



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

Densidad de población y potencial citocida de las
células citotóxicas presentes en el infiltrado
inflamatorio de adenocarcinomas pulmonares
primarios y metastásicos

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

MANUEL MENESES FLORES

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. JOSÉ SULIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ

COMITÉ TUTOR: Dr. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Dra. ANNIE PARDO SEMO

MÉXICO, D.F.

ENERO, 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 31 de octubre de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **MENESES FLORES MANUEL** con número de cuenta 77178808, con la tesis titulada **"DENSIDAD DE POBLACIÓN Y POTENCIAL CITOCIDA DE LAS CÉLULAS CITOTÓXICAS PRESENTES EN EL INFILTRADO INFLAMATORIO DE ADENOCARCINOMAS PULMONARES PRIMARIOS Y METASTÁSICOS"**, realizada bajo la dirección del: **DR. JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ.**

Presidente: DRA. ANNIE PARDO SEMO
Vocal: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
Secretario: DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA
Suplente: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
Suplente: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 31 de enero de 2012

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA

AGRADECIMIENTOS

Al programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM

Por la encomiable labor a favor de la excelencia académica de sus egresados.

A los miembros del Comité Tutorial: Dr. José Sullivan López González, Dra. Annie Pardo Semo y Dr. Luis Felipe Jiménez García por la eticidad demostrada durante el desarrollo del presente trabajo. A todos ellos, ***de profundis***, gracias.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México,

Mi *alma mater*, mi patria chica; pero grande, muy grande; tan grande, que donde quiera que ande, siempre la puedo ver.

A los miembros de mi jurado: Dra. Annie Pardo, Dr. Enrique Ortega, Dr. Ricardo Lascurain, Dr. Alejandro Zentella, Dr. Luis Felipe Jiménez. A todos ellos, gracias por revisar, corregir y enriquecer este trabajo. Nunca mi agradecimiento ha sido tanto.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias,

Por las facilidades otorgadas para mi desempeño profesional y propiciar mi superación académica.

Al Profesor Normalista Lamberto Rodríguez Padilla, quien me enseñó a leer y a escribir y todos mis maestros, incluido el Maestro Carpintero Julián Ortiz Suarez, quien me dio un *modus vivendi* al enseñarme el noble oficio de la Carpintería. Fueron ellos los que me arrancaron del bosque de los árboles torcidos.

Al Jefe de mi grupo de investigación, Dr. José Sullivan, que con su vara y su cayado ha sabido apacentar a un sin número de engendros, en la vasta pradera de la ciencia. Y a mis compañeros de grupo: Ángeles, Dolores, Fidel, Héctor, Heriberto, Lorenzo, Olivia Patricia, Susana y Verónica.

A la Dra. Rosa María Rivera Rosales, jefa del Servicio de Patología del INER, por su valiosa colaboración en este trabajo y por compartir el tesoro de su sapiencia con todos nosotros.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias, Juan Carlos, Israel, Alfonso, Alejandra, Greco, Pilar, Paris, y Elizabeth, *inter alia*.

A la Dra. Margarita Rojas Ramos, Dios sabe por qué.

DEDICATORIA

Este trabajo esta dedicado:

A mis muertos,

Desde el mayor de los Meneses, "Don Manuel", para más señas, mi padre; y la más bella de las flores, Teresa Flores, mi madre. Mis hermanos Roberto Manuel y Guillermo. Y así, hasta el menor de los Meneses, Leonardo I, a quien la vida le dio el tiempo justo para una, sólo una, sonrisa: aquí la tengo.

A mis hermanos:

Marco Antonio, Sahara Beatriz, María Teresa, María Soledad, María Candelaria, Rogelio y Margarita Meneses Flores.

A mi familia

Graciela Valdez Luna, mi esposa amada, *per secula seculorum*.

Graciela Meneses Valdez, mi F1

Diana Laura, Bernardo y Leonardo, mi F2

A mis suegros, Clara Luna y Guillermo Valdez (†)

y a sus hijos: Gerardo (†), Carlos, Enrique (†) Rocío, Graciela, Luis y Estela Valdez luna.

