>

El cáncer de pulmón tiene la tasa de mortalidad más alta a nivel mundial, la cual es muy similar a su tasa de incidencia y, a pesar de las mejoras en los tratamientos, aproximadamente el 90% de los pacientes morirán por esta enfermedad.<sup>1,6</sup>

Aun cuando la mayoría de los casos de cáncer de pulmón son atribuidos al consumo de cigarrillos, aproximadamente solo el 1-5% de los fumadores pesados llegan a desarrollar este padecimiento, sugiriendo que pueden existir factores genéticos que aumentan la predisposición a esta enfermedad.<sup>7</sup>

### *1.2.1 Clasificación del cáncer de pulmón*

El cáncer de pulmón comprende cuatro tipos histológicos, estos incluyen al carcinoma pulmonar de células pequeñas (SCLC) que representa el 15% de todos los casos de carcinoma pulmonar. El SCLC es de origen neuroendocrino y su localización es en las vías aéreas centrales, es el más agresivo y tiene la mayor capacidad metastásica.<sup>9,10</sup>

Los tres tipos histológicos restantes están comprendidos en el carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC). Se agrupan por razón de que su pronóstico y tratamiento son muy similares. Existen tres subtipos principales: el carcinoma de células escamosas, el adenocarcinoma y el carcinoma pulmonar de células grandes.<sup>7,9,11</sup> Actualmente el adenocarcinoma es la forma más común de cáncer pulmonar y se presenta principalmente en mujeres, y en personas jóvenes no fumadoras.<sup>6,7,10</sup>

## **1.3 Pleura**

La pleura es una membrana serosa de origen mesodérmico, constituida por una capa de tejido conectivo cubierta por epitelio escamoso simple. Consta de dos porciones: la pleura parietal y la visceral.<sup>11</sup> La pleura visceral, adherida íntimamente al pulmón, cubre toda la superficie pulmonar incluyendo las cisuras. La pleura parietal se adosa o recubre la parte interna del tórax, el mediastino y el diafragma.<sup>11</sup>

Entre las dos pleuras se forma un espacio denominado cavidad pleural. Esta cavidad contiene una fina capa de líquido cuya función es facilitar el deslizamiento entre ambas estructuras y evitar la fricción durante los movimientos respiratorios.<sup>11</sup>

En condiciones fisiológicas existe una escasa cantidad de líquido pleural de no más de 10-15 mL en cada hemitórax. Un desequilibrio entre la formación y la reabsorción del líquido pleural produce la acumulación del mismo en la cavidad pleural lo que clínicamente se denomina derrame pleural.<sup>12</sup>

#### 1.4 Derrame pleural

El derrame pleural es una patología caracterizada por la presencia o acumulación anormal de líquido en la cavidad pleural (Fig. 1.1). El líquido puede tener dos orígenes distintos, puede ser el resultado de un exudado o de un trasudado.<sup>12</sup>

El trasudado se da principalmente en la insuficiencia cardíaca crónica, otras causas son la cirrosis hepática, la insuficiencia renal crónica, el síndrome nefrótico y la diálisis peritoneal.

El líquido del trasudado tiene un pH neutro, se caracteriza por tener menor densidad y menor concentración de proteínas.<sup>12</sup>

Las causas que producen el exudado pueden tener varios orígenes, ya sea de carácter pulmonar o extrapulmonar. El pulmonar principalmente es por: cáncer, inflamación, linfoma, metástasis, infarto, traumatismo, neumonía, embolismo pulmonar, empiema, tuberculosis, infecciones por virus, hongos, riketsias o parásitos y enfermedades del tejido conectivo. El extrapulmonar puede ser por: cirrosis, lupus eritematoso sistémico pancreatitis, embarazo, uremia, exposición a asbestos, quilotórax, sarcoidosis, reacción a fármacos y postinfarto del miocardio.<sup>12,13</sup>

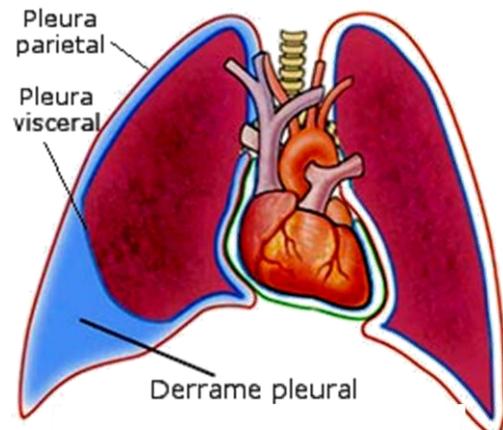


Fig. 1.1 Derrame pleural

##### 1.4.1 Derrame en neoplasia

El cáncer pulmonar es la causa más frecuente de derrame pleural en el adulto y se presenta en un 7 a 15% de los pacientes.<sup>13</sup> De los tipos histológicos de carcinoma pulmonar el adenocarcinoma se asocia con mayor frecuencia a esta manifestación clínica. El mecanismo más aceptado por el cual se forma el derrame pleural maligno es

por un aumento en la permeabilidad capilar pleural y por un drenaje inadecuado de la circulación linfática causado por la invasión o filtración tumoral hacia los ganglios linfáticos del mediastino.<sup>14</sup>

La sintomatología del paciente con cáncer pulmonar es diversa, el derrame pleural causa en el paciente disnea, dolor y tos, la toracocentesis es el procedimiento utilizado para retirar el líquido de la cavidad pleural y así contribuir a mejorar la calidad de vida del paciente.<sup>13,14</sup> Los derrames pleurales malignos tienen algunas características: son serohemáticos o hemáticos de color rojo oscuro o vino, con predominio de linfocitos.<sup>11,14</sup> Además en estos podemos encontrar células tumorales, por lo que el derrame pleural se considera un sitio adecuado para estudiar la respuesta inmune antitumoral.<sup>15</sup>

### **1.5 Respuesta del sistema inmunitario en cáncer**

El sistema inmunitario ha evolucionado para detectar y eliminar patógenos que pueden ser dañinos para el organismo; también actúa como un mecanismo que vigila y elimina el desarrollo de células transformadas. La interacción entre el sistema inmune y las células malignas tiene un papel muy importante en el desarrollo de la tumorigénesis, la falla del sistema inmunológico para detectar y rechazar células transformadas puede llevar al desarrollo de cáncer.<sup>16</sup>

Los tumores expresan antígenos que son reconocidos como extraños por el sistema inmunitario del individuo portador del tumor;<sup>17</sup> sin embargo, las células del sistema inmunitario se enfrentan a una serie de complicaciones para erradicar las células tumorales, ya que estas por ser células propias del organismo solo expresan una pequeña cantidad de antígenos que son reconocidos como no propios. Por lo anterior la mayoría de los tumores tienden a ser pobremente inmunogénicos. En general, los tumores que provocan respuestas inmunes intensas son los que expresan antígenos extraños o formas mutadas de proteínas propias.<sup>14,17</sup>

Los linfocitos T, que son parte de la respuesta inmune adaptativa, son las células clave del sistema inmunológico para el control tumoral. En particular, las células T CD8+ activadas pueden eliminar a la célula tumoral después del reconocimiento del antígeno presentado por las moléculas de MCH de clase I de la célula maligna y el receptor de linfocitos T (TCR). Los linfocitos Th1, que son una subpoblación de las células T CD4+

proveen ayuda para la activación de los linfocitos T CD8+.<sup>16</sup> Las células Th2, otra subpoblación de linfocitos T CD4+, estimulan la respuesta inmune humoral y suprimen el desarrollo de la respuesta de tipo Th1. Los linfocitos T CD4+ pueden llegar a tener actividad citotóxica en algunas situaciones. Los linfocitos T CD8+ y T CD4+ reconocen antígenos presentados como péptidos cargados en las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I y clase II, respectivamente.<sup>16</sup>

Los linfocitos NK, que son células del sistema inmunitario innato, también tienen un papel importante en el reconocimiento y eliminación de células tumorales. Las células NK matan células deficientes de moléculas del MHC clase I. La actividad de los linfocitos NK es controlada por un balance entre señales positivas y negativas. Los receptores inhibidores que reconocen entre otros a las moléculas MHC de clase I bloquean las señales de activación, así que las células tumorales que han perdido la expresión de las moléculas del MHC de clase I serán eliminadas al entrar en contacto con los linfocitos NK.<sup>16</sup>

Otras células del sistema inmunitario como los macrófagos y los neutrófilos también participan en la inmunidad frente a tumores, contribuyendo a su eliminación ya sea matando directamente a las células tumorales, destruyendo los vasos sanguíneos que irrigan al tumor o inhibiendo la angiogénesis. Además pueden presentar antígenos tumorales y estimular otras células del sistema inmunitario como a los linfocitos T CD8+ y células NK.<sup>16</sup>

Han sido propuestos dos modelos diferentes para explicar cómo las células tumorales pueden generar una respuesta inmune: El concepto de inmunovigilancia y el modelo de daño.<sup>16,17</sup>

Acorde al modelo de inmunovigilancia, las células transformadas se producen constantemente en el organismo y éstas son reconocidas y eliminadas por el sistema inmunitario, por lo que la función principal del sistema inmunitario es contra el cáncer es vigilar el cuerpo para detectar y eliminar células tumorales conforme van apareciendo.<sup>16,18</sup> En el modelo de daño, el sistema inmune utiliza células presentadoras de antígeno (CPA) como centinelas del daño a tejidos, en la presencia de señales de daño, las células presentadoras de antígenos profesionales estimulan la respuesta de los linfocitos T.<sup>16</sup>

## 1.6 Mecanismos tumorales de evasión al sistema inmunitario

Las células tumorales presentan múltiples mecanismos para evadir la respuestas del sistema inmunitario, ya sea para evitar su reconocimiento o para inhabilitar a las células T efectoras.<sup>19</sup> Estos mecanismos incluyen desde alteraciones en las propias células tumorales, la liberación de factores solubles que inhiben la participación (activación) de distintas células del sistema inmunitario, hasta la inducción de poblaciones celulares específicas que regulan negativamente a las células inmunes.<sup>19</sup> Los principales mecanismos de evasión hasta ahora descritos se muestran en la tabla 1 y en la Figura 1.2. Algunos de ellos se explican a continuación.

Tabla 1. Mecanismos tumorales de evasión al sistema inmunitario<sup>19</sup>

Estrategia	Mecanismo
<b>Ignorancia del tumor</b>	Falta de señales de daño Deficiente presentación de antígenos en ganglios linfáticos Crecimiento del tumor en sitios inmunoprivilegiados
<b>Defectos en la presentación de antígeno</b>	Falta de moléculas de adhesión en células tumorales Estroma tumoral como barrera física Mutación o disminución de la expresión de antígenos tumorales Mutación o expresión disminuida de los genes del MHC Defectos en las vías de procesamiento y presentación de antígeno
<b>Producción de factores y moléculas inmunosupresoras</b>	Citocinas inhibitorias (TGF- $\beta$ , IL-10, VEGF, factores tumorales solubles) Prostaglandinas Gangliósidos Modulación del metabolismo del triptófano
<b>Inducción de tolerancia</b>	Inducción de anergia por falta de señales coestimuladoras Células T reguladoras Vías de coestimulación negativas Muerte de linfocitos T citotóxicos *Defectos en la señalización proximal del TCR
<b>Resistencia a la apoptosis</b>	Expresión incrementada de moléculas antiapoptóticas Mutación o disminución de moléculas proapoptóticas
<b>Contraataque</b>	Expresión de CD95L (FasL) Expresión de otros ligandos de receptores de muerte *Defectos en la señalización proximal del TCR
<b>Inducción de apoptosis en células del sistema inmune</b>	Aumento en la expresión de ligandos y receptores de muerte en células del sistema inmune (Linfocitos) Sensibilización de Linfocitos a la AICD

*TGF- $\beta$ . Factor de crecimiento transformante beta. VEGF. Factor de crecimiento vascular-endotelial. AICD. Muerte celular inducida por activación. ACAD. Muerte autónoma de células T activadas \*Mecanismo considerado dentro de las 2 estrategias (inducción de tolerancia y contraataque)*

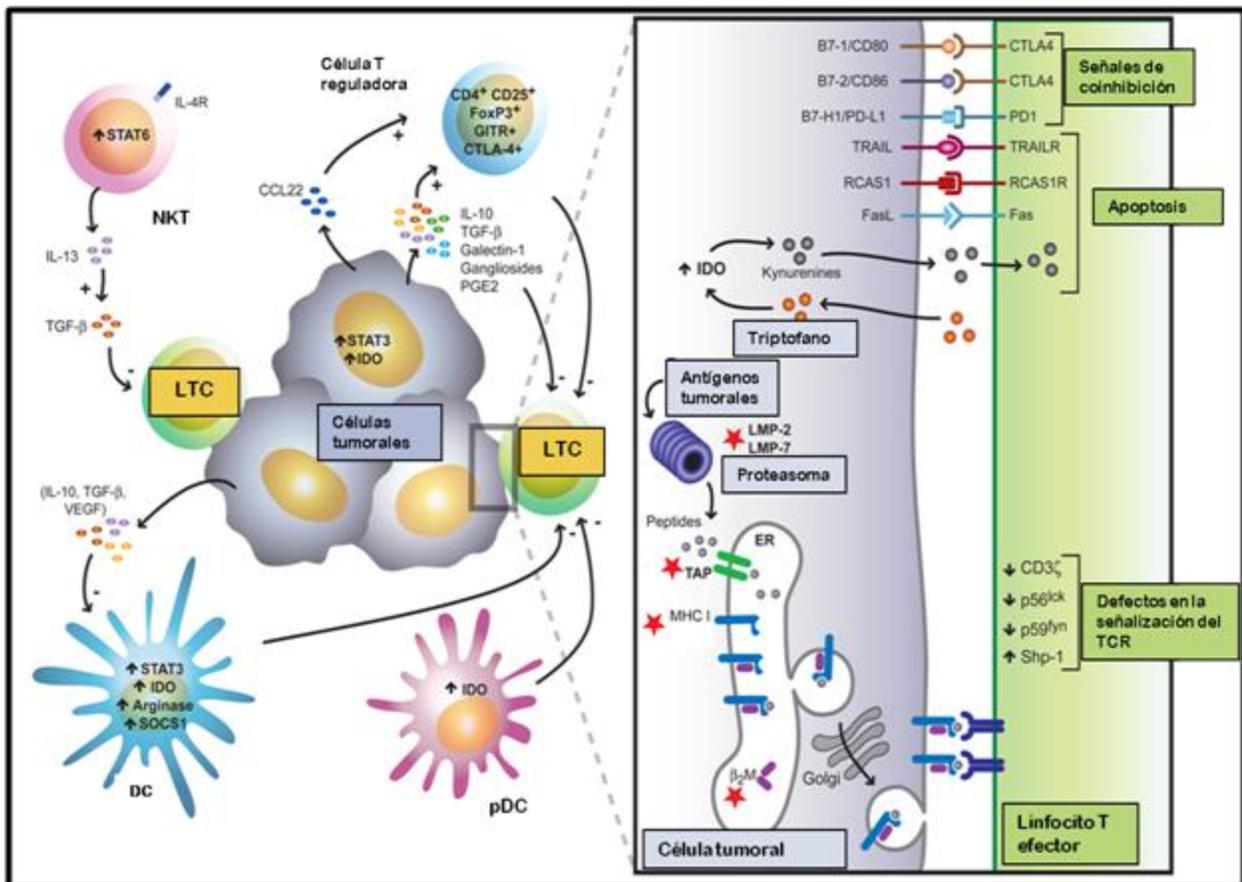


Figura 1.2. Principales mecanismos tumorales de evasión al sistema inmunitario. Las células tumorales emplean un repertorio de mecanismos inmunosupresores para evadir la respuesta inmune del huésped, estos incluyen defectos en la señalización proximal del TCR, alteración en la maquinaria tumoral de presentación de antígenos (estrellas rojas), señales de coinhibición de linfocitos T (CTLA-4/B7, PD-1/PD-L1), secreción de factores inmunosupresores (IL-10, TGF- $\beta$ , gangliósidos, PGE<sub>2</sub>), activación de vías proapoptóticas en los linfocitos T (FasL, TRAIL, IDO, RCAS1), y la inhibición de la diferenciación y maduración de células dendríticas (Stat3, VEGF, IL-10, arginasa). Aunado a la generación y participación de poblaciones de células inmunoregulatoras, éstas incluyen a las células T reguladoras (CD4+CD25+Foxp3+), células NKT productoras de IL-13 y poblaciones de células dendríticas mieloides y plasmacitoides. LTC. Linfocito T CD8+ o T citotóxico. TCR. Receptor de linfocitos T, TGF- $\beta$ . DC. Célula dendrítica. pDC. Célula dendrítica plasmacitoide. Factor de crecimiento transformante beta. PGE<sub>2</sub>. IL. Interleucina. Prostaglandina E<sub>2</sub>. Modificado de ref. 19.

### 1.6.1 Alteración en la maquinaria de presentación de antígenos

La disminución en la expresión de la maquinaria de presentación de antígenos, mediada por la continua generación de variantes de tumor, generadas por aumento en la frecuencia de mutaciones y deleciones genéticas, ha sido considerada como la estrategia más comúnmente usada por las células tumorales para escapar al control de

los linfocitos T CD8<sup>+</sup>.<sup>20</sup> El mecanismo más frecuente involucra la ausencia completa de la expresión de las moléculas del MHC de clase I y una pérdida selectiva de los alelos del HLA que previene el reconocimiento del tumor por parte del sistema inmunitario. La pérdida total de la expresión de las moléculas del MHC de clase I es causada principalmente por mutaciones en la subunidad  $\beta 2$  de la microglobulina; mientras que la pérdida selectiva de haplotipos, locus o alelos del MHC es causada por rearrreglos y deleciones en los genes, mutaciones puntuales y defectos en la regulación transcripcional celular.<sup>16</sup> La reducción en la presentación de antígenos tumorales también se logra por defectos en la maquinaria de procesamiento antigénico, defectos en componentes del proteasoma (LMP2 y LMP7) que provocan una disminución en la cantidad de péptidos que pueden ser presentados por las moléculas de MHC de clase I.<sup>16,19</sup> En células tumorales, las proteínas TAP (transportador asociado con el procesamiento antigénico) y tapasina, involucradas en la carga de péptidos antigénicos a las moléculas del MHC de clase I, se encuentran frecuentemente mutadas o disminuidas. La deficiencia de TAP provoca una pérdida en la expresión de las moléculas del MHC de clase I y aumenta la tumorigénesis.<sup>16</sup>

### *1.6.2 Defectos en la señalización en el TCR*

Se ha descrito que algunos tumores inducen en los linfocitos T infiltrantes de tumor (TIL) una marcada disminución en la expresión de la cadena CD3 $\zeta$ , que contiene dominios de tirosina cinasas, moléculas que tienen un rol importante en los eventos de señalización por el TCR, lo que conduce a que los TIL sean disfuncionales.<sup>12</sup>

### *1.6.3 Secreción de factores inmunosupresores*

Otra estrategia utilizada por los tumores para escapar del sistema inmunitario es la producción de factores supresores. Estos factores pueden ser expresados por las células malignas o éstas estimular a las células no transformadas presentes en el sitio del tumor tales como células inmunes, epiteliales o células del estroma, a expresarlos. El TGF- $\beta$  o factor de crecimiento transformante beta es el factor predominante, el TGF- $\beta$  es una citocina pleiotrópica, que inhibe la respuesta inmune antitumoral evitando la activación, proliferación y diferenciación de varios tipos de células de la inmunidad innata y adaptativa, principalmente en los linfocitos T.<sup>16,19</sup> En estas células, el TGF-

$\beta$  reprime la expresión de diferentes productos de genes citolíticos, como la perforina, las granzimas A y B, y el ligando de Fas (FasL) que son los responsables de la citotoxicidad en contra del tumor, mediada por los linfocitos T CD8<sup>+</sup>.<sup>19</sup>

El VEGF o factor de crecimiento vascular endotelial es producido por muchas células tumorales. Aunado a sus propiedades angiogénicas, el VEGF inhibe la diferenciación de progenitores de células dendríticas.<sup>16</sup>

Otros factores inmunosupresores expresados por las células malignas o estromales y presentes en el microambiente tumoral son: prostaglandinas, como la prostaglandina E<sub>2</sub>, la interleucina 10 (IL-10), el factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos, sialomucinas y gangliósidos.<sup>16,19,21</sup>

#### *1.6.4 Inmunosupresión a través de la modulación del catabolismo del triptófano*

La enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) participa en un mecanismo presente en el microambiente tumoral que puede contribuir con el establecimiento de tolerancia inmune hacia el tumor. Esta enzima es la encargada de brindar privilegio inmunológico a sitios como la unidad feto-placentaria. Se ha demostrado que un aumento en la expresión de esta enzima en células tumorales, correlaciona con un crecimiento tumoral más agresivo y que impide la regresión de tumores establecidos.<sup>19,22</sup>

#### *1.6.5 Inducción de tolerancia*

La falta de respuesta de los linfocitos T a antígenos asociados a tumor, que también son expresados por otras células del cuerpo, puede ser explicado por el mecanismo llamado tolerancia inmunitaria.<sup>16,17</sup> En el timo, los linfocitos T auto-reactivos son eliminados por un proceso llamado tolerancia central. El mecanismo de tolerancia periférica previene la autoinmunidad evitando que los linfocitos T maduros que reconocen antígenos propios en tejidos periféricos puedan montar una respuesta en contra de estos antígenos. La inducción de la tolerancia periférica es un proceso complejo, pero en principio, hay cuatro mecanismos principales encargados de realizar este proceso que son: *i) Inducción de anergia*. La activación de los linfocitos requiere dos señales, la primera es la unión del TCR al complejo péptido-molécula de MHC y la segunda es la unión de moléculas coestimulatorias a sus ligandos en la superficie de los linfocitos T (ej. Proteínas B7-CD80). Si un linfocito T reconoce mediante su TCR a

un complejo péptido-molécula de MHC sin suficiente coestimulación, el linfocito se vuelve anérgico, es decir incapaz de responder a la re-exposición de ese antígeno.<sup>16,17</sup> Muchas células tumorales no expresan moléculas coestimuladoras y por lo tanto pueden inducir anergia en los linfocitos T.<sup>16</sup>

*ii) La desviación inmunitaria.* En este proceso, la respuesta inmune celular tipo Th1 requerida para que los linfocitos T CD8+ participen en la eliminación de las células tumorales, es modificada hacia una respuesta tipo Th2 o humoral. El mecanismo de desviación inmunitaria aun no es comprendido del todo, pero depende principalmente en la secreción de TGF- $\beta$  e IL-10.<sup>16</sup>

*iii) La generación de células T reguladoras ( $T_{reg}$ ).* Diferentes poblaciones de células regulatorias pueden ser reclutadas y activadas en el sitio del tumor para inhibir a las células inmunológicas. La población de células  $T_{reg}$  naturales se define por los marcadores CD4, Foxp3 y CD25, y son supresoras de la respuesta de los linfocitos T *in vivo*.