A mis amigos de la infancia: Carlos y Javier Cardoso; Ángel Estévez, Héctor Lira, Daniel Hernández Mateos, y Martha Flores, *inter alia*.

A mis amigos de la escuela secundaria 130

Florentino, Ángel, Gustavo, Julio, Jaime, Javier, Jesús, Paula, Valentín, Graciela, Alfonso, Mario, Sosa, y muy especialmente a las Maestras Susana Takenaga Mesquida, quien me dio los números, y Bárbara Vilchis, a quien debo las letras.

A mis amigos de la escuela secundaria 139,

Raymundo, Guillermina, Lourdes y Julio (†).

Hipermetélica pasión,
tumor del alma.
Gen supresor
que se quiere expresar
y su metil transferasa
lo atraganta.

Metastásico amor:
todo lo invades,
todo lo llenas
y, al final,
todo lo matas.

Manuel Meneses Flores, 2008.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Cáncer pulmonar de la Unidad de Investigación de Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, con la asesoría y colaboración de la Dra. Rosamaría Rivera Rosales, jefa del Servicio de Patología.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
Cáncer pulmonar.....	4
Etiología.....	4
Carcinogénesis.....	6
Patología.....	8
Carcinoma de células pequeñas.....	8
Carcinoma de células no pequeñas.....	9
Carcinoma epidermoide.....	9
Carcinoma de células grandes.....	9
Adenocarcinoma.....	10
Progresión tumoral.....	11
Teoría de la inmunoección.....	13
Mecanismos inmunosupresores.....	16
La respuesta inflamatoria.....	18
El microambiente tumoral.....	20
Células del sistema inmune.....	21
Citocinas.....	23
Quimiocinas.....	24
Células dendríticas.....	25
ANTECEDENTES	26
Planteamiento del problema.....	28
HIPÓTESIS	29
OBJETIVO	29
TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	29
DISEÑO EXPERIMENTAL	30
MATERIALES Y MÉTODOS	30
Material biológico.....	30
Reactivos.....	32
Muestreo.....	32
Análisis estadístico.....	34
RESULTADOS	35
DISCUSIÓN	45

CONCLUSIONES	52
ANEXO I.....	53
BIBLIOGRAFÍA	55

Resumen

Introducción. Se ha demostrado que las células dendríticas (DC), linfocitos T citotóxicos (CTLs) y células citotóxicas naturales (NK) infiltran los tumores humanos y son importantes en la inmunovigilancia contra el cáncer; sin embargo, la relación entre densidad celular de las células dendríticas infiltrantes de tumor (TIDC) y su influencia sobre la densidad celular de las células citotóxicas, presentes en el microambiente tumoral, ha sido poco estudiada. En este trabajo nosotros estudiamos si hay una asociación entre la densidad celular de las TIDC con la densidad celular de CTLs y células NK, así como la producción de perforina y granzima de estas especies celulares en el infiltrado inflamatorio de adenocarcinomas pulmonares.

Métodos. La DC fueron identificadas con anti-S100 en doble inmunohistoquímica con CD3 o CD8 como segundo marcador; similarmente, las células NK fueron identificadas con anti-CD57, con CD3 o CD8 como segundo marcador. La inmunolocalización de células positivas para CD45RO, perforina, granzima B y TIA-1 se hizo por tinción inmunohistoquímica simple en cortes seriados. Las células positivas para cada marcador fueron contadas en 10 campos de alta magnificación (40X). La muestra fue estratificada en tumores con alto grado de infiltración por DC y tumores con bajo grado de infiltración por DC. Las diferencias entre los grupos fueron determinadas mediante la prueba t de "Student". Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados. Las TIDC mostraron diferente patrón de infiltración. El grado de TIDC coincide con la densidad celular de las células citotóxicas, sin embargo, el análisis de las células citotóxicas intratumorales no reveló diferencia entre los grupos estudiados; TIA-1 y granzima B fueron observadas en una mayor fracción de células citotóxicas en la región intratumoral de los tumores con alto grado de TIDC. Además, se observaron diferencias en la fracción de células T con fenotipo de memoria (CD45RO) en la región peritumoral de los tumores con alto grado de TIDC.

Conclusión. La escasez de células T, terminalmente diferenciadas, y la baja proporción de células citotóxicas positivas para granzima B y perforina, en el sitio del tumor, sugiere que podrían requerirse estrategias inmunoterapéuticas no sólo para potenciar la inmunidad antitumoral, sino también medios efectivos para promover la infiltración de DCs y la maduración de las células T en el tejido neoplásico.

Abstract

Background: Dendritic cells (DCs) Cytotoxic T cells (CTLs) and natural killer (NK) cells have been shown to infiltrate human tumors and are important in anticancer immunosurveillance, although little attention has been given to the relation between the cell density of tumor-infiltrating dendritic cells (TIDCs) and its influence on the cell density, perforin and granzyme expression of the cytotoxic cells subset within the tumor microenvironment. We examined whether there is an association between cell density of TIDCs, with cell density, perforin and granzyme expression of the cytotoxic cells subset in tumor samples of lung adenocarcinoma.

Methods: DCs were identified with anti-S-100 in double immunohistochemistry with CD3 or CD8 as second marker; similarly, NK cells were identified with anti-CD57 with CD3 or CD8 as second marker. Single Immunohistochemical staining in serial tissue sections was used to localize CD45RO, perforin, granzyme B, and TIA-1 positive cells. Positive cells for each marker were counted in 10 high power fields (40X). The sample was stratified in high and low grade of tumor infiltrating dendritic cells. The differences between the groups were established using the student t test. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

Results. Tumor-infiltrating dendritic cells show distinct infiltrating pattern. The TIDC grade coincides with the cell density of cytotoxic cells, Nonetheless, cytotoxic intratumoral cell analyses revealed no difference between high and low TIDC groups, TIA-1 and granzyme B were expressed on a higher fraction of the cytotoxic cells in the intratumoral region of high grade TIDC. A higher fraction of T cells showed a CD45RO⁺ phenotype was observed in the high TIDC group.

Conclusion: the paucity of terminally differentiated T cells, and the low perforina and granzyme B positive cytotoxic cells at tumor site suggests that immunotherapy strategies may require not only the boosting of tumor immunity, but also effective means to promote DC infiltration and T-cell differentiation in the neoplastic tissue.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es el resultado de la desregulación de oncogenes, genes supresores de tumores y genes guardianes de la estabilidad genómica, aunada a la evasión de la respuesta inmune (Hanahan, 2000).

El estudio de esta enfermedad se encuentra permeado por tres teorías fundamentales de la biología: La Teoría Celular, la Teoría Genética y la Teoría de la Selección Natural. La primera, establece las bases celulares de la patología; la segunda explica la transformación del fenotipo normal al fenotipo neoplásico, y la tercera pone de manifiesto los mecanismos que explican la sobrevivencia y reproducción diferencial de los fenotipos neoplásicos, es decir, la heterogeneidad tumoral.

Existen evidencias de que, en humanos, la generación de un tumor es un proceso de múltiples etapas, las cuales reflejan las alteraciones genéticas que dirigen la transformación progresiva de las células normales en células malignas (Renan, 1993, cit en Hanahan, 2000; Dunn, et al. 2002). El análisis patológico, a nivel orgánico, revela lesiones representativas de los pasos intermedios –hiperplasia, metaplasia, displasia y anaplasia– en el proceso a través del cual las células normales se transforman progresivamente en cánceres invasivos (Foulds, 1954, cit. en Hanahan, 2000).

Esas observaciones concuerdan con las evidencias experimentales que indican que el genoma de las células tumorales está alterado en múltiples sitios, habiendo sufrido trastornos que van, desde lesiones tan sutiles como mutaciones puntuales (transiciones y transversiones), a lesiones mayores como la delección cromosómica (Kinzler and Vogelstein, 1996). En conjunto, las observaciones en cánceres humanos y modelos animales apoyan el hecho de que la transformación de un tejido normal en tejido neoplásico, sucede mediante un proceso de selección análogo al planteado por Charles Darwin en su Teoría de la Selección Natural; *i. e.*, la sucesión de cambios genéticos origina una gran variabilidad fenotípica sobre la cual operan presiones de selección que dirigen la transformación progresiva de células normales a células neoplásicas (Foulds, 1954; Nowell, 1976, cit. en Hanahan, 2000).