Las  $T_{reg}$  se encuentran en la circulación o en el tumor mismo en pacientes con cáncer de pulmón, páncreas, ovario y piel.<sup>23</sup> Otras poblaciones que disminuyen la capacidad de los linfocitos T para responder ante el tumor, son las células  $T_{reg}$  productoras de IL-10, así como las células NKT CD4+ secretoras de IL-13 y TGF- $\beta$ .<sup>19</sup>

*iv) Supresión de la actividad de los linfocitos T por moléculas de coinhibición.* Las vías de coinhibición en el microambiente tumoral tienen también un papel importante en el establecimiento de la tolerancia inmunitaria hacia el tumor. Entre las señales inhibitorias más estudiadas se encuentra un receptor estructuralmente homólogo a CD28 llamado CTLA-4, que se expresa en los linfocitos T recién activados y que impide su activación contrarrestando las señales liberadas por CD28.<sup>17,19</sup>

Otro punto de control inmunológico que contribuye al escape tumoral involucra la interacción entre el receptor PD-1 y sus ligandos PD-L1 o PD-L2, resultando en la inhibición de la activación de los linfocitos. PD-L1 es expresado por diferentes tipos de tumores y promueve la apoptosis de las células T CD8+.<sup>17,19,24</sup>

En los linfocitos T se ha identificado un tercer receptor con capacidad inhibitoria, el BTLA o atenuador de linfocitos B y T, éste tiene similitud con CTLA-4 y PD-1; sin embargo, no es expresado por linfocitos T naïve pero es inducido durante la activación de las células T.<sup>19</sup> Para que exista una acción efectiva de las respuestas antitumorales

en contra del tumor se requiere del bloqueo de los puntos de regulación negativos que pueden interrumpir las respuestas de las células T efectoras.

#### *1.6.6 Resistencia a la apoptosis e hipótesis del contraataque tumoral*

Dos estrategias usadas por las células tumorales para evadir su rechazo por el sistema inmunitario están relacionadas con la apoptosis. En la primera, las células malignas cambian la expresión de moléculas involucradas en las vías apoptóticas, lo que resulta en una resistencia por parte del tumor a los mecanismos citocidas de las células T CD8+ del sistema inmune.<sup>16</sup> La segunda implica uno de los mecanismos más controversiales de escape tumoral al sistema inmunitario; en la hipótesis del contraataque tumoral, se involucra la expresión, en las células tumorales, de ligandos (FasL, TRAIL) para receptores de muerte. Numerosos estudios muestran resultados contradictorios de esta hipótesis, mientras varios grupos la apoyan e incluso han sugerido la secreción tumoral de microvesículas que contienen FasL funcional; otros grupos han demostrado que este ligando no se expresa en varias líneas celulares de diferentes tipos de tumor o incluso, en las que sí lo presentan le han adjudicado un papel pro-inflamatorio.<sup>15,19</sup> Los ligandos de muerte y otras moléculas como la quimiocina RANTES, el ligando RCAS1 y mecanismos que involucran gangliósidos e interacciones CD70-CD27 también han demostrado tener efectos involucrados en la muerte de células T inducida por tumor.<sup>19</sup>

#### *1.6.7 Interacciones proteína-glicano en el escape inmunitario tumoral*

Las interacciones proteína-glicano tienen un papel importante en varios aspectos de la biología del cáncer, incluyendo la metástasis, angiogénesis y la inflamación. Las galectinas son una familia de proteínas de unión a glicanos conservada evolutivamente. La galectina-1 está presente en diferentes tipos tumorales, y sus niveles de expresión correlacionan con la agresividad de estos tumores y en la adquisición de un fenotipo metastático. La galectina-1 inhibe las funciones efectoras de las células T, induciéndoles apoptosis, sensibilizándolas a la muerte mediada por FasL, bloqueando la señalización proximal al TCR y suprimiendo la secreción de citocinas proinflamatorias. La susceptibilidad de los linfocitos T a la galectina-1, puede estar dada por la expresión regulada de glicosiltransferasas durante la activación y diferenciación

de estas células, que crean ligandos de N-acetilactosamina, a los cuales se une la galectina 1. Otros miembros de la familia de galectinas, tales como las galectinas 2, 3 y 9, también afectan la supervivencia y activación de los linfocitos T, por vías que podrían ser similares a la de la galectina 1.<sup>19</sup>

#### *1.6.8 Sensibilización de linfocitos T a la muerte por AICD*

La estimulación antigénica repetitiva induce apoptosis en los linfocitos T en un proceso llamado muerte celular inducida por activación (AICD). Así que la administración de antígenos como superantígenos, péptidos, células alogénicas o la directa reestimulación del TCR con anticuerpo antiCD3, ha mostrado inducir tolerancia por depleción de linfocitos T.<sup>16,25</sup> Este proceso es primordialmente mediado vía el sistema Fas/FasL. La coestimulación por CD28 puede rescatar a los linfocitos T de la AICD, brindándole a la expresión de las proteínas B7 en el tumor otro papel importante.<sup>16</sup> Los tumores han mostrado inducir tolerancia vía la eliminación de linfocitos T anti tumorales por medio de la AICD, como resultado de la estimulación crónica con antígenos tumorales.<sup>16,26,27</sup>

### **1.7 Apoptosis**

La apoptosis se puede definir como un tipo de muerte celular controlada, en la que la célula, después de recibir ciertos estímulos ya sean endógenos o exógenos, moviliza moléculas que desencadenan cascadas de complejas reacciones bioquímicas. Éstas activarán diferentes proteasas provocando el corte y desmantelamiento de diversos sustratos, lo que concluirá con la muerte de la célula.

Los organismos multicelulares necesitan un mecanismo para controlar la proliferación excesiva de células, así como aquellas que son potencialmente peligrosas. Para este fin se utiliza un programa molecular altamente activo llamado muerte celular regulada o apoptosis. Este proceso es tan importante como la división o la migración celular, y permite al organismo controlar estrechamente la cantidad de células y el tamaño de los tejidos, así como también brinda protección contra aquellas células que significan una amenaza para su homeostasis.<sup>25,28</sup>

## 1.8 Caspasas

La mayoría de los cambios morfológicos y bioquímicos observados en las células apoptóticas, son causados por un conjunto de cisteín-proteasas homólogas entre ellas, y que son parte de una familia conocida como caspasas.<sup>15,29,30</sup> Las caspasas poseen un sitio activo de cisteína y escinden substratos después de residuos de ácido aspártico presentes en la estructura de estos blancos. La especificidad de corte de cada caspasa, está determinada por los cuatro últimos residuos amino terminales adyacentes al sitio activo. Las caspasas se subdividen en familias basadas en su preferencia por algún sustrato, identidad en su secuencia y similitud en su estructura.<sup>28,29,30,31</sup>

Dada su importancia en el proceso apoptótico, las caspasas son consideradas como las moléculas ejecutoras centrales; en efecto, al eliminar la actividad de las caspasas, ya sea por alguna mutación o por acción farmacológica (inhibidores) se disminuye o incluso bloquea la apoptosis.<sup>15,28</sup>

Las caspasas realizan el corte selectivo de un restringido número de blancos, en una o en varias posiciones de la secuencia primaria de estos substratos, activando o inactivándolos, ya sea directamente al hacer cortes en dominios de regulación positiva o negativa en el sustrato, o indirectamente inactivando subunidades regulatorias.<sup>28, 29,30,32</sup>

Se han identificado varios blancos de las caspasas, entre estos están la ICAD, una proteína inhibidora de la nucleasa de DNA, así como lamininas nucleares y proteínas del citoesqueleto como foldrina y gelsolina que al afectarse conllevan a la pérdida de la morfología celular, así como el fenómeno de blebbing.<sup>28,31,33</sup>

### 1.8.1 Activación de caspasas

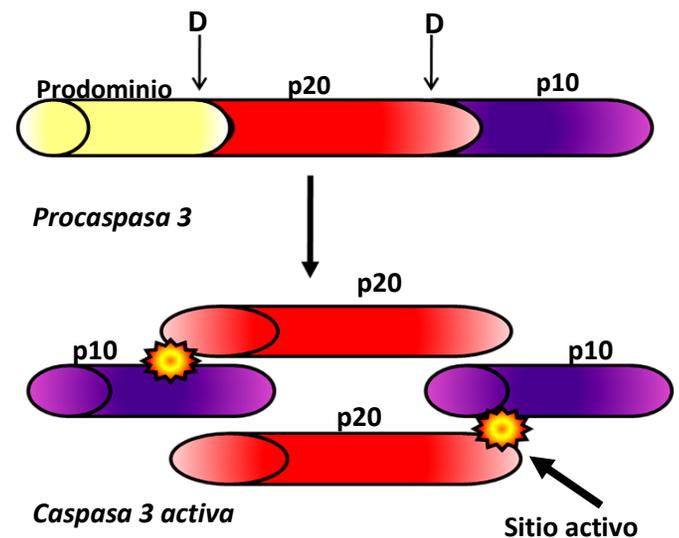
Las caspasas son sintetizadas como zimógenos catalíticamente inactivos, estos zimógenos están compuestos por tres dominios: Un prodominio N-terminal y los dominios p10 y p20 que se encuentran en la enzima madura, la cual está compuesta por un heterotetrámero que contienen dos heterodímeros p20/p10 y dos sitios activos (Fig.1.3).<sup>28,33,29</sup>

El sitio de corte presente en las subunidades p20 y p10 dentro de la procaspasa contiene residuos de aspartato, por lo que estas secuencias pueden actuar como sustrato dentro de la enzima permitiéndole así el corte y activación por esta misma o por otras caspasas activas.<sup>33</sup>

Cada uno de los prodominios “largos” de las caspasas contiene un módulo de interacción proteína-proteína que le permite unirse o asociarse con sus moléculas reguladoras. Las caspasas 8 y 10 contienen un dominio efector de muerte (DED), mientras que las caspasas 2 y 9 contienen un dominio de reclutamiento y activación de caspasas (CARD) (Fig. 1.4). Una estructura similar al CARD es encontrada en el dominio de muerte (DD), un tercer módulo de interacción proteínica presente en varios reguladores apoptóticos, como el Fas y la molécula adaptadora FADD o dominio de muerte

asociado a Fas. Se ha sugerido que las interacciones en estos módulos son intrafamiliares, es decir DD/DD, DED/DED o CARD/CARD.<sup>28</sup> De hecho, estos módulos de adaptación de muerte pueden actuar como reguladores de la activación de caspasas.<sup>28</sup> Tres mecanismos de activación de caspasas han sido descritos:

1) Procesamiento por una caspasa “corriente arriba”, es decir la exposición a una caspasa previamente activada, como es el caso de las caspasas efectoras 3, 6 y 7. Estas caspasas más pequeñas son conocidas como efectoras y carecen de dominios aminotermiales de afinidad tales como dominios de muerte, dominios efectores de muerte, o los dominios de reclutamiento y activación de caspasas, pero son las encargadas de degradar los componentes celulares que llevarán a la muerte de la célula (Fig. 1.4).<sup>28</sup>



*Figura 1.3. Mecanismo de activación de caspasas. Se muestra la estructura de la caspasa efectora 3, como procaspasa contiene un pequeño dominio amino terminal llamado prodominio y las subunidades p10 y p20. Las interfases de estos dominios contienen residuos de aspartato (D) que son sitios de corte. Estos sitios son escindidos por caspasas activas y permiten la formación, a partir de dos moléculas de procaspasa 3, de una estructura tetramérica, de heterodímeros de p10-p20, que contiene dos sitios activos de corte. Las estrellas representan los sitios catalíticos.*

2) Inducción por proximidad, tal como ocurre con la caspasa 8 en la vía extrínseca, cuando existe una unión de los ligandos con los receptores de muerte, se forman complejos que reclutan varias moléculas de procaspasa 8 aumentando la cantidad de zimógeno que cuenta con una baja actividad proteolítica intrínseca pero que gracias a la

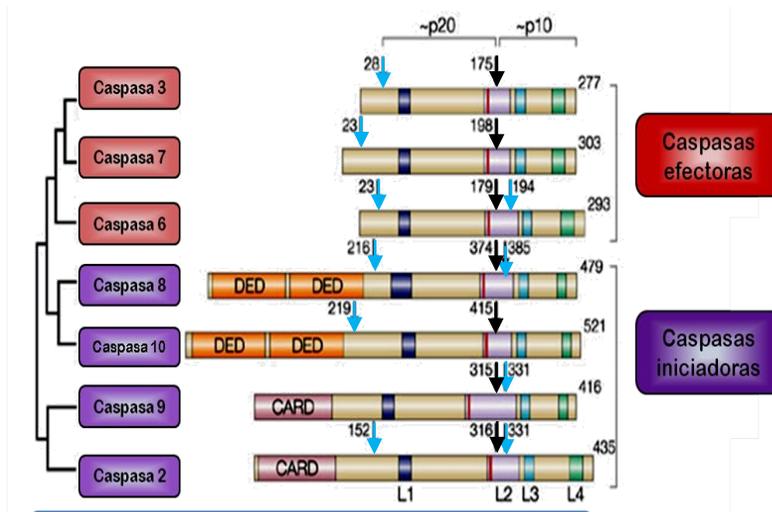


Figura 1.4. Caspasas efectoras y caspasas iniciadoras. La posición del sitio de corte que activa a la proenzima está marcada con una flecha negra. Otros sitios de corte (marcados con una flecha azul) podrían actuar como moduladores de la actividad de las caspasas a través de la acción de proteínas inhibidoras. Modificado de Ref 32

alta concentración de procaspasa es suficiente para lograr el corte y la activación de moléculas adyacentes.<sup>28</sup> La activación de la procaspasa 8 ocurre después de la oligomerización de esta en el complejo inductor señalizador de muerte o DISC (por sus siglas en inglés). La procaspasa 10 también es activada en el complejo inductor señalizador de muerte formando un heterotetrámero activo.<sup>32</sup>

3) Asociación con una unidad reguladora, por ejemplo la procaspasa 9, cuyo requerimiento clave para su activación es la unión con el cofactor APAF-1 y el citocromo c, formando el apoptosoma.<sup>28,29</sup>

Las caspasas, que eran originalmente asociadas solo a los procesos apoptóticos, participan en varias funciones en los linfocitos, incluyendo la activación, proliferación y sobrevivencia de estas células.<sup>32,34</sup>

## 1.9 Vías de inducción de apoptosis

### 1.9.1 Vía extrínseca o del receptor

La creciente subfamilia de receptores de muerte es parte de la superfamilia del receptor de TNF/NGF, caracterizada por una secuencia de dos o cinco repeticiones extracelulares ricas en cisteína dentro de su estructura. Los receptores de muerte contienen un DD intracelular, que es esencial para la transducción de señales apoptóticas. Seis miembros de la subfamilia de receptores de muerte han sido

caracterizados, estos son: FasL(APO-1/Fas), TNF-R1 (CD120a), DR3 (APO-3, LARD, TRAMP, WSL1), TRAIL-R1 (APO-2/DR4), TRAIL-R2 (DR5, KILLER, TRICK2) y DR6.<sup>35</sup> Estos receptores de muerte son activados por sus ligandos naturales, que han coevolucionado como la familia de ligandos de muerte, la llamada familia del TNF. Exceptuando a la linfotoxina alfa ( $LT\alpha$ ), los ligandos de muerte son proteínas transmembranales de tipo II, que pueden ser convertidas a una forma soluble por la acción de metaloproteinasas.<sup>35</sup>

El punto sobresaliente de la señalización vía el receptor de muerte, es la formación de un complejo multimolecular de proteínas desencadenado por la unión del receptor ya sea con su ligando de muerte o con un anticuerpo agonista. La estructura formada es el complejo señalizador inductor de muerte (DISC). El DISC de Fas es el complejo que ha sido mejor caracterizado y consiste en el Fas oligomerizado (generalmente trimerizado), el adaptador fosforilado de serina FADD o dominio de muerte asociado a Fas, procaspasa 8, CAP3 (molécula que contiene el DED N-terminal de la caspasa 8 y un dominio C-terminal aún no caracterizado) y procaspasa 10, de la cual no se ha elucidado bien su papel (Fig. 1.5). Las moléculas FADD, procaspasa 8 y procaspasa 10 también son reclutadas en los DISC de TRAIL-R1 y TRAIL-R2.<sup>35,36</sup>

La estequiometría de los componentes del DISC aun no es clara; sin embargo, se conocen las interacciones que se llevan a cabo en este. La oligomerización del CD95 crea una nueva conformación en el DD del receptor que por interacciones homofílicas se une con el adaptador de muerte FADD vía su DD. Además de su DD, FADD posee un DED N-terminal al cual se unen la procaspasa 8 y CAP3. La procaspasa 8 es escindida en el DISC lo que lleva a la formación de la caspasa 8 activa, que consiste en un heterotetrámero. El prodominio de la caspasa 8 se mantiene unido al DISC, mientras que la caspasa 8 activa se disocia y empieza la cascada de activación de caspasas “rio abajo” que constituye la fase de ejecución de la apoptosis.<sup>28,31,37</sup> Después de la interacción de un ligando agonista con el CD95, se han descrito dos vías de señalización apoptótica. Dependiendo la vía que se siga, las células se han dividido en dos tipos (Fig. 1.5).<sup>38</sup> En las células tipo I, la gran producción de caspasa 8 activa por el DISC, escinde directamente a las caspasas efectoras (caspasa 3, 6 ó 7) consumando la apoptosis en la célula.<sup>31,33,35,38</sup> En las células tipo II, solo una pequeña cantidad de caspasa 8 activa es producida en el DISC ya que este complejo es pobremente formado

por el poco reclutamiento de la proteína adaptadora FADD. En este caso, la señalización requiere de la participación de una vía de amplificación que involucra el corte de la proteína BID, perteneciente a la familia de Bcl-2 y subfamilia de BH3.<sup>31,35,37</sup>

La señalización tipo II puede ser bloqueada por la expresión de moléculas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2; mientras que la señalización tipo I no sufre cambios con la sobreexpresión de estas proteínas antiapoptóticas.<sup>32,38,32</sup>

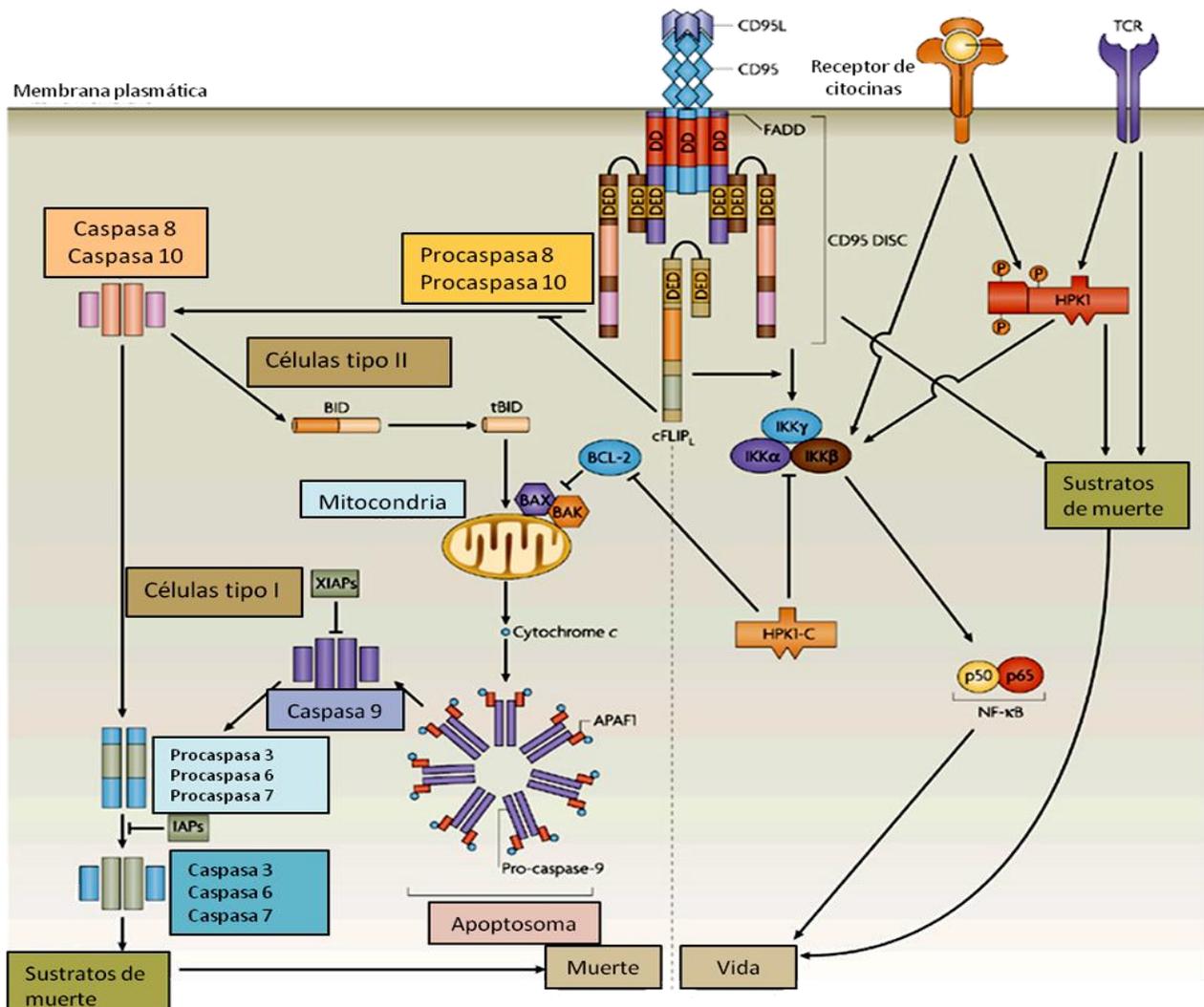


Figura 1.5. Vía del receptor o extrínseca de la apoptosis. La apoptosis mediada por esta vía puede ocurrir por dos vías dependiendo el tipo celular. Las células tipo I se caracterizan por altos niveles de formación del DISC y altas cantidades de caspasa 8 activa, la cual escinde caspasas efectoras como la 3,6 y 7. En las células de tipo II hay menor formación de DISC y menor activación de caspasa 8. En este caso, la señalización requiere amplificación por parte de la mitocondria. Esta amplificación involucra a la proteína BID, que es escindida por la caspasa 8 a tBID. Subsecuentemente, tBID provoca la liberación del citocromo c de la mitocondria, que resulta en la formación del apoptosoma, seguido por la activación de la pro caspasa 9, y el corte de caspasas efectoras 3, 6 y 7. Modificado de Ref. 30.