Hanahan y Weinberg han sugerido que el vasto repertorio de genotipos de las células neoplásicas es una manifestación de seis alteraciones esenciales en la fisiología celular, las cuales determinan colectivamente el crecimiento maligno. Estas alteraciones son: autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitorias del crecimiento, evasión de la apoptosis, potencial de replicación ilimitado, angiogénesis sostenida, invasión tisular y metástasis (Hanahan 2000). Recientemente, Zitvogel agregó una séptima característica a esta lista; esta es: la evasión de la respuesta inmune (Zitvogel, 2006; Hanahan, 2011).

CÁNCER PULMONAR

El cáncer pulmonar representa el 12.3% de todos los cánceres en el mundo y es la principal causa de muerte a nivel mundial. Se estima que en el año 2000 surgieron 1.2 millones de casos nuevos y, que en el mismo año, esta enfermedad causó 1.1 millones de muertes en todo el mundo, lo cual representa el 17.8% de la mortalidad originada por el cáncer (Minna, 2002).

En la última mitad del siglo pasado, se incrementó el cáncer pulmonar en hombres y paulatinamente esta tendencia se ha evidenciado también en mujeres, principalmente asociado a la exposición al humo de tabaco. Actualmente un 25% de las defunciones por cáncer, en Norteamérica, se deben al cáncer pulmonar. A pesar de que la incidencia de cáncer pulmonar en mujeres es más baja que en hombres, esta enfermedad ha llegado a ser la segunda causa de muerte en mujeres. La alta incidencia del cáncer pulmonar no muestra tendencia a disminuir o a estabilizarse, por lo que esta enfermedad sigue siendo uno de los principales problemas de salud pública (Molina, 2008).

Etiología

La epidemiología molecular ha puesto de manifiesto diferencias genéticas asociadas al riesgo de desarrollar cáncer pulmonar. La mayoría de los agentes químicos naturales y hechos por el hombre son metabolizados por enzimas detoxificadoras, principalmente de la familia del citocromo P-450; sin embargo, algunas veces estos compuestos son convertidos en

productos con actividad citotóxica, mutagénica o carcinogénica. En algunos individuos la presencia de variantes génicas provoca que las proteínas detoxificadoras sintetizadas presenten baja o nula actividad, permitiendo que el tiempo de vida media de los carcinógenos se incremente y, con esto, la posibilidad de unirse covalentemente a proteínas y ácidos nucleicos formando aductos e induciendo mutaciones puntuales, especialmente transversiones G-T, lo que conlleva a generar toxicidad celular (Minna, 2002). La permanencia de las mutaciones inducidas por agentes genotóxicos marca la iniciación del proceso denominado carcinogénesis (ver Figura 1)