La sensibilidad de los linfocitos T a la muerte inducida por la vía del receptor puede ser regulada en diferentes niveles. Por ejemplo, durante la activación de los linfocitos T, el cambio de resistencia a sensibilidad a la apoptosis es asociado a una disminución de la expresión de la molécula c-FLIP, que es uno de los mayores reguladores de esta vía.<sup>35</sup> Al menos tres formas de c-FLIP son conocidas: c-FLIP<sub>L</sub>, c-FLIP<sub>S</sub>, c-FLIP<sub>r</sub>, correspondiendo a las variantes larga, corta y Raji respectivamente. Estas proteínas contienen sus DED en tándem y un dominio similar a caspasa; sin embargo, no cuentan con los residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de caspasa, sobre todo la cisteína del centro catalítico. La inhibición de la apoptosis por c-FLIP se da a través de su reclutamiento y corte en el DISC, ya que c-FLIP no es una proteasa activa, su escisión no produce ninguna respuesta bioquímica.<sup>31,32</sup> La expresión de c-FLIP puede ser regulada por múltiples vías, como las proteínas cinasas activadas por mitógeno, la cinasa del IP<sub>3</sub> o el NF-κB. Sin embargo, la contribución de cada una de esas vías no está bien definida y podría ser dependiente del tipo celular.<sup>31</sup>

### 1.9.2 Vía intrínseca o de la mitocondria

En la vía intrínseca o mitocondrial de la apoptosis, la cascada bioquímica de activación de caspasas puede ser disparada por varios estímulos, incluyendo la estimulación del TCR, irradiación UV, daño al DNA, estrés del retículo endoplásmico y ausencia de citocinas (Fig. 1.6).<sup>28</sup>

La mitocondria provee la energía que la célula necesita, pero tiene efectos catastróficos para la célula si ocurre una pérdida en su integridad.<sup>28</sup> Esta vía depende crucialmente de la permeabilización de la membrana externa mitocondrial en la que participa una familia de proteínas llamada Bcl-2, a nivel estructural esta familia está dividida en tres subgrupos:<sup>28,31</sup>

El primero muestra actividades anti-apoptóticas y comparte los dominios de homología de BH1-BH4; ciertos miembros como Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> se encuentran insertados en la membrana externa y al parecer ayudan a mantener la integridad mitocondrial permitiendo la exportación de iones de H<sup>+</sup> desde el espacio intramitocondrial.<sup>31,32,39</sup>

El segundo grupo con sus miembros Bax y Bak es proapoptótico y está caracterizado por tres dominios BH. Las proteínas de “solo-BH3” constituyen el tercer grupo de la familia, contienen un único dominio BH3, que es una secuencia de 9 aminoácidos y muestran propiedades proapoptóticas, se encuentran en el citoplasma hasta que son activadas, y se unen a Bcl-2, o a Bcl-X<sub>L</sub> inhibiendo sus funciones antiapoptóticas; Bim, Bad y Noxa son unos ejemplos.<sup>35,39</sup> La mitocondria contiene un potente coctel de proteínas proapoptóticas, por lo que la alteración de la membrana externa permite la salida de dos mediadores críticos de la apoptosis. El primero de estos es el citocromo c, que se une a Apaf-1 y recluta la procaspasa 9, formando el apoptosoma. En la presencia de dATP, esto resulta en un cambio conformacional de la procaspasa 9 convirtiéndola a su forma activa. El segundo factor mitocondrial descrito es Smac/DIABLO que inactiva a la IAP (proteína inhibidora de la apoptosis), lo que al final provocará la activación de caspasas efectoras.<sup>25,32</sup>

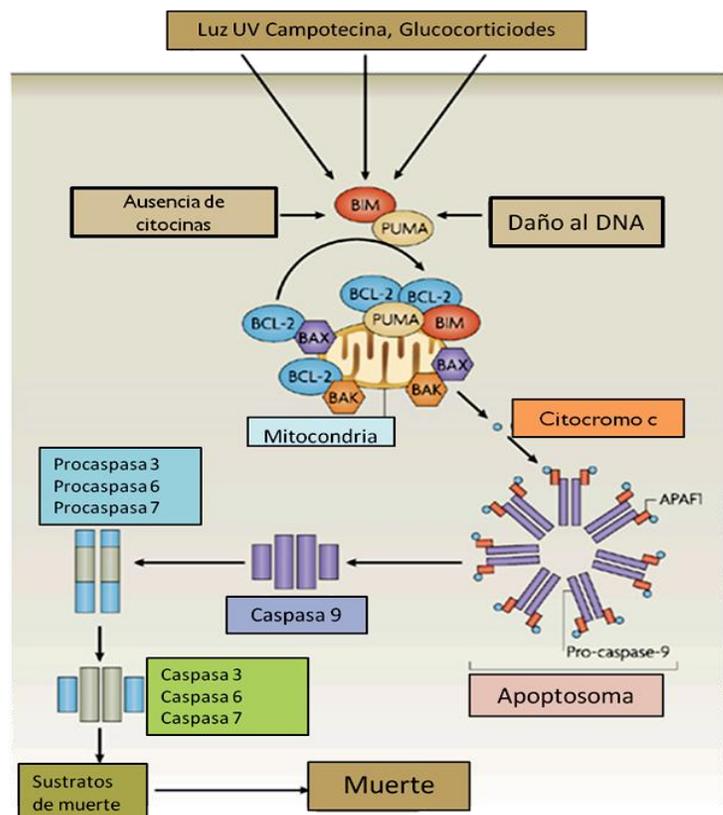


Figura 1.6. Vía intrínseca o mitocondrial de la apoptosis. Bax y Bak se encuentran secuestradas en un estado inactivo en la membrana mitocondrial externa por la unión a miembros de la familia antiapoptótica de Bcl-2. Después de ciertos estímulos, proteínas de la familia de solo-BH3 como BIM, son activadas, provocando un desequilibrio entre proteínas anti- y proapoptóticas, permitiendo la salida del citocromo c de la mitocondria. Modificado de Ref. 30.

### 1.10 Linfocitos T CD8+

Los linfocitos T CD8+ ó linfocitos T citotóxicos son células del sistema inmunitario con capacidad de reconocer y eliminar células que muestran péptidos no propios asociados a las moléculas de clase I codificadas por el MHC. En el organismo, todas las células nucleadas presentan péptidos endógenos propios asociados a moléculas del MHC de

clase I. Cuando la célula es infectada por patógenos intracelulares o presenta mutaciones en su genoma, sintetiza proteínas producidas por estos patógenos o por los genes propios alterados. Los péptidos derivados de estas proteínas no propias desplazan a los péptidos provenientes de las proteínas propias en su asociación a las moléculas de Clase I.<sup>15</sup>

Para el reconocimiento de los péptidos no propios, los linfocitos T citotóxicos expresan en su superficie el TCR y la molécula CD8, entre otros. Cada linfocito T CD8+ expresa un distinto TCR, como consecuencia de la combinación azarosa de distintos segmentos variables y constantes que codifican cada una de las dos cadenas que forman el TCR.<sup>15</sup> Posteriormente los linfocitos T CD8+ inician un proceso de proliferación y diferenciación (activación); en éste, los linfocitos T CD8+ van modificando sus moléculas de superficie (fenotipo), reprogramando su expresión génica, así como adquiriendo la maquinaria citocida que les permitirá destruir específicamente a las células que indujeron su activación.<sup>15,33</sup>

## **1.11 Activación y homeostasis de linfocitos T CD8+**

### *1.11.1 Activación de linfocitos T*

La activación de los linfocitos T CD8+ naïve, precisa del reconocimiento del antígeno y de segundas señales para ser estimulados, proliferar y diferenciarse a linfocitos T CD8+ efectores. Para su activación, los linfocitos T CD8+ vírgenes deben reconocer los antígenos peptídicos asociados a moléculas de MHC de clase I en la CPA y también establecer contacto con moléculas coestimuladoras en la superficie de la CPA o recibir señales proporcionadas por los linfocitos T cooperadores (T CD4+). Para iniciar la activación de los linfocitos T CD8+, el antígeno debe acceder a la vía de presentación de antígeno por moléculas del MHC de clase I en las células dendríticas (DC). Éstas tienen la capacidad de captar e ingerir células, infectadas por virus o células tumorales, en apoptosis y de presentar los antígenos víricos o tumorales a los linfocitos T CD8+ naïve. En la vía de presentación de antígeno por el MHC de clase I, los antígenos ingeridos son transportados desde vesículas hasta el citosol aunque la mayor parte de las proteínas ingeridas entra en la vía de presentación de antígeno por moléculas del MHC de clase II. La permisividad para el tráfico de proteínas desde las vesículas endosómicas hasta el citosol es exclusiva de las DC, este proceso se denomina

presentación cruzada, para indicar que las DC pueden presentar antígenos de otra célula (la célula infectada por el virus o la célula tumoral) y activar a los linfocitos T CD8+ específicos para estos antígenos.<sup>17</sup>

La activación completa de los linfocitos T CD8+ naïve y su diferenciación en células T CD8+ efectoras funcionales requiere de la participación de los linfocitos T CD4+ cooperadores, esta necesidad puede variar según el tipo de exposición antigénica. Los linfocitos T cooperadores pueden favorecer la activación de los linfocitos T CD8+ mediante dos mecanismos principales: pueden secretar citocinas que estimulan la diferenciación de los linfocitos T CD8+, o expresar un ligando (CD40L) que activa a las CPA y las hace más eficientes en la estimulación de la diferenciación de los linfocitos T CD8+. Los efectos de los linfocitos T cooperadores parecen producirse sobre todo en la diferenciación de los linfocitos T CD8+ naïve a linfocitos de memoria y parecen tener menos efectos sobre la expansión clonal inicial y el desarrollo temprano de los linfocitos T CD8+ efectores.<sup>17</sup>

### 1.11.2 Mecanismos efectores de los linfocitos T CD8+ citotóxicos

Una vez que el linfocito T CD8+ efector ha sido activado y ha adquirido su maquinaria citocida, reconoce a la célula que estimuló su activación y se une fuertemente a dicha célula para formar un conjugado célula-célula. En esta interacción, el linfocito T CD8+ induce en la célula blanco un “golpe mortal” en cuestión de minutos. Tras lo cual la célula T CD8+ se disocia de la célula blanco, que muere subsecuentemente por apoptosis, mientras que el linfocito T CD8+ puede seguir destruyendo células adicionales (Fig. 1.7).<sup>15,20</sup>

Las vías que conducen a la muerte de la célula blanco son; la vía dependiente de

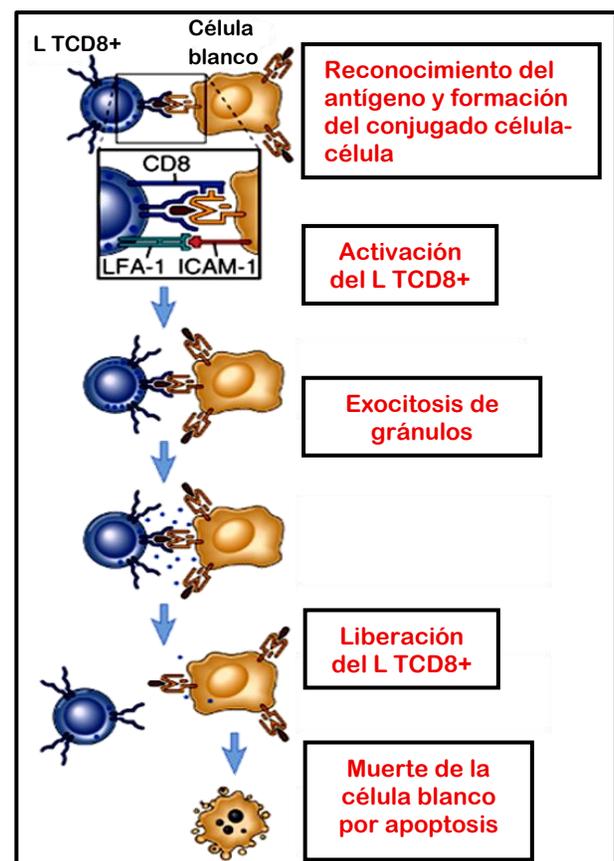


Figura 1.7. Mecanismo citocida de linfocitos T CD8+ efectoras dependiente de la vía de gránulos. L TCD8+. Linfocito T CD8+. Adaptado de Ref. 17.

gránulos (granzima y perforina) y la vía dependiente del receptor (expresión de FasL).<sup>15</sup>

### 1.11.3 Homeostasis de linfocitos T

En la respuesta inmune adaptativa, la presencia del antígeno asociado al MHC de clase I es necesaria para los linfocitos T naïve o de memoria, que proliferan y cumplen su función efectora. La activación y sobrevivencia de los linfocitos T está influenciada por las señales que reciben estas células a través del TCR, las moléculas de coestimulación, en el caso de CD28, moléculas de adhesión, así como de las citocinas IL-2, IL-3 e IL-15. La fase de expansión es seguida por una fase de contracción en la cual los números de las células T descienden hasta llegar a niveles normales.<sup>17,32</sup>

Durante la proliferación la mayoría de los linfocitos T se vuelven susceptibles a la apoptosis, esta sensibilización es producida por las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis e influenciada por la citocina IL-2. El mecanismo molecular por el cual se lleva a cabo esta sensibilización incluye la alteración en la expresión de genes que codifican proteínas como las de la familia de Bcl-2, la proteína cinasa hematopoyética 1 (HPK1), miembros de c-FLIP y FasL.<sup>32</sup>

La regulación de la apoptosis en los linfocitos T es crítica para la homeostasis y la correcta función del sistema inmune.<sup>25,37</sup> Dos conceptos han sido definidos para referirse a los mecanismos de inducción de muerte en linfocitos T durante el cese de la respuesta inmune, la muerte inducida por activación o AICD y la muerte autónoma de células T activadas o ACAD.<sup>25,31,37,40</sup> El sistema Fas/FasL es considerado como uno de los mecanismos más importantes en la regulación de la homeostasis de los linfocitos.<sup>31</sup> Generalmente las vía extrínseca e intrínseca concluyen en la activación de caspasas, aunque recientemente algunas proteasas diferentes a las caspasas (catepsinas liberadas por los lisosomas) han sido involucradas como complemento a estas dos vías, contribuyendo también en la AICD (vía extrínseca) y la ACAD (vía intrínseca).<sup>31</sup>

### 1.12 AICD

La reestimulación del TCR de linfocitos T previamente activados y expandidos en ausencia de la apropiada coestimulación lleva a la inducción de muerte celular por un proceso llamado AICD o muerte celular inducida por activación.<sup>31,40</sup>

### 1.12.1 Factores involucrados en la AICD

En los linfocitos T, varios factores controlan la sensibilidad a la apoptosis por AICD. Los principales son los siguientes.<sup>31,37,40</sup>

#### a) *Receptores de muerte*

La AICD involucra la estimulación a través de receptores correspondientes a la superfamilia de receptores del TNF como son Fas y TNFR1.<sup>28,31,33,32,40</sup> Entre los receptores de muerte, Fas (APO-1/CD95) es el más estudiado y probablemente el más importante en la AICD.<sup>36</sup>

La unión del TCR resulta en la expresión de FasL que sumado a la expresión de Fas induce la muerte celular ya sea en la misma célula que lo expresa (suicidio) o en células adyacentes (fratricidio). Durante este proceso, el FasL expresado en membrana es el que realiza el mayor aporte a la activación de la apoptosis en comparación con el FasL soluble.<sup>32,37</sup> La sensibilidad a la muerte por Fas está regulada principalmente por el DISC, que contiene a FADD, la caspasa 8 y la caspasa 10, mientras que FasL es regulado predominantemente a nivel transcripcional.<sup>25</sup> El rol de TNF-R1 en la apoptosis no está completamente entendido pero parece estar implicado en la fase tardía de la AICD.<sup>25,40</sup>

#### b) *Citocinas*

La proliferación y resistencia a la muerte celular de linfocitos T reestimulados vía su TCR en la fase primaria de una respuesta inmune, pueden ser reguladas por varias citocinas que actúan similar a la IL-2, y son la IL-4, IL-7, IL-15 e IL-21.<sup>31,37,40</sup> La IL-2 actúa como el principal factor de crecimiento en células T, pero induce en ellas la sensibilidad a la AICD tanto por la vía extrínseca como por la vía intrínseca, aunque el mecanismo molecular por el que se lleva a cabo no es conocido; en cualquier caso incluye alteración de la expresión de genes de las proteínas de Bcl-2, c-FLIP y HPK1.<sup>25,40</sup>

#### c) *NF-κB*

La vía del NF-κB es una de las cascadas de transducción de señales más destacadas relacionada con la regulación de la función y el destino de los linfocitos. Los factores de transcripción del NF-κB se encuentran inactivos en el citoplasma gracias a interacciones con la proteína IκB. Después de la estimulación del TCR, las IκB son fosforiladas por el complejo de la cinasa de IκB y después degradadas. Los dímeros de

NF- $\kappa$ B son translocados al núcleo y activan los genes regulados por NF- $\kappa$ B. Recientemente se sugirió que al NF- $\kappa$ B como regulador del inicio de la AICD en linfocitos T.<sup>20</sup> Las proteínas activadas por NF- $\kappa$ B en las células T proveen importantes señales para la sobrevivencia celular así como para su proliferación. Un ejemplo es el aumento en la expresión del gen de *BCL-X<sub>L</sub>* que puede prevenir la muerte celular de células T reestimuladas.<sup>31,32</sup> Se considera que la inhibición del NF- $\kappa$ B tiene importante función proapoptótica incrementando las especies reactivas de oxígeno (ROS) que suprimen la expresión de Bcl-2 y lleva al linfocito T a una muerte por la vía intrínseca.<sup>31,32,40</sup>

#### d) *HPK1/HPK1-C*

HPK1 es un miembro de las cinasas germinales y que se expresa predominantemente en células hematopoyéticas y transitoriamente en linfocitos T activados por el TCR. Se ha demostrado que los linfocitos T resistentes a AICD contienen a HPK1 en su forma completa, mientras que en las células sensibles a AICD la HPK1 se encuentra escindida después de la activación y expansión. La forma completa de la cinasa apoya a la activación del NF- $\kappa$ B mientras que la forma trunca lo suprime.<sup>41</sup>

### 1.13 ACAD

La ACAD o muerte celular autónoma de células activadas es un mecanismo de muerte en linfocitos T, que involucra mecanismos apoptóticos independientes de la reestimulación del TCR. Esta muerte ocurre también en la ausencia de señales apropiadas de sobrevivencia por lo que es conocida como muerte por supresión de citocinas.<sup>37,40</sup>

En este tipo de muerte está implicada la vía intrínseca o mitocondrial de la apoptosis donde es de suma importancia la relación entre proteínas anti y proapoptóticas encontradas en la superficie mitocondrial. La proteína proapoptótica de la familia de Bcl-2, Bim, es esencial para la ACAD, que junto con otro miembro de esta familia PUMA median la muerte en linfocitos T. El aumento en la expresión de ambas proteínas después de la eliminación de las citocinas resulta en la inducción de la apoptosis.<sup>37,40</sup> En la membrana mitocondrial, Bim y PUMA pueden unirse a Bcl-2 o Bcl-X<sub>L</sub>, que inhiben a Bax o Bak, la liberación de estos últimos resulta en la liberación de citocromo c, y en la inducción de la muerte en los linfocitos T por la subsecuente cascada de activación

de caspasas que inicia con la caspasa 9.<sup>28</sup> Durante la fase de expansión, las células T pueden cambiar de un estado de alta expresión de Bcl-X<sub>L</sub> a uno de baja expresión, activando la vía apoptótica intrínseca. Mientras que la expresión de Bcl-2 y de Bcl-X<sub>L</sub> están controladas por la activación del NF-κB, dependiente de la estimulación del TCR; el aumento en la expresión de Bim depende de las actividades de p38 y JNK. Bcl-2 puede prevenir la apoptosis dependiente del TCR, bloqueando la señalización intracelular dependiente de calcio.<sup>35</sup> Otro mecanismo para este tipo de muerte celular está relacionado con la generación de ROS, que reducen la expresión de las proteínas Bcl-2.<sup>17</sup>

Tabla 2. Comparación entre AICD y ACAD. *Adaptado de 37*

CARACTERÍSTICA	AICD	ACAD
Llevada a cabo por receptores	Sí	No
Protección por Bcl-2	No	Sí
Citocinas involucradas	IL-2 sensibiliza Otras citocinas no protegen de la muerte celular	La ausencia de citocinas sensibiliza La familia de IL-2 protege
Tipo de estímulo que la favorece	Altas dosis de antígenos o una estimulación constante	Exposición a un antígeno no propio
Dependencia de caspasas	Sí, caspasa 8 necesaria.	Parcialmente, puede ser llevado a cabo por factores proapoptóticos encontrados en la mitocondria a parte de caspasa 9
Función en el organismo	Control parcial de los linfocitos T autoreactivos Poca participación en la eliminación de los linfocitos T al final de una respuesta inmune Control de linfocitos T doble negativos	Control parcial de linfocitos T autoreactivos Mayor participación en la eliminación de linfocitos T al final de una respuesta inmune

### 1.14 Muerte de linfocitos T independiente de caspasas

A pesar del rol de las caspasas como mediadores de la AICD y la ACAD, otras proteasas diferentes a las caspasas también han sido implicadas en la muerte de células T.<sup>42</sup>

Los lisosomas asimismo participan en la ejecución de la muerte celular. Proteasas lisosómicas, como la cathepsina B, son activadas por un procesamiento proteolítico

después de un estrés lisosomal y son liberadas al citosol.<sup>42</sup> La ejecución de la muerte de la célula por catepsinas puede ser activada por estimulación de receptores de muerte, y reportes recientes han demostrado un papel de la catepsina B en la muerte de los linfocitos T.<sup>42,43</sup>

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Muerte de linfocitos T efectores mediada por tumor

Las células tumorales no solo pueden evadir su destrucción por parte del sistema inmunitario, también propician la muerte de los TIL para suprimir activamente la respuesta inmune.<sup>16,44</sup>

La muerte excesiva de linfocitos T en el sitio del tumor representa un mecanismo de evasión del sistema inmune por parte del tumor (Fig. 2.1).<sup>45</sup> Experimentos tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado que la coincubación de células tumorales con linfocitos T producen la muerte de estos.<sup>45</sup>

Se han propuesto tres hipótesis principales para explicar la apoptosis de los linfocitos

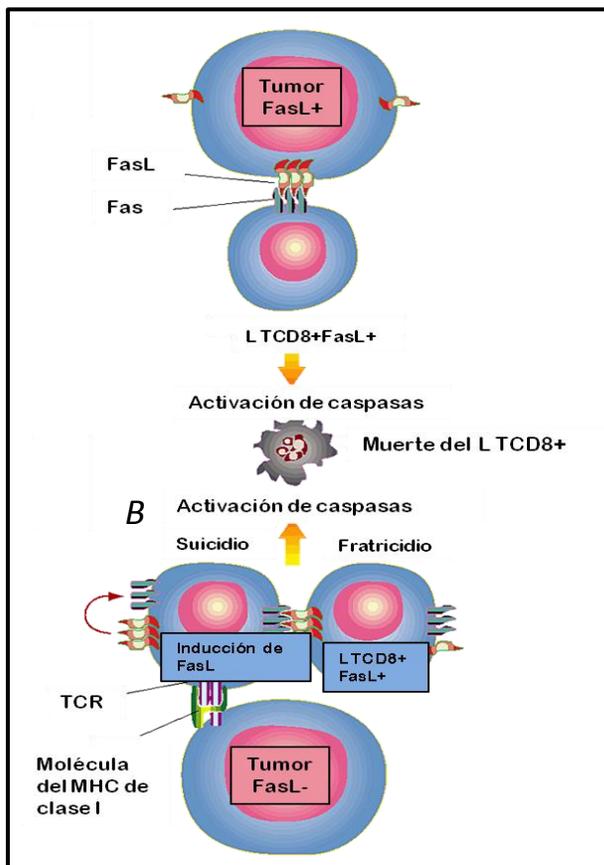


Figura 2.1. Muerte de linfocitos T CD8+ mediada por tumor. (A) Contraataque por células tumorales que expresan FasL. (B) Muerte autócrina o parácrina por linfocitos T CD8+FasL+. L TCD8+. Linfocito T CD8+. Modificado de Ref.45.

por las células tumorales. La primera denominada contraataque tumoral propone que la apoptosis de los TIL resulta de un contacto directo entre receptores de muerte expresados en los linfocitos con sus respectivos ligandos de muerte presentes en la superficie de las células tumorales (Fig. 2.1A).<sup>16,45,46</sup>

La segunda hipótesis propone que en los linfocitos T se incrementa la expresión de receptores de muerte y sus correspondientes ligandos, lo que provoca una muerte autócrina o parácrina en ellos (Fig. 2.1B). Este fenómeno se ha observado en la activación crónica de las células T en el proceso de AICD.<sup>45,44,47</sup> La

tercera hipótesis plantea que los linfocitos T en el microambiente inmunosupresor creado por el tumor, se activa la vía mitocondrial de la apoptosis.<sup>48</sup>

El sistema Fas/FasL es uno de los

principales mecanismos utilizados por los linfocitos T CD8+ efectores para eliminar a las células tumorales que expresan Fas, a partir de este hecho se ha propuesto que algunos tumores usan esta misma vía para contraatacar a las células T CD8+.<sup>26,45,49</sup> En este sentido, varios grupos han demostrado la expresión de FasL en células tumorales de de cánceres humanos de distintos orígenes, tales como: cáncer de colon, cabeza y cuello, ovario, melanoma, carcinoma hepatocelular, astrocitoma, carcinoma esofágico, glioblastoma y carcinoma renal.<sup>45</sup>

La subpoblación efectora de los linfocitos T CD8+ tiene mayor susceptibilidad a la muerte mediada por Fas.<sup>45,50</sup> En varios reportes se ha observado una expresión incrementada de Fas en la superficie de los linfocitos T CD8+, considerándolos predispuestos para la apoptosis.<sup>45</sup>

Otras moléculas diferentes a Fas pero de la misma familia de los receptores de muerte también podrían participar en la eliminación de los linfocitos por parte del tumor. La molécula B7-H1 o PD-L1, miembro de la familia de proteínas de coinhibición de B7 y ligando de la molécula PD-1, inhibe la proliferación de las células T.<sup>51</sup> Se ha demostrado la apoptosis de los linfocitos T que expresan PD-1 cuando se coincuban con células tumorales que PD-L1+.<sup>52</sup>

Como ya se mencionó, el microambiente tumoral tiene un papel importante en la inducción de la apoptosis en los linfocitos T. Las células tumorales pueden secretar citocinas inmunosupresoras u otros factores solubles que alteran la relación existente entre las proteínas anti- y proapoptóticas de la familia de Bcl-2 que se encuentran en la membrana mitocondrial. El aumento de las primeras y disminución de las segundas, provoca la muerte de los linfocitos T. Es posible que estos factores solubles secretados por el tumor alteren moléculas que inhiban factores de transcripción, como el NF- $\kappa$ B, cuyos productos son necesarios para la proliferación celular.<sup>53,54</sup>

La interacción mediada por FasL, expresado en el tumor o en los propios linfocitos o la muerte mediada por factores solubles que activan la vía mitocondrial genera una serie de señales que culmina con la muerte de los linfocitos T CD8+ Fas+.

El bloqueo de los eventos más tempranos que suceden en la apoptosis de los linfocitos T podría ser importante para rescatar de la muerte a los linfocitos T CD8+.

## 2.2 AICD en cáncer

La apoptosis de los linfocitos T infiltrantes de tumor ha sido reportada en diversos tipos de cánceres. La masa tumoral no solo genera un ambiente inmunosupresor, también es una fuente de enormes cantidades de antígeno que estimulan crónicamente a los linfocitos T que lo infiltran. Dicha estimulación constante dentro del microambiente tumoral, resultará en una expansión y muerte *in situ* de los linfocitos T. En este proceso puede participar la AICD dependiente de la vía extrínseca.<sup>27</sup>

Estudios en linfocitos T provenientes de sangre periférica de pacientes con melanoma, cáncer de mama o cáncer de cabeza y cuello, han demostrado que los linfocitos T CD8+ son la población más sensible a la apoptosis.<sup>26-27</sup>

Reportes en melanoma y cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, indican que las células tumorales son las responsables de la muerte de los linfocitos T CD8+ antígeno específicos. En este proceso participa la interacción del TCR en los linfocitos T con las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I en las células malignas. Lo anterior sugiere que la muerte celular es consecuencia del estímulo crónico de antígenos tumorales y por la constante activación de los linfocitos T CD8+. El porcentaje de muerte de los linfocitos T se asoció directamente con la cantidad de células tumorales. Además estos estudios demostraron que la población de linfocitos T CD8+ antígeno tumoral específica incrementa la expresión de Fas en su superficie. Lo anterior hace a esta población propensa a entrar en apoptosis por AICD, lo que se demostró al inhibir el proceso de muerte por la adición del anticuerpo bloqueador antiFas. Contrario a la hipótesis de que las células tumorales causaban la muerte de los linfocitos T antitumorales, se encontró que la expresión de FasL en los linfocitos activados (Fas+) era la causante de la muerte de estas mismas células y no por acción de las células tumorales.<sup>26</sup>

La apoptosis mediada por Fas no solo afecta a los TIL, otros estudios realizados en linfocitos de pacientes con cáncer de cabeza y cuello, melanoma y cáncer oral,<sup>55,56</sup> demostraron que gran parte de la apoptosis espontánea en linfocitos T CD8+ de sangre periférica se debe a una elevada expresión de Fas en la superficie de los linfocitos T.<sup>49,57</sup> Así mismo, estas células presentan una mayor actividad de caspasas y una expresión baja de la cadena  $\zeta$  del TCR, en relación con los linfocitos T de sujetos sanos.<sup>58</sup>

El fenómeno de la apoptosis inducida por el tumor en los linfocitos T, y sobre todo en la población T CD8+, aun no es comprendido totalmente. Se ha reportado que esta muerte no es dependiente únicamente de Fas, ya que el tratamiento con el anticuerpo antiFas no revierte totalmente el porcentaje de linfocitos T CD8+ apoptóticos. Tal vez en este fenómeno, esté participando la vía mitocondrial, además de la vía del receptor.<sup>26, 44,58</sup>

En los pacientes con cáncer, las funciones antitumorales de los linfocitos T se encuentran comprometidas. Estudios recientes *in vivo* o *in vitro* sugieren que células de carcinoma humano de varios orígenes pueden activar la vía intrínseca de la apoptosis en los linfocitos que interactúan con el tumor.<sup>26,58,59</sup>

En el carcinoma escamoso de cabeza y cuello (SCCHN) se ha demostrado que la mitocondria está involucrada en las cascadas apoptóticas inducidas en los linfocitos T tanto por la unión con FasL,<sup>44</sup> o por la interacción con células tumorales.<sup>58,59</sup>

En pacientes con SCCHN, carcinoma oral y melanoma<sup>46,49</sup> la apoptosis de los linfocitos T se presenta tanto en los linfocitos que infiltran al tumor como los que se encuentran en la circulación periférica.<sup>56</sup> La población T CD8+ es la más susceptible a la apoptosis; en particular, los linfocitos con fenotipo efector y específicos del tumor. Se ha demostrado también que la mayoría de los linfocitos T CD8+ sensibilizados a la apoptosis expresan Fas, por lo que se considera que la vía Fas/FasL es la responsable de la disminución de los linfocitos. Sin embargo, el cocultivo de linfocitos T activados y células tumorales de SCCHN, demostró que no solo las células T Fas+ entraban en el proceso de apoptosis, lo que sugirió la participación de la vía mitocondrial involucrando a moléculas como Bax, Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> en la regulación del proceso apoptótico en los linfocitos T CD8+.<sup>58,59</sup> Estas dos vías apoptóticas (receptor y mitocondrial) pueden ser bloqueadas por diferentes inhibidores ya que se ha observado que mientras que la apoptosis mediada por Fas no se afecta en la presencia de inhibidores específicos para la vía mitocondrial (inhibidor de caspasa 9 o la ciclosporina A), la apoptosis inducida por el tumor es parcialmente inhibida en la presencia de estos compuestos, sugiriendo que además de la vía apoptótica mediada por Fas, están involucradas otras reacciones dependientes de la mitocondria y que contribuyen a la apoptosis de linfocitos T CD8+ asociados al tumor.<sup>59,60</sup>

### 2.3 AICD en cáncer de pulmón

Existen pocos estudios en cáncer de pulmón en relación a la muerte de los linfocitos T mediada por el tumor, sean TIL o linfocitos de sangre periférica de pacientes.

En los linfocitos T CD8+ procedentes de derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar, se ha reportado un incremento en el porcentaje de las células de la subpoblación de memoria y una considerable disminución en el porcentaje de las células de la subpoblación efectora. Este fenómeno se ha atribuido a la presencia de las células tumorales y a que éstas han desarrollado mecanismos para suprimir la respuesta de los linfocitos T CD8+.<sup>50</sup> Como posibles explicaciones para este fenómeno se menciona: 1) La presencia de factores quimiotácticos para la subpoblación de memoria y no para la subpoblación efectora. 2) Una expansión de las células T CD8+ de memoria como consecuencia de la inducción de la respuesta inmune antitumoral y 3) la muerte celular selectiva de la subpoblación efectora.<sup>50</sup> Se ha reportado que las células T CD8+ provenientes de derrame pleural con fenotipo de memoria, pueden estar asociadas con una estimulación antigénica crónica que cuando llega al estadio efector las haría más susceptibles a la AICD.<sup>49</sup>

En células T CD8+ provenientes de derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar se ha encontrado un incremento en la proporción de células T que expresan el receptor Fas,<sup>50</sup> así que se pensó que las células tumorales tal vez FasL positivas podrían ser las responsables por la reducción de las células efectoras T CD8+.<sup>61</sup> Sin embargo, en un estudio reciente se demostró que líneas celulares de cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) así como células tumorales procedentes de pacientes con adenocarcinoma pulmonar no expresan FasL;<sup>51,62</sup> mientras que otro estudio demostró que células inmunitarias como linfocitos T y macrófagos, son las células que expresan FasL.<sup>62</sup>

Un estudio preliminar realizado por nuestro grupo de trabajo demostró la susceptibilidad a la AICD en los linfocitos T CD8+ provenientes de derrame pleural y sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma pulmonar.<sup>14</sup> En dicho estudio, los linfocitos T CD4+ y T CD8+, se incubaron en presencia de anticuerpo antiFas o del anticuerpo antiCD3, posteriormente el porcentaje de apoptosis fue cuantificado por medio del ensayo de unión a anexina V. Se observó que el anticuerpo antiFas no incrementó la apoptosis de los linfocitos T; sin embargo, el anticuerpo antiCD3 indujo un

mayor porcentaje de apoptosis en las células T CD8+ a diferencia de las células T CD4+. Probablemente la AICD esté involucrada en la tolerancia inmunitaria hacia las células de cáncer de pulmón.

Recientemente se ha sugerido la hipótesis de que la muerte celular inducida por activación es la responsable de la apoptosis de los TIL en pacientes con diferentes tipos de cáncer.<sup>27,47</sup> Las células T crónicamente estimuladas entran en AICD mediada principalmente por interacciones Fas/FasL, y se ha reportado que los linfocitos T CD8+, provenientes de derrame pleural, con un fenotipo de memoria pueden estar relacionados con una estimulación antigénica crónica, que puede hacer a esta población susceptible a la muerte por AICD.<sup>14,51</sup> Se puede considerar que los linfocitos T CD8+ del derrame pleural están programados para entrar en apoptosis después de ser activados. Sin embargo, no se ha determinado qué vía de apoptosis participa en la muerte inducida por el anticuerpo antiCD3.

### III JUSTIFICACIÓN

---

A nivel mundial, el cáncer pulmonar es un problema de salud pública debido a su alta incidencia y la mayor tasa de mortalidad entre los diferentes tipos de cáncer. En México, el cáncer pulmonar se encuentra entre las tres principales causas de muerte por tumores malignos y el adenocarcinoma pulmonar es el tipo histológico más frecuente, contribuyendo con el 29-31% de los casos.

Estimular el sistema inmune que se encuentra abatido por el cáncer ha sido una meta buscada por oncólogos e inmunólogos desde hace tiempo. El rol de los TIL se ha tratado de comprender para incrementar la respuesta inmune antitumoral. Uno de los acercamientos inmunoterapéuticos que se ha utilizado es la estimulación *ex vivo* de los linfocitos T CD8+ reactivos para el tumor (transferencia adoptiva); sin embargo, este tratamiento no ha mostrado los resultados deseados. Lo anterior podría deberse a que después del encuentro con el tumor, la AICD podría estar participando en el decremento o eliminación de la respuesta inmune antitumoral por parte de los linfocitos T CD8+.

Inhibir selectivamente la activación de las caspasas que participan en los primeros pasos de la AICD en los linfocitos T CD8+ de pacientes con carcinoma pulmonar, podría elucidar un blanco potencial que ayudaría a un mejor acercamiento terapéutico que permita potenciar la respuesta inmune en contra de las células tumorales.

#### IV HIPÓTESIS

---

Los linfocitos T CD8+ provenientes de derrame pleural de pacientes con carcinoma pulmonar, al ser estimulados con anticuerpo antiCD3, entran en apoptosis, evento en el que pueden participar las vías del receptor o mitocondrial.

Si al bloquear la caspasa iniciadora de cada vía (caspasa 8 receptor o caspasa 9 mitocondria) hay una disminución en el porcentaje de linfocitos apoptóticos, esta caspasa será por la cual se inicia el proceso de apoptosis en los linfocitos T CD8+ activados.