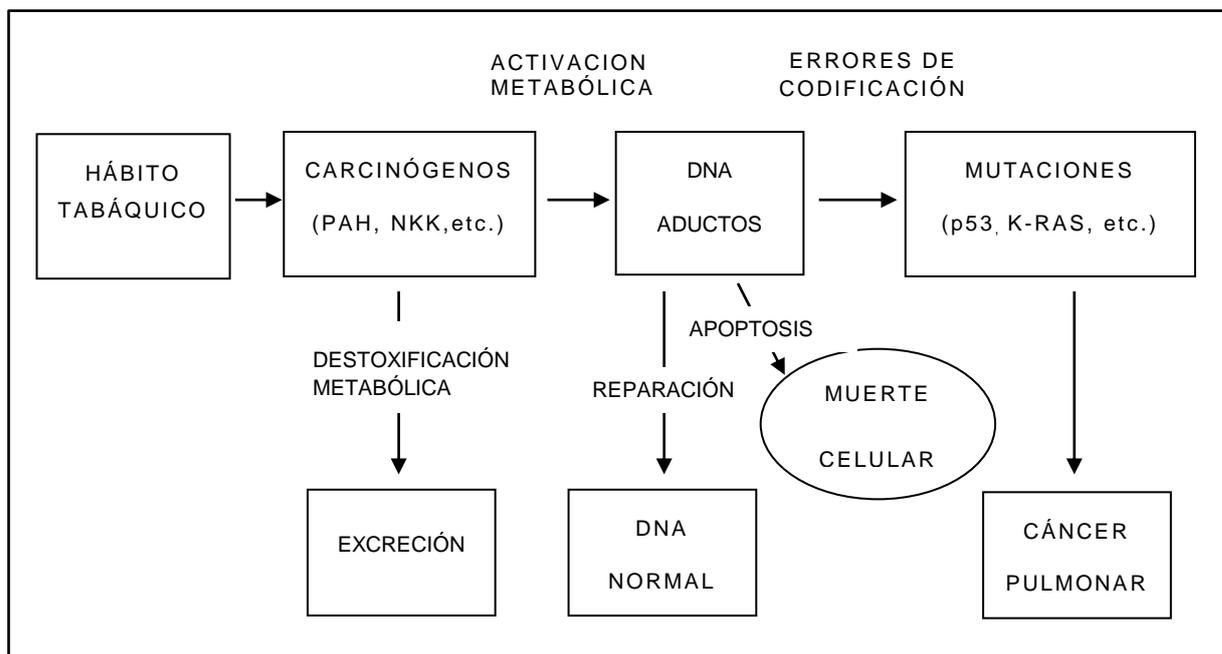


Figura 1. Hábito tabáquico, carcinógenos y patogénesis del cáncer pulmonar.

Carcinogénesis

Actualmente se conoce un gran número de factores que actúan sobre el material genético y que han sido asociados con el desarrollo de cáncer. Estos factores se clasifican –con base en su origen– en extrínsecos (factores físicos, químicos, biológicos) e intrínsecos (errores esporádicos durante la división celular, factores hormonales, hereditarios y epigenéticos).

Los defectos en el control de la duplicación y/o diferenciación celular originados por los factores intrínsecos o por la acción sinérgica de éstos con los factores extrínsecos origina dos tipos de eventos: el primero es la activación permanente de genes que codifican proteínas que inducen a la célula a dividirse, llamados proto-oncogenes. La activación de estos genes mediante procesos de amplificación, translocación o mutación puntual, da origen a los oncogenes. El segundo evento es la inactivación física o funcional por delección, mutación o modificación en la transcripción, de los genes supresores del crecimiento y muerte celular, denominados genes supresores de tumor (Webster, C.K. & White, L.R., 1995). La acumulación de estas alteraciones en la célula es gradual y requiere un largo periodo en el que pueden distinguirse diferentes etapas que conducen a la célula a mantener viabilidad y proliferación celular hasta ganar autonomía y, finalmente, al desarrollo de un tumor. Este proceso llamado carcinogénesis comprende las etapas denominadas: iniciación, promoción y progresión (DeVita, T.V., 1989).

Se considera que la etapa de iniciación es el resultado de la acción espontánea de cualquier agente genotóxico sobre los proto-oncogenes y/o genes supresores de tumor en cualquier célula del organismo (Minna, 2002). Esta alteración en la célula iniciada requiere ser irreversible, lo cual se logra porque este mismo agente u otros, actúan propiciando que las células entren a la fase de síntesis de DNA del ciclo celular.

La etapa de promoción puede ser bloqueada por agentes llamados anticarcinógenos, razón por la cual, la promoción puede ser considerada como un estado reversible del desarrollo neoplásico. Esta etapa es la que

mejor se ha estudiado, ya que se manifiesta en un periodo de tiempo relativamente largo (DeVita, 1989).