## **V OBJETIVOS**

---

### **5.1 Objetivo general**

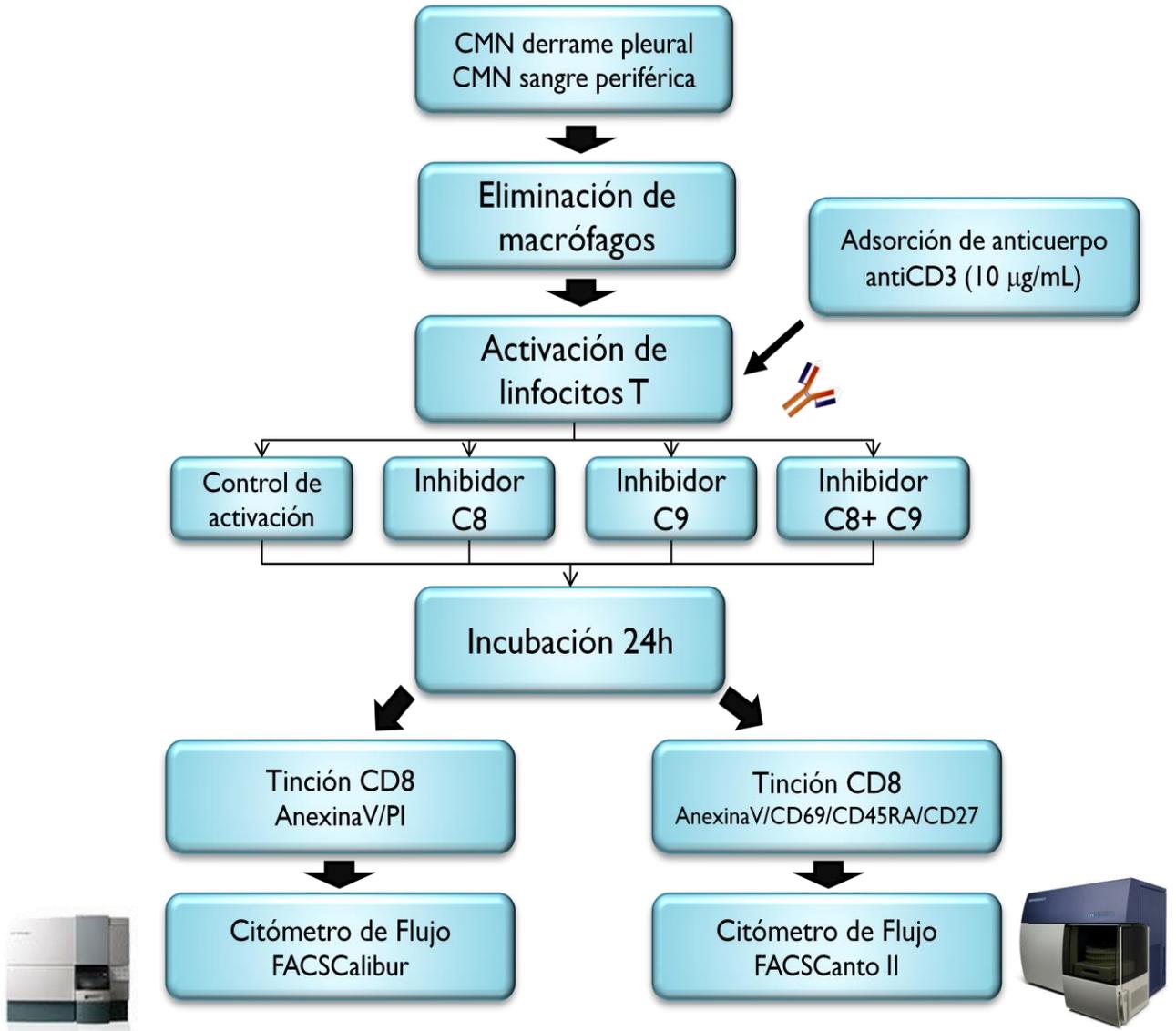
Determinar la participación de las caspasas iniciadoras 8 (vía del receptor) y 9 (vía mitocondrial) en el proceso apoptótico de los linfocitos T CD8+ provenientes de derrame pleural de pacientes con carcinoma pulmonar después de ser activados con el anticuerpo antiCD3.

### **5.2 Objetivos particulares**

- Cuantificar el porcentaje de apoptosis en linfocitos T CD8+ (total y subpoblaciones) provenientes de pacientes con carcinoma pulmonar
- Cuantificar el porcentaje de activación en linfocitos T CD8+ (total y subpoblaciones) provenientes de pacientes con carcinoma pulmonar
- Determinar las concentraciones óptimas de los inhibidores específicos de caspasa 8 y caspasa 9 en linfocitos T CD8+.
- Conocer el efecto de los inhibidores de manera individual o conjunta en linfocitos T CD8+, activados con el anticuerpo antiCD3, provenientes de pacientes con carcinoma pulmonar.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Esquema general de trabajo



## 6.2 Población estudiada

Se incluyeron 15 pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar en estadios IIIb y IV, sin tratamiento antitumoral previo. El rango de edad fue de 36 a 85 años. De los pacientes se obtuvo líquido pleural y sangre periférica previo conocimiento y aceptación de participación por medio de la carta de consentimiento informado.

## 6.3 Separación de células mononucleares

Las células mononucleares (CMN) provenientes de la sangre periférica fueron separados de sangre venosa heparinizada en un gradiente de Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, *Axis-Shield, Oslo, Noruega*) por medio de centrifugación a 1500 rpm por 30 min. El derrame pleural fue obtenido por toracocentesis por personal médico adscrito al hospital, el derrame se centrifugó a 2500 rpm por 15 min. El paquete celular resultante fue resuspendido en medio RPMI-1640. Las CMN del derrame pleural y las células tumorales fueron separadas por centrifugación a 1500 rpm por 30 min en un gradiente discontinuo de Ficoll-Hypaque. Las células tumorales y las CMN de derrame pleural fueron recolectadas de cada interfase y lavadas dos veces con medio RPMI-1640. El paquete celular restante fue empleado o bien, congelado en nitrógeno líquido hasta su uso.

## 6.4 Inhibidores de caspasas

- Inhibidores de caspasas (*Calbiochem, Darmstadt, Germany*)

Los inhibidores de caspasas se reconstituyeron en DMSO estéril y se agitaron mecánicamente hasta conseguir la completa disolución. Posteriormente fueron alicuotados y preservados a -20°C.

## 6.5 Citómetros

Se utilizaron los citómetros de flujo FACSCalibur (*Becton Dickinson, San Jose, CA*) con el programa CellQuest (*Becton Dickinson*) y FACSCanto II (*Becton Dickinson*) con el programa FACSDiva (*Becton Dickinson*). Los datos se analizaron en el programa Flow Jo versión 7.6.1.

## 6.6 Activación de los linfocitos T

Para realizar la activación de los linfocitos, las CMN de sangre periférica o líquido pleural se resuspendieron en medio RPMI y se colocaron 2 mL por pozo de la caja nunc de 24 pozos (*Nunclon, Roskilde, Dinamarca*). La placa se incubó por 90 min a 37°C, para adsorber a los macrófagos. La suspensión se recuperó con agitación mecánica suave y se realizó conteo celular en cámara de Neubauer con azul de tripano (*Sigma Chemical Co, St Louis, MO*) como colorante vital. La suspensión se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^6$  cel/mL.

Para la activación de los linfocitos T, el anticuerpo antiCD3 (*clona UCHT-1*) [ $10 \mu\text{g/mL}$ ], se adsorbió por 90 min en atmosfera húmeda con 5% de  $\text{CO}_2$  a 37°C, en una placa de 96 pozos (*Nunclon, Roskilde, Dinamarca*). Posteriormente se hicieron dos lavados con PBS (pH= 7.2), para retirar el exceso de anticuerpo de los pozos y se depositaron en estos 200  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular a  $1 \times 10^6$  cel/mL. Para determinar la vía de la apoptosis que participa, en algunos pozos, se adicionó el inhibidor de caspasa 8 [ $5 \mu\text{M}$ ], inhibidor de caspasa 9 [ $20 \mu\text{M}$ ] o la mezcla de los inhibidores. Los linfocitos bajo los distintos tratamientos fueron incubados por 24 h en atmosfera húmeda con 5% de  $\text{CO}_2$  a 37°C.

## 6.7 Determinación del porcentaje de linfocitos T CD8+ en apoptosis por marcaje con anexina V y yoduro de propidio

Esta técnica de detección de apoptosis está basada en que las células apoptóticas exponen el fosfolípido fosfatidilserina (PS), que pasa de la parte interna a la parte externa de la membrana celular.<sup>63</sup> La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y que tiene una alta afinidad por la PS, por lo que se unirá a las células apoptóticas.<sup>63</sup> La externalización de la PS precede la pérdida de la integridad de la membrana que acompaña a las últimas etapas de la muerte celular, ya sea apoptótica o necrótica, por lo tanto la tinción con anexina V es usada en conjunción con el yoduro de propidio (PI), permitiéndo identificar a las células viables (anexina V-/PI-) de las células en apoptosis temprana (anexina V+/PI-) y de las células en apoptosis tardía o necrosis (anexina V+/PI+).<sup>63,64</sup>

Después de la activación de los linfocitos por 24 h, se les adicionó 100  $\mu$ L de buffer de reacción PBS/BSA[1%]/Na<sub>3</sub>N[0.1%] y la suspensión celular se recolectó por medio de agitación mecánica muy suave en tubos de citometría.

A continuación, las células se tiñeron con 100  $\mu$ L de una disolución de buffer de reacción que contenía el anticuerpo monoclonal antiCD8-PECy5 (*clona HIT8a, Biolegend*). La suspensión se dejó incubar en agitación constante por 30 min a temperatura ambiente (TA). Transcurrida la incubación las células se lavaron y el botón celular se resuspendió en 100  $\mu$ L de HEPES conteniendo una mezcla de anexina V-FITC (*Biolegend*) a una concentración de 90 ng/mL y PI (*Sigma Aldrich Co, St. Louis, MO*) a una concentración de 20  $\mu$ g/mL. Las células fueron incubadas por 15 min a TA. Posteriormente se procedió a realizar la lectura en el citómetro de Flujo FACSCalibur.

### **6.8 Determinación del porcentaje de linfocitos T CD8+CD69+**

Para comprobar si los linfocitos T CD8+ se activaron después de la estimulación con anticuerpo antiCD3, se determinó el porcentaje de células que expresaban el marcador CD69, el cual es una proteína de la familia de las lectinas tipo C, y es el primer marcador inducible que se expresa en la superficie celular de los linfocitos T durante su activación.<sup>65</sup>

Concluidas las 24 h de incubación, a las células provenientes de los diferentes tratamientos se les adicionó 100  $\mu$ L de buffer de reacción PBS/BSA/Na<sub>3</sub>N y se recolectó la suspensión por medio de agitación mecánica suave. Esta suspensión se incubó con una mezcla de anticuerpos antiCD69-FITC (*clona FN50, BD Pharmingen*) y antiCD8-PECy5 (*clona HIT8a, Biolegend*) por 30 min. Terminado el tiempo de incubación las células se fijaron y se lavaron con paraformaldehído. Se procedió a hacer la lectura en el citómetro FACSCalibur.

### **6.9 Determinación del porcentaje de las subpoblaciones naïve, memoria y efectora de linfocitos T CD8+ en apoptosis y activación**

La expresión de la isoforma CD45RA, de la familia de las proteínas tirosin fosfatasas conocidas como antígeno leucocitario común, identifica a las células T CD8+ naïve y efectoras. Algunos reportes indican que dentro del conjunto de células T CD8+

CD45RA+, pueden ser identificadas dos diferentes subpoblaciones de acuerdo a la expresión de las moléculas CD27 (receptor de la familia del TNF) y/o CD28 (molécula de coestimulación). Basado en lo anterior, se pueden distinguir tres subpoblaciones distintas en el proceso de diferenciación de los linfocitos T CD8+: las células naïve CD45RA+CD27+, las células de memoria CD45RA-CD27+, y las células terminalmente diferenciadas o efectoras CD45RA+CD27-.<sup>50</sup>

Después de las 24 h de la estimulación las células se tiñeron con una mezcla de anticuerpos monoclonales: antiCD8-APCCy7 (*clona SK1, Biolegend*), antiCD69-Alexa Fluor 647 (*clona FN50, Biolegend*), antiCD45RA-PECy7 (*clona L48, BD Biosciences*) y antiCD27-PE (*clona M-T271, Pharmingen*), en la que se dejó incubar en agitación constante por 30 min a TA. Las células se lavaron y se resuspendieron en buffer HEPES conteniendo anexina V-FITC (*Biolegend*). Las células se incubaron por 15 min a TA. Terminado el tiempo de tinción se procedió a realizar la lectura en el Citómetro de Flujo FACSCanto II.

#### **6.10 Análisis del porcentaje de linfocitos T CD8+ y sus subpoblaciones en apoptosis y activación**

El porcentaje de apoptosis y/o activación en la población de linfocitos T CD8+, o en las subpoblaciones naïve, memoria y efectora se determinó empleando el programa para citometría de flujo FlowJo versión 7.6.1.

Para el análisis del porcentaje de células T CD8+ en apoptosis, donde fue empleado el citómetro FACSCalibur, a partir del gráfico de FSC vs SSC se determinó la región correspondiente a los linfocitos, de esta región se hizo el gráfico de CD8 vs PI de donde se seleccionó la población CD8+PI- para excluir a las células necróticas, y de esta última región se realizó la gráfica de CD8 vs anexina V (Fig.6.1).

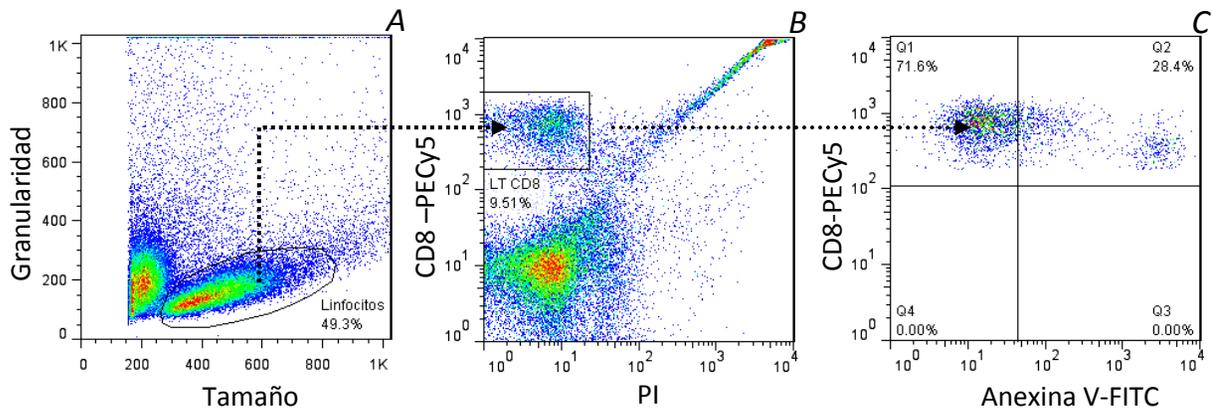


Figura 6.1. Análisis realizado para cuantificar el porcentaje de apoptosis en linfocitos T CD8+. Del gráfico de tamaño vs granularidad se delimitó la región correspondiente a los linfocitos (A), a partir de esta región se seleccionaron las células CD8+/PI- para excluir las células necróticas (B). A la población de la región CD8+/PI- se le determinó el porcentaje de células en apoptosis por el ensayo de unión a Anexina V (C).

Para el análisis del porcentaje de células CD69+ determinado en el citómetro FACSCalibur, se determinó la región correspondiente a los linfocitos a partir del gráfico de FSC vs SSC. De esta región se hizo el gráfico de SSC vs CD8, y de esta última se graficó el CD69 para determinar la cantidad de linfocitos CD8+ que presentaban este marcador de activación (Fig 6. 2).

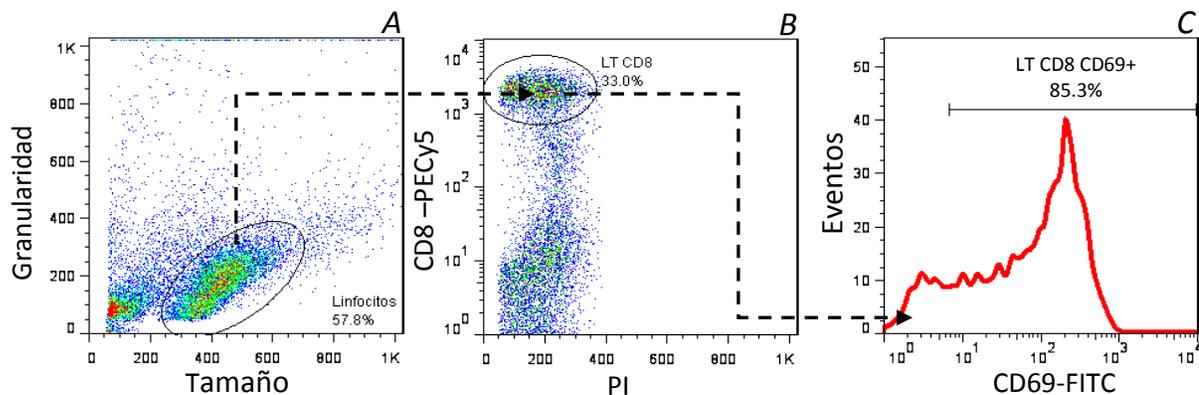


Figura 6.2. Determinación del porcentaje de células T CD8+ activadas. (A) En la región de los linfocitos se delimitó a partir de la gráfica tamaño vs granularidad. (B) A partir de esta región se seleccionaron las células positivas para CD8. (C) A partir de la población resultante de células T CD8+ se les cuantificó el porcentaje de células que expresaron CD69, uno de los primeros marcadores celulares inducibles expresados en la superficie de los linfocitos T después de su activación.

Para el análisis de los porcentajes de apoptosis o activación en linfocitos T CD8+ y sus subpoblaciones, detectadas mediante el citómetro FACSCanto, a partir del gráfico de FSC vs SSC se determinó la región correspondiente a los linfocitos, de esta región se

realizó el gráfico de CD8 vs SSC para identificar a la población CD8+, a partir de esta región se realizaron dos gráficas distintas: 1) CD69 vs anexina V para observar el porcentaje de células en apoptosis respecto al porcentaje de células activadas, y 2) CD27 vs CD45RA para identificar las tres subpoblaciones de los linfocitos T CD8+. A partir de esta gráfica, de cada subpoblación se hizo una nueva grafica de CD69 vs anexina-V, (Fig. 6.3).

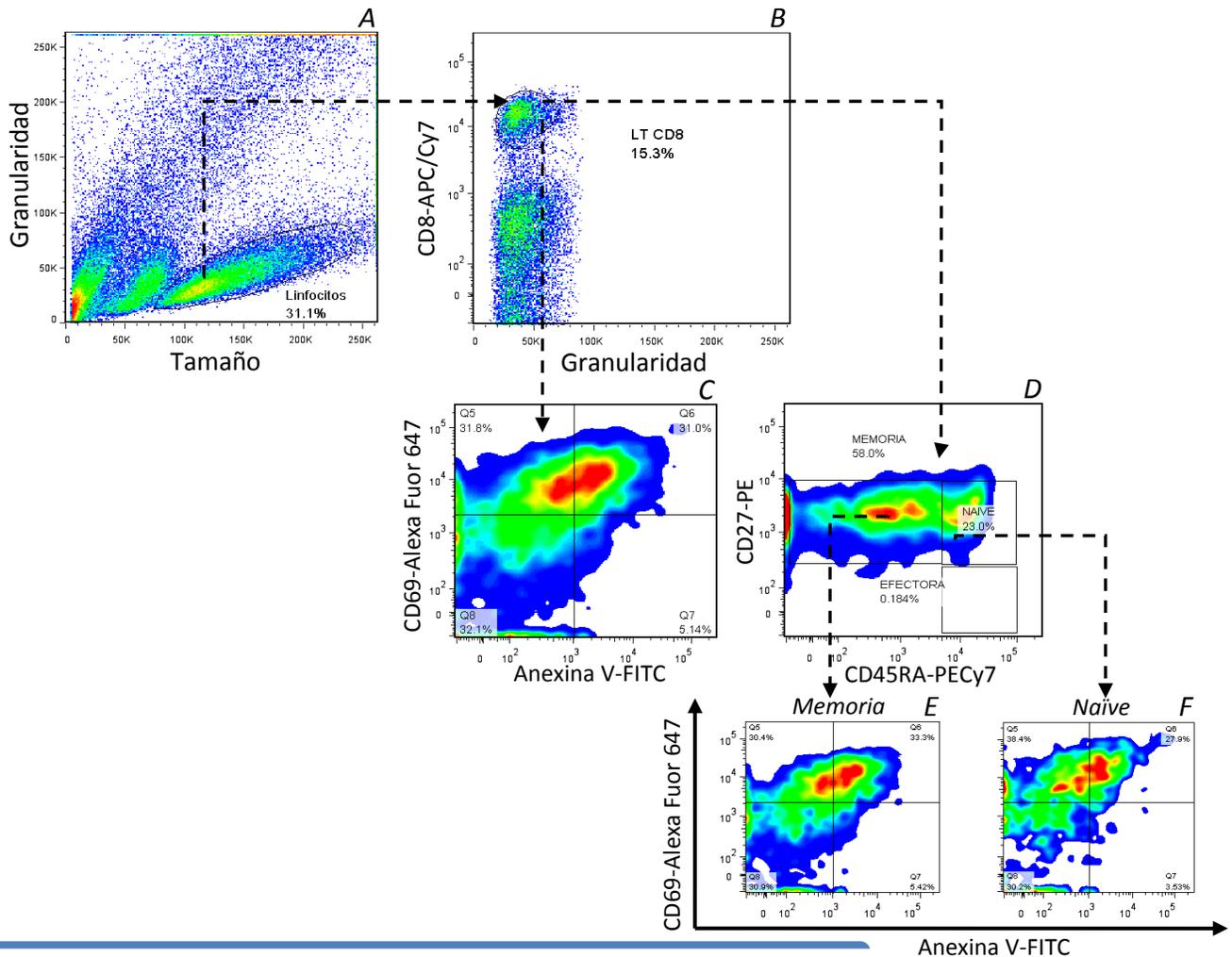


Figura 6.3. Análisis representativo realizado para la determinación del porcentaje de activación y apoptosis en linfocitos T CD8+. A partir de la gráfica de tamaño vs granularidad se delimitó la región correspondiente a los linfocitos (A), de esta región se seleccionaron a los linfocitos con marca CD8+ (B). En esta población T CD8+ se cuantificaron: 1) El porcentaje de células que expresaban el marcador CD69 y el porcentaje de células que se encontraban en apoptosis: células Anexina V+ (C) y 2) Las diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD8+: Memoria (CD27+CD45RA-), naive (CD27+CD45RA-) y efectora (CD27-CD45RA+). De las subpoblaciones de memoria y naive se determinó nuevamente el porcentaje de expresión de CD69 así como el porcentaje de células en apoptosis. A la subpoblación efectora que está prácticamente ausente en el derrame pleural no se le realizó ningún análisis posterior.

### **6.11 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó en el programa GraphPad Prism 5. Como medida de tendencia central se empleó la media. La comparación entre el efecto los inhibidores de caspasa 8 o caspasa 9 y la mezcla con respecto al control fue analizada mediante la prueba de t de Student pareada.

## VII RESULTADOS

---

### 7.1 Estandarización del ensayo de detección de apoptosis y de la concentración de los inhibidores de caspasa 8 y caspasa 9

En linfocitos provenientes de sangre periférica de sujetos sanos se estandarizó el ensayo para la detección de la apoptosis en los linfocitos T CD8+ por marcaje con anexina V/PI. Por medio de este ensayo, se determinaron las concentraciones óptimas de inhibición de la apoptosis por los inhibidores de caspasa 8 y caspasa 9 empleando citometría de flujo.

Para la inducción de la apoptosis en los linfocitos por vía mitocondrial, las CMN se incubaron con una disolución de campotecina 5  $\mu$ M, que es un agente que causa daño a nivel genético por ser un inhibidor de la DNA topoisomerasa I.<sup>66</sup> Las CMN incubaron por 24 h con la disolución de campotecina y con el anticuerpo antiCD3 [10  $\mu$ g/mL].

Para inducir apoptosis en los linfocitos por la vía del receptor, las CMN se estimularon con el anticuerpo antiCD3 por 24 h y posteriormente se incubaron por 24 h con el anticuerpo agonista antiFas (*MBL, Clona CH-11*) a una concentración de 2  $\mu$ g/mL, previamente adsorbido en placa.

Una tercera metodología utilizada para inducir apoptosis en los linfocitos T CD8+ fue la exposición a luz UV previa a la incubación con el anticuerpo antiCD3. La luz UV induce apoptosis en las células de dos maneras diferentes: 1) Causando la formación de dímeros de timina en el ADN de las células expuestas, activando la vía intrínseca de la apoptosis, y 2) estimulando de manera directa el sistema Fas/FasL, activando también la vía extrínseca de la apoptosis.<sup>67</sup>

En la Figura 7.1 se muestran los resultados representativos provenientes de los tratamientos realizados en las CMN de un sujeto sano. En los tres tratamientos empleados (campotecina, anticuerpo agonista antiFas o luz UV) se observó un aumento en el porcentaje de linfocitos T CD8+ anexina V+ (Fig 7.1B y C).

Para la determinación de las concentraciones óptimas de inhibición de la apoptosis se agregaron los inhibidores de caspasa 8, caspasa 9 o la mezcla de estos a pozos a los que se les había dado previo tratamiento apoptótico (campotecina, anticuerpo agonista antiFas o luz UV) y se dejaron incubar por 24 h.

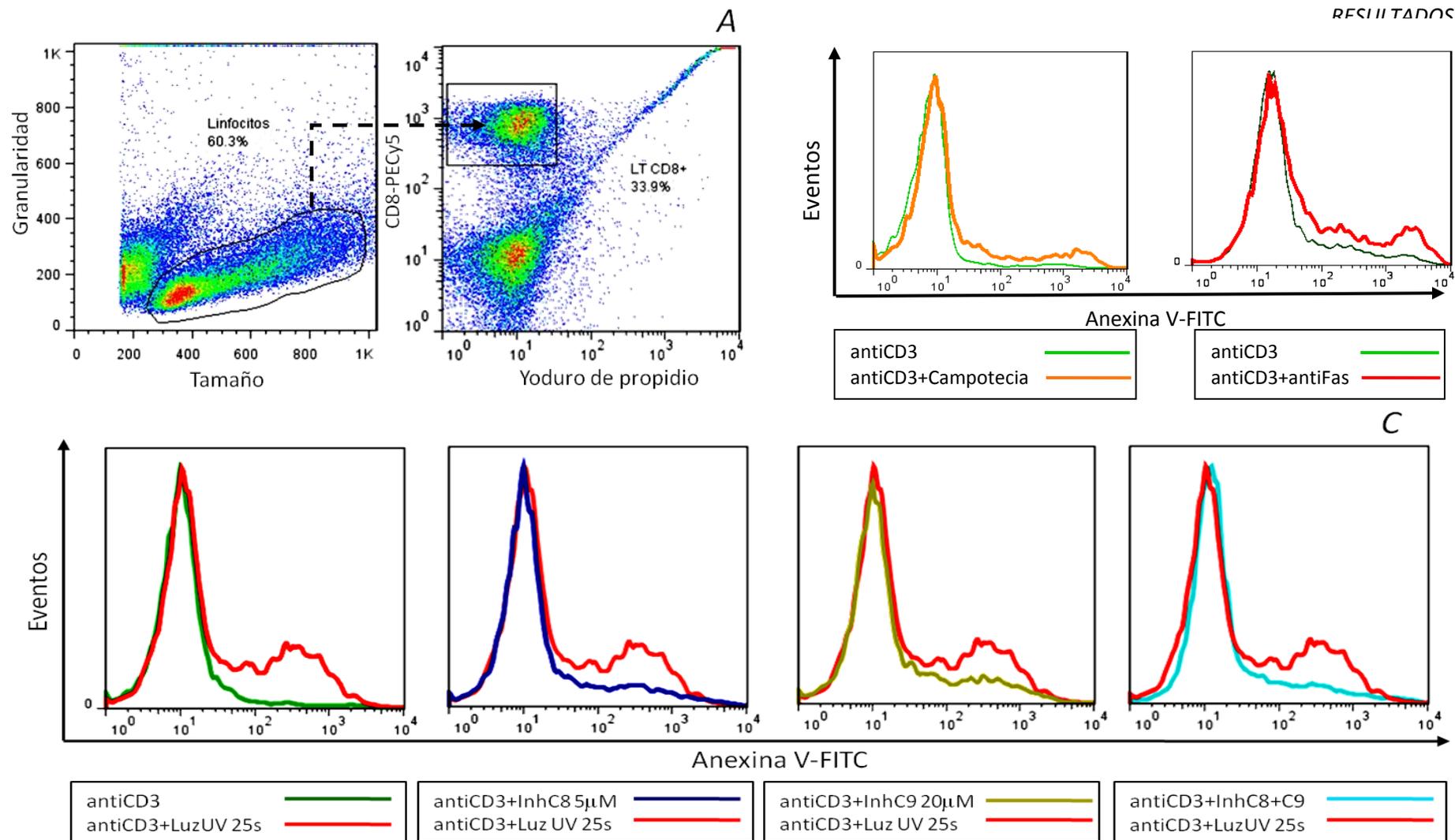


Figura 7.1. Análisis de la apoptosis inducida por campotecina, anticuerpo antiFas o luz UV en una muestra representativa de CMN provenientes de sangre periférica de un sujeto sano. Se determinó el porcentaje de células apoptóticas mediante el ensayo de unión a anexina V/PI. (A) A partir del gráfico de FSC vs SSC se delimitó la región de los linfocitos. Posteriormente se creó una nueva región para las células CD8+ PI. (B) Resultados representativos de la inducción de apoptosis por campotecina [5 μM] o anticuerpo antiFas [2 μg/mL] en CMN de un sujeto sano activadas con el anticuerpo antiCD3. Las CMN se radiaron con luz UV por 25 s y posteriormente se incubaron con dicho anticuerpo por 24 h. (C) En algunos experimentos, se incubaron células en presencia del inhibidor de caspasa 8 [5 μM], inhibidor de caspasa 9 [20 μM] o la combinación de estos. Inh C8. Inhibidor de caspasa 8. Inh C9. Inhibidor de caspasa 9.

Después de recibir radiación UV, el porcentaje de células positivas para la marca de anexina V aumentó (Fig. 7.1C). En los pozos en los que se adicionaron los diferentes inhibidores de caspasa o la mezcla de estos, se observó la disminución en el porcentaje de células anexina V+ en comparación con las células radiadas con luz UV (Fig. 7.1C). Los resultados demostraron que el método empleado detecta la apoptosis en los linfocitos T CD8+, ya fuera iniciada por la vía mitocondrial o por la vía del receptor. También se demostró que tanto el inhibidor de caspasa 8, como el inhibidor de caspasa 9 son funcionales y que las concentraciones óptimas para su uso en linfocitos T CD8+ son de 5  $\mu$ M para el inhibidor de caspasa 8 y 20  $\mu$ M para el inhibidor de caspasa 9, mismas concentraciones que fueron utilizadas en la mezcla de estos inhibidores.

## **7.2 Activación de los linfocitos T CD8+ provenientes de derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar**

Dado que el fenómeno más importante para que se presente la AICD es la activación de los linfocitos T, se decidió cuantificar el porcentaje de células T CD8+ activadas después de haber sido incubadas con el anticuerpo antiCD3 y con los diferentes inhibidores de caspasas. Este porcentaje se determinó en relación a la expresión de la molécula CD69, que es uno de los primeros marcadores inducibles que se expresan en la superficie de los linfocitos T después de ser activados.<sup>68</sup>

Se ha reportado que la caspasa 8 tiene un rol importante en el proceso de activación del linfocito T. Aun cuando los mecanismos por los que lleva a cabo este papel no han sido elucidados, se ha demostrado que entre 4 y 6 h después de iniciada la activación vía TCR, la caspasa 8 es escindida, participando en el proceso de activación del linfocito T sin que la célula muestre señales apoptóticas.<sup>34,69</sup> Para determinar si al inhibir la caspasa 8 se impedía la activación de los linfocitos T CD8+, se realizó una cinética en la que se evaluó la activación y la apoptosis de células T CD8+ de algunos sujetos sanos en presencia del inhibidor de caspasa 8. El porcentaje de células CD69+ no disminuyó al agregar el inhibidor de caspasa 8 al momento de iniciar el estímulo o hasta 6 h después de empezar la activación con el anticuerpo antiCD3; sin embargo, después de 6 h, el inhibidor de caspasa 8 no bloqueó la apoptosis. (*Datos no mostrados*)

La Figura 7.2A muestra los resultados representativos obtenidos para los ensayos realizados en las CMN de líquido pleural de un paciente, a los que se les agregó el inhibidor de caspasa 8 al tiempo en que inició el estímulo ( $t_0$ ). La Figura 7.2B muestra el porcentaje de células CD69+ obtenido de las células T CD8+ de los pacientes en presencia del inhibidor de caspasa 8 a  $t_0$  y 6 h después ( $t_6$ ) de iniciado el estímulo. El porcentaje de activación de las células a las que se les agregó los inhibidores o la mezcla de estos es menor al de las células que se incubaron solo con el anticuerpo antiCD3; sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los cuatro grupos. Respecto a las células que no se trataron con el anticuerpo antiCD3, el porcentaje de células CD69+ fue menor al 7%. (*Datos no mostrados*).

### **7.3 Muerte celular inducida por activación en linfocitos T CD8+ provenientes de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma pulmonar**

Para determinar el rol de las caspasas iniciadoras de cada vía apoptótica (extrínseca, intrínseca o ambas) en la activación o la apoptosis de los linfocitos T CD8+ de sangre periférica de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar, se realizó la incubación de las CMN de sangre periférica con el anticuerpo antiCD3 y los inhibidores de caspasa 8, caspasa 9 o la mezcla de estos, respectivamente.

Para comparar los datos obtenidos por los diferentes tratamientos en sangre periférica y líquido pleural, se utilizó el valor de porcentaje de apoptosis específica. La apoptosis específica se obtiene al realizar una transformación matemática de los datos de apoptosis obtenidos y nos permite hacer una relación entre el porcentaje de apoptosis inducida por el tratamiento con el anticuerpo antiCD3, con el porcentaje de apoptosis de las células sin tratar (testigo). La ecuación para calcular la apoptosis específica es la siguiente<sup>38,70</sup>

$$\% \text{ Apoptosis específica} = \frac{\% \text{ apoptosis inducida por el tratamiento} - \% \text{ apoptosis del testigo}}{100 - \% \text{ apoptosis del testigo}}$$

En la Figura 7.3 se muestran los resultados del porcentaje de activación así como el porcentaje de apoptosis específica en los linfocitos T CD8+ de sangre periférica.

## Porcentaje de linfocitos T CD8+ CD69+ provenientes de derrame pleural maligno

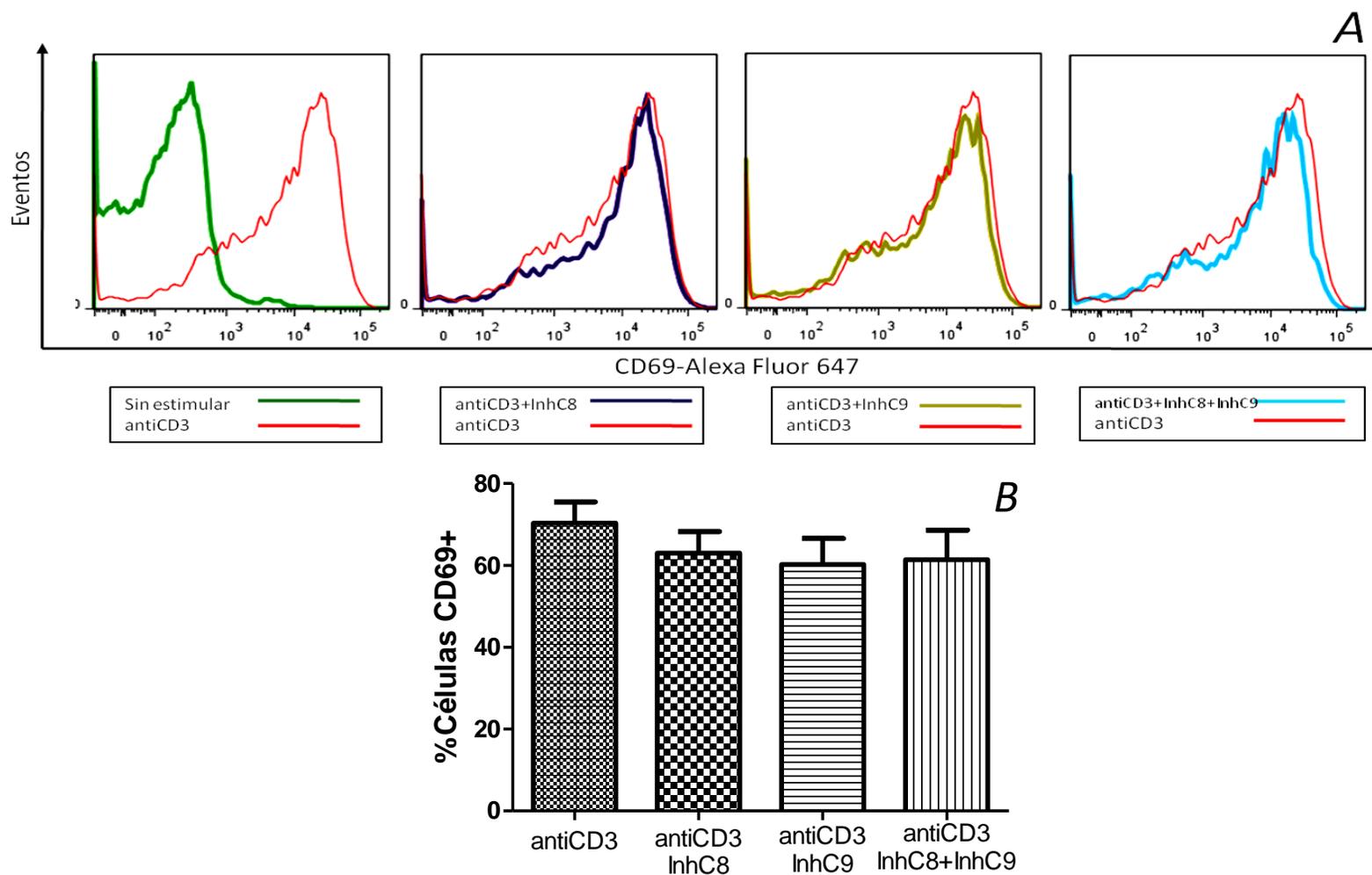


Figura 7.2 Análisis de una muestra representativa del porcentaje de activación de CMN provenientes de derrame pleural de un paciente con adenocarcinoma pulmonar. A partir del gráfico FSC vs SSC se delimitó la región correspondiente a los linfocitos y de ahí se obtuvo una nueva región correspondiente a los linfocitos T CD8+. Se determinó el porcentaje de activación celular a partir de la expresión de la molécula CD69 (A). Porcentaje de activación en linfocitos T CD8+ provenientes de derrame pleural de pacientes con carcinoma pulmonar después de haber sido incubados con el anticuerpo antiCD3 por 24h. El inhibidor de caspasa 8 se agregó al iniciar la incubación con el anticuerpo antiCD3 o 6 h después (n=12) (B). InhC8. Inhibidor de caspasa 8. InhC9 Inhibidor de caspasa 9. Barras: error estándar de la media (SEM).

Los inhibidores de caspasa, solos o la mezcla, no afectaron significativamente el porcentaje de células T CD8+CD69+, (Fig. 7.3A). El porcentaje de apoptosis específica inducida por el anticuerpo antiCD3 en los linfocitos fue similar entre los cuatro grupos (Fig. 7.3B).

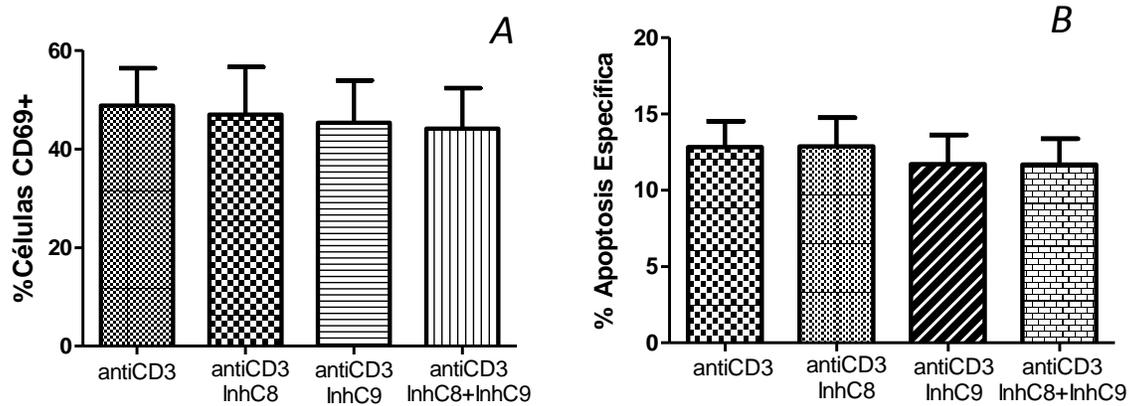


Fig 7.3 Porcentaje de activación y apoptosis específica en linfocitos T CD8+ de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma pulmonar. (n=8). Barras SEM.

Para comprobar que el fenómeno de muerte celular inducida por activación reportado era propio de los linfocitos T CD8+ que se encontraban en el derrame pleural de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar,<sup>14</sup> y por lo tanto un fenómeno relacionado a la interacción con las células malignas y el microambiente tumoral, los resultados obtenidos se compararon con los de las CMN provenientes de sangre periférica de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar. Las CMN de sangre periférica y derrame pleural fueron incubadas con el anticuerpo antiCD3 por 24 h para cuantificar la apoptosis inducida por activación, así como el porcentaje de células CD69+ (resultados de linfocitos T CD8+ de líquido pleural revisar sección 7.2).

La Figura 7.4 muestra una comparación de los porcentajes de apoptosis específica de linfocitos T CD8+ de sangre periférica y de derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar, los linfocitos T CD8+ de derrame pleural mostraron un mayor porcentaje de apoptosis específica respecto a los linfocitos de sangre periférica.

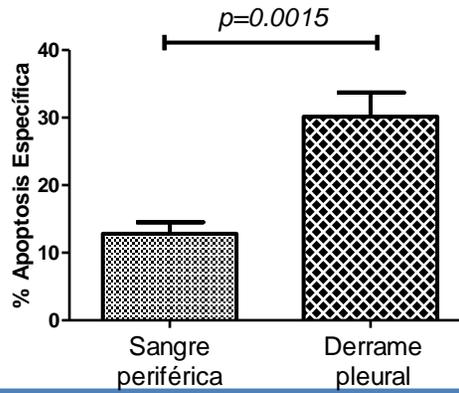


Figura 7.4 Comparación del porcentaje de apoptosis específica inducida por activación con anticuerpo antiCD3 en linfocitos T CD8+ provenientes de sangre periférica (n=8) y derrame pleural (n=12) de pacientes con adenocarcinoma pulmonar. Barras SEM.

#### 7.4 Efecto de los inhibidores de caspasa 8, caspasa 9 y su mezcla en la muerte celular inducida por activación de linfocitos T CD8+ provenientes de derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar

En un estudio preliminar se ha observado que en los linfocitos T CD8+ de pacientes con adenocarcinoma pulmonar, la activación con el anticuerpo antiCD3 AICD o muerte celular inducida por activación,<sup>14</sup> fenómeno que también fue observado en nuestras condiciones experimentales (Fig.7.4). Para determinar la participación de la vía apoptótica implicada (caspasa 8 inicia vía del receptor y caspasa 9 inicia vía mitocondrial) se emplearon inhibidores de caspasa 8, caspasa 9 o la mezcla de los inhibidores. En la Figura 7.5A se muestra los resultados de un paciente representativo. El estímulo con el anticuerpo antiCD3 provocó la muerte en un alto porcentaje de las células T CD8+; sin embargo, en las células tratadas con los inhibidores o su mezcla se encontró que existía un menor porcentaje de linfocitos T CD8+ en apoptosis (Fig 7.5A). La Figura 7.5B muestra los resultados en los linfocitos T CD8+ provenientes de derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar tratado con los inhibidores de caspasa 8, caspasa 9 o su mezcla. El grupo al que se le agregó el inhibidor de caspasa 8 mostró una reducción significativa en el porcentaje de apoptosis específica con respecto al grupo que se incubó solo con anticuerpo antiCD3 (30.2±12.3% a 23.2±12.6%, p=0.0003).