Se ha demostrado en modelos experimentales, *in vivo* e *in vitro*, que la carcinogénesis involucra varios cambios progresivos (Greenberg, 2002) denominados:

- 1) Hiperplasia, que es la proliferación celular excesiva sin alteraciones cromosómicas ni cambios citológicos.
- 2) Metaplasia que implica la exacerbación de un tipo celular determinado, y origina un cambio en el tejido sano por otro distinto al que se produce normalmente (como lo que ocurre frecuentemente al momento de regenerar un tejido),
- 3) Displasia, que es un estado de degeneración celular debido a la pérdida de caracteres morfológicos y al incremento de anomalías cromosómicas en las células iniciadas, frecuentemente consideradas como lesiones preneoplásicas.
- 4) Anaplasia, que es la regresión de las células a una forma muy primitiva e indiferenciada, conocida también como atrofia regresiva o desdiferenciación; este proceso comprende alteraciones en el número y estructura de uno o más cromosomas, así como la pérdida parcial o total de los caracteres morfológicos celulares de manera irreversible, por lo que se considera como el inicio del establecimiento de una neoplasia o tumor *in situ*.

Se estima que la célula transformada y en constante división, requiere de un periodo relativamente largo (años) para llegar a alcanzar una masa celular clínicamente detectable llamada tumor (Greenberg, 2002).

Algunos tumores pueden alcanzar la última etapa de su desarrollo natural llamada progresión, que contribuye a la adquisición del fenotipo maligno. Este proceso es bastante dinámico y complejo, ya que está sujeto a una infinidad de factores provenientes tanto de la misma célula neoplásica como del microambiente tumoral.

Patología

El carcinoma pulmonar se origina de la mucosa bronquial, por lo que es considerado broncogénico, a excepción de un pequeño porcentaje de casos. Cerca de la mitad de los tumores pulmonares son de localización central, es decir, se originan en las vías aéreas centrales; la otra mitad son periféricos, originándose en las vías aéreas pequeñas. Sin embargo, en estadios avanzados es difícil hacer esta distinción (Farzan, 1985).

Aun cuando hay diferentes tipos histológicos de cáncer pulmonar, es común hacer referencia a los cuatro tipos principales de carcinomas. Estos tipos histológicos muestran características patológicas distintivas, así como diferencias epidemiológicas, clínicas, radiográficas y pronósticas particulares. Con base en estos aspectos, los carcinomas de pulmón se clasifican en dos grandes grupos: carcinoma de células pequeñas (SCLC) y carcinoma de células no pequeñas (NSCLC). Este último comprende tres histotipos: carcinoma epidermoide, carcinoma de células grandes y adenocarcinoma (Hollguins, 2001).

CARCINOMA DE CÉLULAS PEQUEÑAS

El carcinoma de células pequeñas representa aproximadamente el 18% de todos los tipos histológicos de carcinomas observados en pulmón (Hollguins, 2001). Tiene características neuroendócrinas y se ha propuesto que se origina de células programadas para diferenciarse en ese sentido (Minna, 2002). Las células tumorales generalmente son pequeñas, redondeadas u ovals, con poco o nada de citoplasma semejantes a los linfocitos, aunque su volumen es casi del doble. El tumor crece en cúmulos que no muestran organización glandular ni escamosa; es el más agresivo de los tumores pulmonares y se caracteriza por su metástasis temprana y pobre pronóstico. Muchos de estos tumores tienen una función endócrina consistente en la secreción de hormonas (Hollguins, 2001).

CARCINOMA DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS

Carcinoma epidermoide

El carcinoma de células escamosas o carcinoma epidermoide, representa alrededor del 30% de todos los carcinomas pulmonares y es muy frecuente en individuos masculinos fumadores (Hollguins, 2001). Patológicamente se caracteriza por la formación de puentes intercelulares, perlas de queratina y el desarrollo de islas grandes y bien definidas de células malignas. La mayor parte de estos carcinomas son de localización central y su metástasis es principalmente local, involucrando estructuras circundantes y ganglios linfáticos regionales. Dado que no hay epitelio escamoso en el pulmón, se considera que estos tumores se originan de cambios metaplásicos provocados por el hábito de fumar (Minna, 2002).

Carcinoma de células grandes

Este tipo histológico de carcinoma constituye alrededor del 9% de todos los carcinomas pulmonares. Es un carcinoma pobremente diferenciado y su diagnóstico histológico es por exclusión de adenocarcinomas, carcinomas de células escamosas o carcinoma de células pequeñas. Este tipo de tumor puede crecer extremadamente rápido hasta alcanzar un gran tamaño; su metástasis es temprana, principalmente al mediastino y al cerebro (Hollguins, 2001; Farzan, 1985).

En la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (WHO), el carcinoma de células grandes está considerado como una sola entidad. Algunos grupos han propuesto que este tumor puede ser una variante muy desdiferenciada de adenocarcinomas o carcinomas de células escamosas que ya no pueden reconocerse como tales. Algunos de estos carcinomas contienen mucina intracelular (como los adenocarcinomas), otros un gran número de células multinucleadas (similares a los carcinomas de células gigantes); en cambio, otros presentan citoplasma claro (como los carcinomas de células claras) y algunos otros tienen aspecto histológico netamente fusiforme (de manera similar a los carcinomas de células fusiformes).

Adenocarcinoma

Los adenocarcinomas representan cerca del 31% de todos los carcinomas pulmonares y, el carcinoma bronquioalveolar, subtipo de adenocarcinoma, comprende del 2 al 10% de los tumores pulmonares primarios (Hollguins, 2001). Este tipo de tumor se origina de células progenitoras de bronquiolos (células de Clara) o alveolares (pneumocitos tipo 1) o de células productoras de mucina (Minna, 2002). Este tipo histológico es actualmente el más común y su frecuencia se incrementa rápidamente.

El adenocarcinoma tiene la misma incidencia que el carcinoma de células escamosas, siendo más frecuente en mujeres que en hombres. Los adenocarcinomas bien diferenciados generalmente son de localización periférica con arquitectura glandular y producción de mucina. Las principales variantes histológicas comprenden al adenocarcinoma ordinario, que se origina en bronquio, y el adenocarcinoma bronquioloalveolar, que se origina en la pared alveolar o los bronquiolos terminales. La metástasis a órganos distantes es muy frecuente en estos tumores (Farzan, 1985).

PROGRESIÓN TUMORAL

Un tumor se origina por la transformación de una célula normal en otra que es capaz de eludir sus propios mecanismos de control del crecimiento y diferenciación celular. La célula transformada prolifera para formar un tumor, que puede ser benigno o maligno. Suele considerarse que un tumor es benigno cuando permanece con una estructura similar a la del tejido del cual deriva, si crece lentamente por simple expansión, permanece encapsulado por una capa de tejido conjuntivo y, por último, si los núcleos de sus células se dividen con pocas anomalías y con pocos cromosomas anormales (Nicolson, 1979).

El tumor maligno, por el contrario, es de estructura muy desigual a la del tejido de origen, crece rápidamente y no permanece encapsulado, muestra muchas divisiones celulares y cromosomas anormales y, por último, invade el tejido normal circundante, diseminando células que tienen la propiedad de colonizar nuevos tejidos. Los rasgos distintivos entre el estado benigno y maligno, basados en la velocidad de crecimiento y en el grado de “anormalidad”, no son absolutos; puede decirse que lo que define específicamente a un tumor maligno, o cáncer, es la capacidad de invadir el tejido circundante y colonizar sitios alejados de su centro de formación, es decir, su capacidad metastásica (Nicolson, 1979).

La progresión comprende una serie de eventos que implican interacciones entre las células malignas del tumor original, las células del estroma circundante y, sobre todo, del sistema inmune del organismo. Las etapas secuenciales que concluyen en la colonización de un órgano blanco por un tumor metastásico son:

- 1) la separación de células individuales del tumor primario,
- 2) la invasión por estas células del tejido circundante,
- 3) su intravasación a la corriente sanguínea o linfática,
- 4) su adhesión en un lecho vascular distante y extravasación
- 5) adaptación y proliferación en el órgano blanco.

El ciclo puede repetirse y originar un tumor terciario, razón por la cual, la invasividad y metástasis son las propiedades más lesivas de las células malignas (Nicolson, 1979).