Efecto de los inhibidores de caspasa en el porcentaje de apoptosis específica de linfocitos T CD8+ de derrame pleural maligno activados con anticuerpo antiCD3

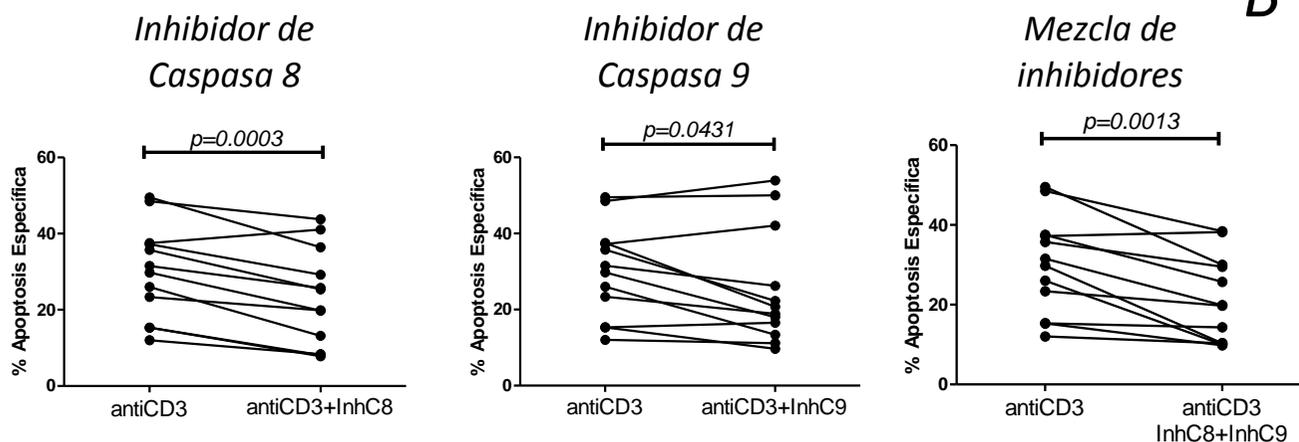
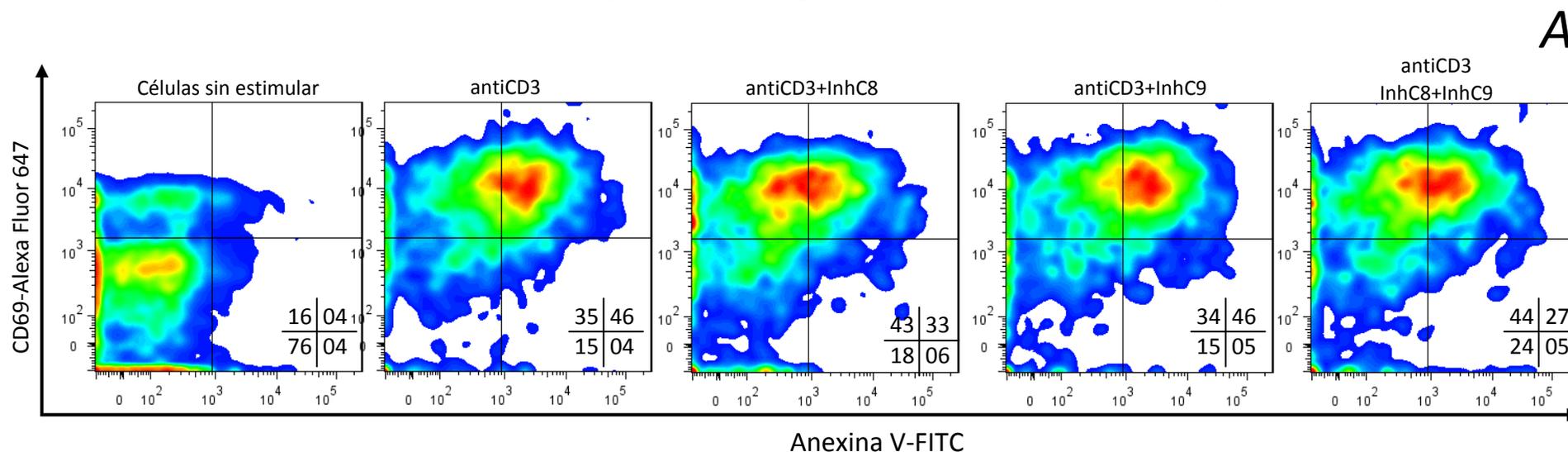


Figura 7.5 Análisis de una muestra representativa de CMN provenientes de derrame pleural de un paciente con adenocarcinoma pulmonar. Las CMN se incubaron con anticuerpo antiCD3 [10 µg/mL] por 24 h en presencia de inhibidor de caspasa 8, inhibidor de caspasa 9 o la mezcla de inhibidores (A). Porcentaje de apoptosis específica de los linfocitos T CD8+ incubados con el anticuerpo antiCD3 por 24 h bajo los distintos tratamientos.(B)

El inhibidor de caspasa 9 redujo significativamente el porcentaje de apoptosis específica con respecto a las células tratadas solo con anticuerpo antiCD3 ( $30.2 \pm 12.4\%$  a  $25.2 \pm 15.1\%$ ,  $p=0.0431$ ). La mezcla de los inhibidores también provocó una disminución significativa en el porcentaje de apoptosis específica ( $30.2 \pm 12.4\%$  a  $24.2 \pm 11.6\%$ ,  $p=0.0013$ ). (Fig. 7.5B).

### **7.5 Porcentaje de activación y apoptosis en las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ provenientes de derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar**

La Figura 7.6A muestra los resultados obtenidos de un paciente representativo, en el que se observa el análisis de cada subpoblación de los linfocitos T CD8+, empleando los marcadores CD45RA y CD27. Las células naïve se identifican por el fenotipo CD45RA+CD27+, las células de memoria son CD45RA-CD27+ y las células efectoras son CD45RA+CD27-.<sup>50</sup>

Una vez identificada cada una de las tres subpoblaciones se cuantificó el porcentaje de células CD69+ y linfocitos T CD8+ apoptóticos en las subpoblaciones naïve y de memoria. El análisis no incluyó a la subpoblación efectora porque, como se ha reportado anteriormente, dicha subpoblación está prácticamente ausente en el derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar (Fig. 7.6C y 7.6D).<sup>14,50,51</sup> En la Figura. 7.7 se muestra el porcentaje de células CD69+ para las subpoblaciones naïve y de memoria bajo los distintos tratamientos

En la población de memoria no se observaron cambios significativos entre el porcentaje de células CD69+ con el anticuerpo antiCD3 con respecto a los diferentes tratamientos, aunque con la mezcla de inhibidores se observó una leve disminución en el porcentaje de células CD69+. Para la población naïve existió una disminución significativa en el porcentaje de células CD69+ en presencia de la mezcla de los inhibidores; mientras que, para los ensayos a los que se les agregó el inhibidor de caspasa 8 y el inhibidor de caspasa 9 hubo una tendencia a disminuir que no fue significativa.

Para el análisis de la apoptosis, después de haber seleccionado por el fenotipo (CD27/CD45RA) las tres subpoblaciones de linfocitos T CD8+ provenientes de pacientes con adenocarcinoma pulmonar (Fig. 7.6A), se cuantificaron en la subpoblación naïve y de memoria el porcentaje de células anexina V+.

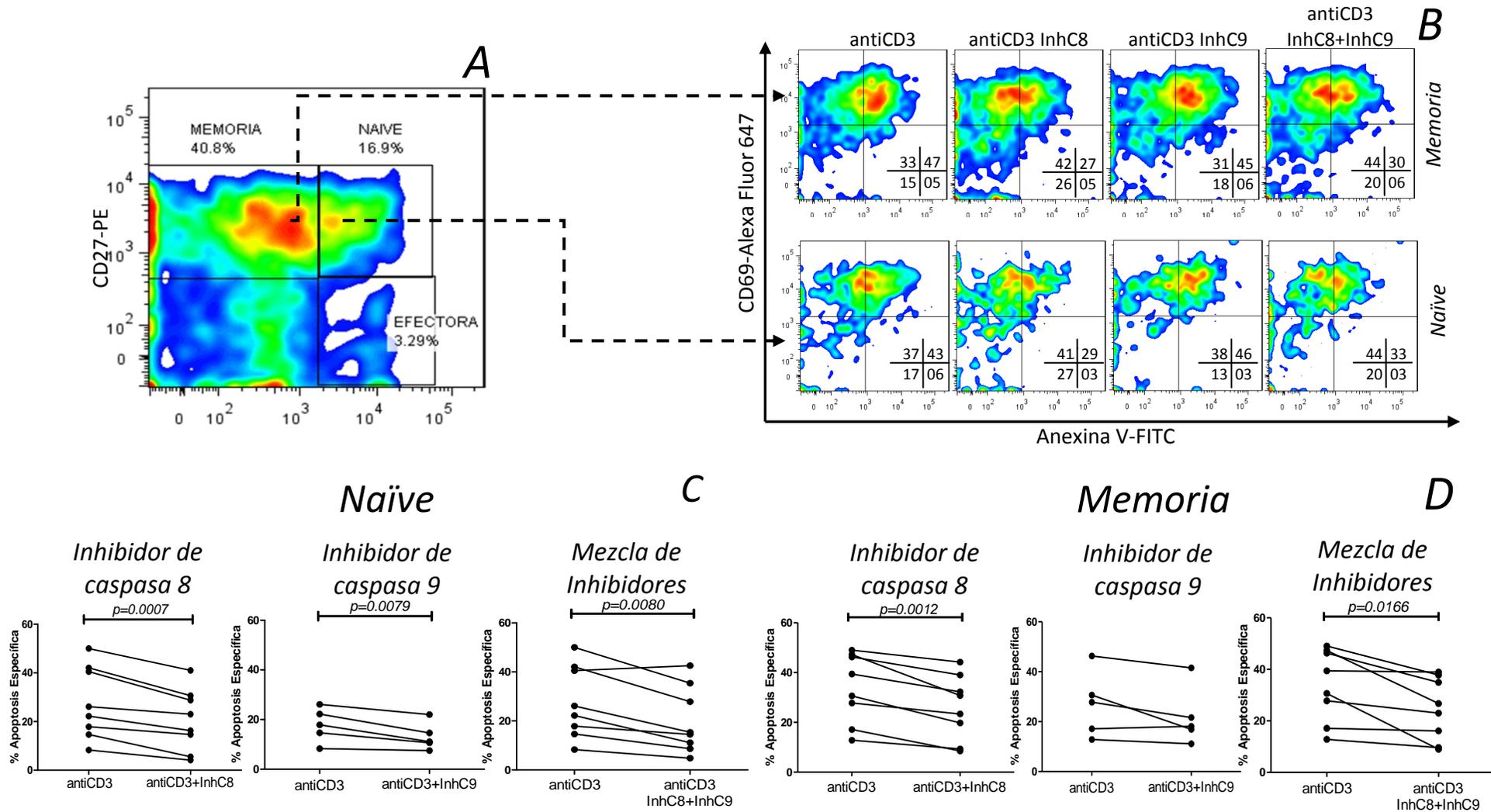


Figura 7.6 Análisis de una muestra representativa de linfocitos T CD8+ provenientes de derrame pleural maligno. (A) Se observa el gráfico a partir del cual se delimitan las tres subpoblaciones de linfocitos T CD8+ definidas por la expresión de las moléculas CD27 y CD45RA. (B) A las subpoblaciones naïve y de memoria se les realizó un nuevo análisis donde se cuantificó el porcentaje de apoptosis (anexina-V) y el porcentaje de células CD69+. (C) Resultados de los ensayos realizados para la subpoblaciones naïve y memoria (n=8. InhC8. Inhibidor de caspasa 8. InhC9 Inhibidor de caspasa 9.

En la subpoblación naïve, la adición del inhibidor de caspasa 8 provocó una reducción significativa en el porcentaje de la apoptosis específica ( $27.7\pm 14.8\%$  a  $20.5\pm 12.7\%$ ,  $p=0.0007$ ). El inhibidor de caspasa 9 redujo significativamente el porcentaje de apoptosis específica ( $17.84\pm 6.8$  a  $13.1\pm 5.5$ ,  $p=0.0079$ ) La mezcla de inhibidores disminuyó el porcentaje significativamente ( $27.7\pm 14.8\%$  a  $20.0\pm 13.6$   $p=0.0008$ ). (Fig. 7.6C).

Para las células de memoria, el inhibidor de caspasa 8 redujo el porcentaje de apoptosis específica significativamente ( $33.7\pm 13.9\%$  a  $25.9\pm 13.6\%$ ,  $p=0.0012$ ). El inhibidor de caspasa 9 no provocó disminución significativa. En el caso de la mezcla de inhibidores, también existió una disminución significativa en la apoptosis específica ( $33.7\pm 13.9\%$  a  $24.5\pm 12.1\%$ ,  $p=0.0166$ ) (Fig. 7.6D).<sup>14,50,51</sup>

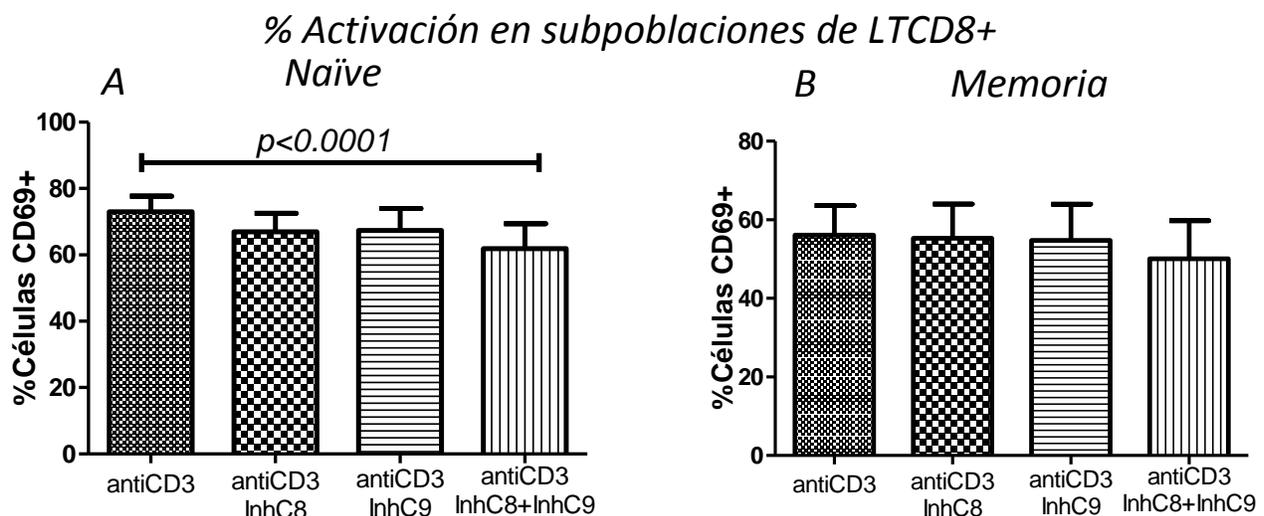


Figura 7.7 Porcentaje de activación (expresión de CD69) de las subpoblaciones naïve (A) y de memoria (B) de linfocitos T CD8+ provenientes de derrame pleural maligno.. InhC8 (n=8). Inhibidor de caspasa 8. InhC9. Inhibidor de caspasa 9. Barras SEM.

## VIII DISCUSIÓN

---

El objetivo de este trabajo fue determinar la vía de inducción de apoptosis en los linfocitos T CD8+ activados con el anticuerpo antiCD3, provenientes de derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar, en el proceso de muerte celular inducida por activación o AICD. A diferencia de los linfocitos T CD8+ provenientes de sangre periférica, las células T CD8+ de derrame pleural maligno mostraron un elevado porcentaje de células apoptóticas después de ser incubadas con el anticuerpo antiCD3, dato que es consistente con un reporte preliminar de nuestro grupo de trabajo.<sup>14</sup> Además, en el presente trabajo se demostró que las células anexina V+ coexpresaban el marcador de activación temprano CD69; es decir, los linfocitos T CD8+ activados fueron las células que entraron en el proceso de apoptosis.

Para determinar la vía apoptótica que sigue el linfocito T CD8+, se emplearon inhibidores específicos para las principales caspasas iniciadoras de cada vía, inhibidor de caspasa 8 para la vía del receptor e inhibidor de caspasa 9 para la vía mitocondrial. Se ha reportado previamente que algunas caspasas cumplen otras funciones además de participar en el proceso apoptótico.<sup>70,30</sup> En el caso de la caspasa 8 se ha demostrado que está implicada en la activación de los linfocitos T, ya que algunos reportes indican que durante la activación de linfocitos T con anticuerpo antiCD3, la caspasa 8 se escinde y se activa, sin que se inicie el proceso de apoptosis,<sup>34,69,71</sup> sin embargo, la caspasa 3 es activada hasta después de 4-6 horas de iniciada la activación, tiempo en el que se desencadena la apoptosis.<sup>69</sup> En dicho estudio, los autores demostraron que una vez escindida la caspasa 8, el linfocito T se activa y expresa el marcador CD69, aunque el mecanismo en el que participa la caspasa 8 es desconocido. No obstante, nuestros datos indican que en los linfocitos T CD8+ de sangre periférica estimulados con antiCD3, el porcentaje de células CD69+ no disminuyó al agregar el inhibidor de caspasa 8, el inhibidor de caspasa 9 o la mezcla de inhibidores. La diferencia con el reporte previo puede deberse a que, en nuestro estudio, la concentración del anticuerpo antiCD3 empleada para estimular a los linfocitos fue mayor [10 µg/mL] con respecto a lo reportado [3 µg/mL].

En el caso de los linfocitos T CD8+ provenientes de derrame pleural se encontró que la activación disminuía significativamente al incubar las células en presencia de la mezcla de inhibidores de caspasa 8 y 9, fenómeno que no se observó al incubar con los inhibidores por separado. Aun cuando para la caspasa 9 no hay reportes acerca de su participación en otros procesos diferentes a la apoptosis, ésta caspasa podría estar participando de alguna manera en el proceso de activación de los linfocitos T CD8+ provenientes del derrame pleural maligno; en este compartimento, los linfocitos T CD8+ están en contacto con las células malignas y con los factores que libera el tumor, por lo que podrían presentar alteraciones que modifiquen su proceso de activación. Se requieren de estudios posteriores para evaluar esta posibilidad.

Respecto a la apoptosis inducida por activación en los linfocitos T CD8+ de sangre periférica de los pacientes con cáncer, dado el reducido porcentaje de apoptosis, al incubar los linfocitos T CD8+ en presencia de los inhibidores de caspasa 8, caspasa 9 o la mezcla de estos, no se observó una disminución significativa en la apoptosis bajo ninguno de los tratamientos.

En los linfocitos T CD8+ de derrame pleural, el inhibidor de caspasa 8 indujo disminución en el porcentaje de apoptosis específica, lo que refleja la participación que tiene esta caspasa en el proceso apoptótico. Estos resultados son consistentes con los reportes previos que indican que la AICD es mediada por la vía del receptor,<sup>35</sup> y que los linfocitos T CD8+ del derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar muestran un incremento en el porcentaje de las células Fas+.<sup>46</sup>

Algunos reportes indican que las células T se podrían considerar como células que siguen una señalización apoptótica vía el receptor de muerte, de tipo I<sup>72,32,35</sup> en las que la cantidad de caspasa 8 activada en el DISC es suficiente para realizar el corte de la caspasa efectora 3; sin embargo, otros autores indican que los linfocitos T son células tipo II y que también requieren de la participación de la vía intrínseca. Nuestros resultados muestran que el inhibidor de caspasa 9 disminuyó significativamente el porcentaje de apoptosis específica en las células T CD8+, por lo tanto esta caspasa también participa en el proceso apoptótico. Lo anterior implica la participación de la vía mitocondrial, existiendo dos posibilidades: 1) los linfocitos T CD8+ son células de tipo II y requieren de la participación de la molécula tBid para desencadenar el proceso de

apoptosis por la vía mitocondrial y 2) la mitocondria de estas células está sensibilizada por factores liberados por el tumor al microambiente.<sup>49,53,73</sup>

Nuestros resultados indican que la disminución en el porcentaje de apoptosis al agregar el inhibidor de caspasa 8, el inhibidor de caspasa 9 y la mezcla de ambos fueron similares, por lo que la inhibición de la apoptosis no es aditiva. Lo anterior sugiere que los linfocitos T CD8+ de derrame pleural maligno se comportan como células tipo II, en donde existe una amplificación de la señal apoptótica por parte de la mitocondria, como ha sido reportado en otros estudios en cáncer de cabeza y cuello, melanoma y carcinoma renal.<sup>58,59,74</sup> Para corroborar que los linfocitos T CD8+ se comportan como células de tipo II o tipo I, se requiere determinar la expresión de la proteína Bid y su producto escindido tBid; o si existe internalización del complejo trimérico formado por el receptor Fas, una vez que haya comenzado el proceso apoptótico, lo que es una característica clave de las células de tipo I.<sup>45,59</sup>

Además, para determinar el papel de la mitocondria en la AICD de los linfocitos T CD8+ de derrame pleural maligno y si el organelo está sensibilizado, es importante determinar el nivel de expresión de las proteínas anti y pro apoptóticas de la familia de Bcl-2, tales como Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bax, Bad y Bim. Se ha determinado que en linfocitos T CD8+ de pacientes con SCCHN hay una disminución en la expresión de la molécula antiapoptótica Bcl-2 mientras que se incrementa la expresión de la molécula proapoptótica Bax.<sup>58</sup> El análisis de estas proteínas permitirá determinar el papel que juegan estas moléculas en la AICD de los linfocitos T CD8+ de los pacientes con carcinoma pulmonar.

Una vez que se determinó el porcentaje de linfocitos T CD8+ en apoptosis después de haber sido activados con el anticuerpo antiCD3, y haber cuantificado el efecto de los inhibidores de caspasas, se decidió observar el fenómeno estudiado en las subpoblaciones de linfocitos T CD8+. Como ya se ha mencionado, los linfocitos T CD8+ se pueden clasificar en tres etapas diferentes de acuerdo a su proceso de diferenciación celular y las funciones que llevan a cabo; estas subpoblaciones son: naïve, efectora y memoria.<sup>50</sup> Se ha reportado que en los linfocitos T CD8+ provenientes de derrame pleural, la subpoblación de memoria se encuentra aumentada, mientras que la subpoblación efectora se encuentra en un porcentaje

reducido, en comparación con las células T CD8+ obtenidas de la sangre periférica de los mismos pacientes o de sujetos sanos.<sup>50</sup> Nuestros resultados son acordes a este reporte; además, en las tres subpoblaciones de las células T CD8+ provenientes de derrame pleural existe un aumento en la expresión de la molécula Fas.<sup>50</sup>

Nuestros resultados indican que tanto en población naïve como en población de memoria, la activación de la caspasa 8 es un evento necesario para ejecutar el proceso apoptótico, es por esto que cuando se agregó el inhibidor de dicha caspasa el porcentaje de apoptosis en ambas subpoblaciones de células T CD8+ disminuyó de manera significativa. Con el inhibidor de caspasa 9 se observó que en la subpoblación de memoria no hubo una disminución significativa en el porcentaje de células apoptóticas; contrario a la subpoblación naïve donde sí se observó una disminución en la apoptosis. Lo anterior sugiere que los linfocitos T CD8+ naïve son células tipo II; tal como se ha reportado para la muerte inducida por activación en linfocitos T CD8+ totales de pacientes con melanoma.<sup>75,76</sup> Como se había mencionado, el análisis de la expresión de las proteínas de la familia de Bcl-2 permitiría elucidar la participación de la mitocondria.

Aunque no se observó inhibición en la apoptosis mediada por el inhibidor de caspasa 9 en la subpoblación de memoria, lo cual sugiere que las células de esta subpoblación son tipo I, se requiere incrementar el número de pacientes para determinar si este comportamiento se mantiene.

El papel de los TIL, sobre todo de los linfocitos T citotóxicos en la progresión y eliminación del tumor es de suma importancia y varios factores contribuyen al escape de las células tumorales a la respuesta inmune antitumoral. La eliminación de las células T CD8+, ya sea por la muerte inducida por activación, secreción tumoral o autócrina de factores citotóxicos o por aumento en la expresión de receptores de muerte en estas células, es de los eventos que más afectan la respuesta inmune en contra del tumor. Esta investigación pretendió comprender los procesos apoptóticos iniciales que se dan en la AICD en los linfocitos T CD8+ que se encuentran en el derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar, ya fuera por vía del receptor o por la vía mitocondrial. Basados en nuestros resultados podemos señalar que los linfocitos T CD8+ provenientes de derrame pleural de pacientes con

adenocarcinoma pulmonar, después de ser activados por 24 h con el anticuerpo antiCD3, entran en apoptosis mediada por la vía del receptor; en particular la subpoblación naïve lleva a cabo la señalización de tipo II y aparentemente en la subpoblación de memoria la señalización es de tipo I.

Aun cuando falta información para entender por completo el proceso de muerte de las células T CD8+ mediado por el cáncer pulmonar, estas primeras investigaciones abren la posibilidad de tener mejores acercamientos inmunoterapéuticos, tal es el caso de la transferencia adoptiva o pasiva, que en un futuro permitan hacer frente a esta enfermedad de mejor manera.

## IX CONCLUSIONES

---

1. La inhibición de las caspasa 8 y 9 por medio de inhibidores específicos no provocó cambios en el porcentaje de células CD69+ en linfocitos T CD8+ incubados con el anticuerpo antiCD3.
2. Los linfocitos T CD8+ provenientes de derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar mostraron un mayor porcentaje de apoptosis, después de ser incubados con el anticuerpo antiCD3, que los linfocitos T CD8+ de sangre periférica de los mismos pacientes.
3. En linfocitos T CD8+, provenientes de derrame pleural maligno y activados con el anticuerpo antiCD3, se determinó que:
  - La inhibición de las caspasas 8 y 9 por medio de inhibidores específicos no provocó cambios en el porcentaje de células CD69+.
  - El inhibidor de caspasa 8 disminuyó el porcentaje de apoptosis inducida por activación.
  - El inhibidor de caspasa 9 disminuyó el porcentaje de apoptosis inducida por activación.
  - El inhibidor de caspasa 8 disminuyó el porcentaje de apoptosis en las subpoblaciones naïve y memoria.
  - El inhibidor de caspasa 9 disminuyó el porcentaje de apoptosis únicamente en la subpoblación naïve.

## X BIBLIOGRAFÍA

---

1. Pelengaris, S.; Khan, M.; Steward, W.; al., e., *The molecular biology of cancer*. Blackwell Publishing: Oxford, UK., 2006; p
2. Croce, C. M., Oncogenes and cancer. *New Eng J Med* **2008**, *358*, 502-11.
3. Hanahan, D.; Weinberg, R. A., The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57-70.
4. Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/features/qa/15/es/index.html>. (accessed 26 de Agosto).
5. INEGI. [www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2010](http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2010) -.doc (accessed 27 de Agosto).
6. Minna, J. D.; Roth, J. A.; Gazdar, A. F., Focus on lung cancer. *Cancer Cell* **2002**, *1*, 49-52.
7. Payne, S., 'Smoke like a man, die like a man?': a review of the relationship between gender, sex and lung cancer. *Soc Sci Med* **2001**, *53*, 1067-80.
8. Herbst, R. S.; Heymach, J. V.; Lippman, S. M., Lung Cancer. *New Eng J Med* **2008**, *359*, 1367-1380.
9. Brambilla, E.; Travis, W. D.; Colby, T. V.; Corrin, B.; Shimosato, Y., The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Resp J* **2001**, *18* (6), 1059-68.
10. Pasic, A.; Postmus, P. E.; Sutudja, T. G., What is early lung cancer? A review of the literature. *Lung Cancer* **2004**, *45* (3), 267-77.
11. Cano-Valle, F.; Nuñez, P.-R. C.; Cardoso-Ramón, M.; al., e., *Pleura*. Piensa: México, 1991.
12. Fauci, A. S.; Braunwald, E.; Kasper, D. L.; Hauser, S. L.; Longo, D. L.; Jameson, J. L.; Loscalzo, J., *Harrison: Principios de Medicina Interna*. McGraw-Hill: México, 2005; p 3484.
13. Kvale, P. A.; Simoff, M.; Prakash, U. B., Lung cancer. Palliative care. *Chest* **2003**, *123*, 284S-311S.
14. Zepahua-Angeles, D. Evaluación de la Susceptibilidad a la Apoptosis Mediada por Fas y a la Muerte Inducida por activación en Linfocitos TCD4 y TCD8 de Pacientes con Carcinoma Pulmonar. U.A.M., Mexico, DF., 2007.
15. Prado-García, H.; Ávila, F.; López-Gonzales, J., Linfocitos T citotóxicos en cancer y autoinmunidad. *Rev Inv Clin* **2004**, *56*, 629-639.
16. Igney, F. H.; Krammer, P. H., Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol* **2002**, *71*, 907-20.
17. Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pillai, S., *Immunología Celular y Molecular*. 6 ed.; Elsevier: Barcelona, España., 2008; p 565.
18. Burnet, F. M., Immunological aspects of malignant disease. *Lancet* **1967**, *1*, 1171-4.
19. Rabinovich, G. A.; Gabrilovich, D.; Sotomayor, E. M., Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* **2007**, *25*, 267-96.
20. Marincola, F. M.; Jaffee, E. M.; Hicklin, D. J.; Ferrone, S., Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* **2000**, *74*, 181-273.
21. Nakashima, M.; Sonoda, K.; Watanabe, T., Inhibition of cell growth and induction of apoptotic cell death by the human tumor-associated antigen RCAS1. *Nat Med* **1999**, *5*, 938-42.
22. Muller, A. J.; DuHadaway, J. B.; Donover, P. S.; Sutanto-Ward, E.; Prendergast, G. C., Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nat Med* **2005**, *11*, 312-9.
23. Curiel, T. J.; Coukos, G.; Zou, L.; Alvarez, X.; Cheng, P.; Mottram, P.; Evdemon-Hogan, M.; Conejo-Garcia, J. R.; Zhang, L.; Burow, M.; Zhu, Y.; Wei, S.; Kryczek, I.; Daniel, B.; Gordon, A.; Myers, L.; Lackner, A.; Disis, M. L.; Knutson, K. L.; Chen, L.; Zou, W., Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* **2004**, *10*, 942-949.
24. Dong, H.; Strome, S. E.; Salomao, D. R.; Tamura, H.; Hirano, F.; Flies, D. B.; Roche, P. C.; Lu, J.; Zhu, G.; Tamada, K.; Lennon, V. A.; Celis, E.; Chen, L., Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* **2002**, *8*, 793-800.
25. Green, D. R.; Droin, N.; Pinkoski, M., Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* **2003**, *193*, 70-81.
26. Zaks, T. Z.; Chappell, D. B.; Rosenberg, S. A.; Restifo, N. P., Fas-mediated suicide of tumor-reactive T cells following activation by specific tumor: selective rescue by caspase inhibition. *J Immunol* **1999**, *162*, 3273-9.
27. Radoja, S.; Saio, M.; Frey, A., B., CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes are primed for Fas-mediated activation-induced cell death but are not apoptotic in situ. *J Immunol* **2001**, *10*, 6074-83.
28. Hengartner, M. O., The biochemistry of apoptosis. *Nature* **2000**, *407*, 770-6.
29. Riedl, S. J.; Shi, Y., Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2004**, *5*, 897-907.

30. Li, J.; Yuan, J., Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* **2000**, *27*, 6194-6206.
31. Brenner, D.; Krammer, P. H.; Arnold, R., Concepts of activated T cell death. *Crit Rev Oncol Hemat* **2008**, *66*, 52-64.
32. Krammer, P. H.; Arnold, R.; Lavrik, I. N., Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* **2007**, *7*, 532-42.
33. Budd, R. C., Activation-induced cell death. *Curr Op Immunol* **2001**, *13*, 356-362.
34. Maelfait, J.; Beyaert, R., Non-apoptotic functions of caspase-8. *Biochem Pharmacol* **2008**, *76*, 1365-73.
35. Krueger, A.; Fas, S. C.; Baumann, S.; Krammer, P. H., The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. *Immunol Rev* **2003**, *193*, 58-69.
36. Golks, A.; Brenner, D.; Schmitz, I.; Watzl, C.; Krueger, A.; Krammer, P. H.; Lavrik, I. N., The role of CAP3 in CD95 signaling: new insights into the mechanism of procaspase-8 activation. *Cell Death Differ* **2006**, *13* (3), 489-98.
37. Arnold, R.; Brenner, D.; Becker, M.; Frey, C. R.; Krammer, P. H., How T lymphocytes switch between life and death. *Eur J Immunol* **2006**, *36*, 1654-8.
38. Scaffidi, C.; Fulda, S.; Srinivasan, A.; Friesen, C.; Li, F.; Tomaselli, K. J.; Debatin, K. M.; Krammer, P. H.; Peter, M. E., Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* **1998**, *17*, 1675-87.
39. Marsden, V. S.; Strasser, A., Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu Rev Immunol* **2003**, *21*, 71-105.
40. Hildeman, D. A.; Zhu, Y.; Mitchell, T. C.; Kappler, J.; Marrack, P., Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo. *Curr Op Immunol* **2002**, *14*, 354-9.
41. Schulze-Luehrmann, J.; Santner-Nanan, B.; Jha, M. K.; Schimpl, A.; Avots, A.; Serfling, E., Hematopoietic progenitor kinase 1 supports apoptosis of T lymphocytes. *Blood* **2002**, *100*, 954-60.
42. Jaattela, M.; Tschopp, J., Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat Immunol* **2003**, *4*, 416-23.
43. Wang, D.; Muller, N.; McPherson, K. G.; Reichardt, H. M., Glucocorticoids engage different signal transduction pathways to induce apoptosis in thymocytes and mature T cells. *J Immunol* **2006**, *176*, 1695-702.
44. Lu, B.; Finn, O. J., T-cell death and cancer immune tolerance. *Cell Death Differ* **2008**, *15*, 70-9.
45. Gastman, B. R.; Johnson, D. E.; Whiteside, T. L.; Rabinowich, H., Tumor-induced apoptosis of T lymphocytes: elucidation of intracellular apoptotic events. *Blood* **2000**, *95*, 2015-23.
46. Trapani, J. A., Tumor-mediated apoptosis of cancer-specific T lymphocytes--reversing the "kiss of death"? *Cancer Cell* **2002**, *2*, 169-71.
47. Restifo, N., P., Not so Fas: Re-evaluating the mechanisms of immune privilege and tumor escape. *Nat Med* **2000**, *5*, 493-5.
48. Huang, M.; Wang, J.; Lee, P.; Sharma, S.; Mao, J. T.; Meissner, H.; Uyemura, K.; Modlin, R.; Wollman, J.; Dubinett, S. M., Human non-small cell lung cancer cells express a type 2 cytokine pattern. *Cancer Res* **1995**, *55*, 3847-53.
49. Albers, A. E.; Schaefer, C.; Visus, C.; Gooding, W.; DeLeo, A. B.; Whiteside, T. L., Spontaneous apoptosis of tumor-specific tetramer+ CD8+ T lymphocytes in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer. *Head Neck Surg* **2009**, *31*, 773-81.
50. Prado-Garcia, H.; Aguilar-Cazares, D.; Flores-Vergara, H.; Mandoki, J. J.; Lopez-Gonzalez, J. S., Effector, memory and naive CD8+ T cells in peripheral blood and pleural effusion from lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer* **2005**, *47*, 361-71.
51. Prado-Garcia, H.; Aguilar-Cazares, D.; Meneses-Flores, M.; Morales-Fuentes, J.; Lopez-Gonzalez, J. S., Lung carcinomas do not induce T-cell apoptosis via the Fas/Fas ligand pathway but down-regulate CD3 epsilon expression. *Cancer Immunol Immunother* **2008**, *57*, 325-36.
52. Blank, C.; Brown, I.; Peterson, A. C.; Spiotto, M.; Iwai, Y.; Honjo, T.; Gajewski, T. F., PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells. *Cancer Res* **2004**, *64*, 1140-5.
53. Batra, R. K.; Lin, Y.; Sharma, S.; Dohadwala, M.; Luo, J.; Pold, M.; Dubinett, S. M., Non-small cell lung cancer-derived soluble mediators enhance apoptosis in activated T lymphocytes through an I kappa B kinase-dependent mechanism. *Cancer Res* **2003**, *63*, 642-6.
54. Bouillet, P.; O'Reilly, L. A., CD95, BIM and T cell homeostasis. *Nat Rev Immunol* **2009**, *9*, 514-9.
55. Reichert, T. E.; Strauss, L.; Wagner, E. M.; Gooding, W.; Whiteside, T. L., Signaling abnormalities, apoptosis, and reduced proliferation of circulating and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with oral carcinoma. *Clin Cancer Res* **2002**, *8*, 3137-45.
56. Albers, A. E.; Visus, C.; Tsukishiro, T.; Ferris, R. L.; Gooding, W.; Whiteside, T. L.; De Leo, A. B., Alterations in the T-cell receptor variable beta gene-restricted profile of CD8+ T lymphocytes in the peripheral circulation of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* **2006**, *12*, 2394-403.

57. Kim, J. W.; Wieckowski, E.; Taylor, D. D.; Reichert, T. E.; Watkins, S.; Whiteside, T. L., Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin Cancer Res* **2005**, *11*, 1010-20.
58. Kim, J. W.; Tsukishiro, T.; Johnson, J. T.; Whiteside, T. L., Expression of pro- and antiapoptotic proteins in circulating CD8+ T cells of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* **2004**, *10*, 5101-10.
59. Gastman, B. R.; Yin, X. M.; Johnson, D. E.; Wieckowski, E.; Wang, G. Q.; Watkins, S. C.; Rabinowich, H., Tumor-induced apoptosis of T cells: amplification by a mitochondrial cascade. *Cancer Res* **2000**, *60*, 6811-7.
60. Whiteside, T. L., Tumor-induced death of immune cells: its mechanisms and consequences. *Semin Cancer Biol* **2002**, *12*, 43-50.
61. Niehans, G. A.; Brunner, T.; Frizelle, S. P.; Liston, J. C.; Salerno, C. T.; Knapp, D. J.; Green, D. R.; Kratzke, R. A., Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer Res* **1997**, *57*, 1007-12.
62. Toomey, D.; Smyth, G.; Condrón, C.; Kelly, J.; Byrne, A. M.; Kay, E.; Conroy, R. M.; Broe, P.; Bouchier-Hayes, D., Infiltrating immune cells, but not tumour cells, express FasL in non-small cell lung cancer: No association with prognosis identified in 3-year follow-up. *Int J Cancer* **2003**, *103*, 408-12.
63. van Engeland, M.; Nieland, L. J.; Ramaekers, F. C.; Schutte, B.; Reutelingsperger, C. P., Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* **1998**, *31*, 1-9.
64. Sgonc, R.; Gruber, J., Apoptosis detection: an overview. *Exp Gerontol* **1998**, *33*, 525-33.
65. Santis, A. G.; López-Cabrera, M.; Hamann, J.; Strauss, M.; Ánchez-Madrid, F., Structure of the gene coding for the human early lymphocyte activation antigen CD69: A C-type lectin receptor evolutionarily related with the gene families of natural killer cell-specific receptors. *Eur J Immunol* **1994**, *24*, 1692-1697.
66. Ljungman, M.; Hanawalt, P. C., The anti-cancer drug camptothecin inhibits elongation but stimulates initiation of RNA polymerase II transcription. *Carcinogenesis* **1996**, *17*, 31-5.
67. Aragane, Y.; Kulms, D.; Metzke, D.; Wilkes, G.; Poppelmann, B.; Luger, T. A.; Schwarz, T., Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *J Cell Biol* **1998**, *140*, 171-82.
68. Santis, A. G.; Lopez-Cabrera, M.; Hamann, J.; Strauss, M.; Sanchez-Madrid, F., Structure of the gene coding for the human early lymphocyte activation antigen CD69: a C-type lectin receptor evolutionarily related with the gene families of natural killer cell-specific receptors. *Eur J Immunol* **1994**, *24*, 1692-7.
69. Kennedy, N. J.; Kataoka, T.; Tschopp, J.; Budd, R. C., Caspase activation is required for T cell proliferation. *J Exp Med* **1999**, *190*, 1891-6.
70. Schwerk, C.; Schulze-Osthoff, K., Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation. *Biochem Pharmacol* **2003**, *66*, 1453-8.
71. Chun, H. J.; Zheng, L.; Ahmad, M.; Wang, J.; Speirs, C. K.; Siegel, R. M.; Dale, J. K.; Puck, J.; Davis, J.; Hall, C. G.; Skoda-Smith, S.; Atkinson, T. P.; Straus, S. E.; Lenardo, M. J., Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* **2002**, *419*, 395-9.
72. Barnhart, B. C.; Alappat, E. C.; Peter, M. E., The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol* **2003**, *15*, 185-93.
73. Yoshino, I.; Yano, T.; Murata, M.; Ishida, T.; Sugimachi, K.; Kimura, G.; Nomoto, K., Tumor-reactive T-cells accumulate in lung cancer tissues but fail to respond due to tumor cell-derived factor. *Cancer Res* **1992**, *52*, 775-81.
74. Molto, L.; Rayman, P.; Paszkiewicz-Kozik, E.; Thornton, M.; Reese, L.; Thomas, J. C.; Das, T.; Kudo, D.; Bukowski, R.; Finke, J.; Tannenbaum, C., The Bcl-2 transgene protects T cells from renal cell carcinoma-mediated apoptosis. *Clin Cancer Res* **2003**, *9*, 4060-8.
75. Chhabra, A.; Mehrotra, S.; Chakraborty, N. G.; Dorsky, D. I.; Mukherji, B., Activation-induced cell death of human melanoma specific cytotoxic T lymphocytes is mediated by apoptosis-inducing factor. *Eur J Immunol* **2006**, *36*, 3167-74.
76. Chhabra, A., Mitochondria-centric activation induced cell death of cytolytic T lymphocytes and its implications for cancer immunotherapy. *Vaccine* **2010**, *28*, 4566-72.