Como primer paso, las células malignas se extienden desde su localización original e invaden el tejido normal inmediato. Algunas células invasoras penetran en una cavidad del cuerpo (por ejemplo, la cavidad abdominal o torácica) o en el torrente sanguíneo, linfa o líquido espinal, independizándose del tumor primario. En los vasos sanguíneos o linfáticos, las células individuales o los grupos celulares, denominados émbolos tumorales, pueden ser transportados hasta lugares muy alejados de su origen. Las células que sobreviven al transporte en el sistema linfático suelen detenerse en los ganglios; las que sobreviven al transporte por el torrente sanguíneo paran en las vénulas o capilares. Una vez asentadas, las células malignas pueden escapar del entorno hostil de la linfa o la sangre mediante la invasión del tejido adyacente. Por último, la nueva micrometástasis se vasculariza, y su nueva red de vasos sanguíneos aportará los nutrientes necesarios para la proliferación y formación de una masa tumoral mayor.

La metástasis pulmonar se disemina localmente hacia la pleura, pared torácica y estructuras del mediastino; mientras que los sitios más comunes para la metástasis distante son los ganglios linfáticos, hígado, hueso, cerebro y glándulas adrenales (Hollguins, 2001).

Una alta proporción de tumores malignos que se originan en cualquier otro sitio del organismo llegan por metástasis al pulmón, debido a su especial irrigación sanguínea y linfática. Por su función de filtro, los capilares pulmonares detienen a los émbolos tumorales de la circulación venosa. De igual forma, la obstrucción de los linfáticos pulmonares por una masa tumoral infiltrante es prácticamente inevitable debido a su vasta distribución y a su función como conductos de drenaje (Nicolson, 1979).

Durante el proceso metastásico, las células malignas deben resistir la destrucción por parte de los distintos mecanismos de defensa inmune antitumoral del huésped (Nicolson, 1979), de hecho se considera que sólo el 0.01% de las células sobreviven a este proceso (DeVita, 1989).

TEORIA DE LA INMUNOEDICIÓN

Paul Ehrlich (1854-1915) fue uno de los primeros en concebir la idea de que el sistema inmune era capaz de reprimir el crecimiento de los tumores. Medio siglo después, Burnet y Thomas postularon el concepto de **inmunovigilancia** en cáncer, el cual predice que el sistema inmune puede reconocer células preneoplásicas y, en la mayoría de los casos, destruirlas antes de que éstas sean clínicamente detectables (Dunn, 2002). De acuerdo con esto, se esperaría que los pacientes con lesiones premalignas o tumores tempranos, desencadenaran una respuesta inmune vigorosa; sin embargo, se ha observado que los tumores pueden desarrollarse en individuos inmunocompetentes. Actualmente el concepto de inmunovigilancia ha sido incorporado a la teoría de la inmunoedición, la cual brinda una explicación más completa del papel que desempeña la respuesta inmune en el desarrollo del cáncer (Dunn, 2004).

El concepto de inmunoedición comprende tres procesos, denominados: eliminación, equilibrio y evasión.

La inmunovigilancia ocurre durante el proceso de eliminación, mientras que la selección natural de variantes tumorales ocurre durante el proceso de equilibrio. Esto puede, en última instancia, conducir a la evasión de variantes de baja o nula inmunogenicidad y la consecuente aparición de tumores clínicamente detectables (Dunn, 2002).

El Proceso de Eliminación. Comprende cuatro fases, comenzando con la respuesta inmune antitumoral acorde al proceso de inmunovigilancia, según el cual, las células del sistema inmune innato reconocen la presencia de un tumor debido a que este, una vez que alcanza cierto tamaño, comienza a crecer invasivamente, y requiere un suministro de sangre cada vez mayor. El proceso neoangiogénico, en el que participan proteínas angiogénicas, como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), origina una disrupción tisular, lo cual pone en marcha los mecanismos de reparación. Durante la remodelación del estroma, se generan señales inflamatorias que originan el reclutamiento de células del sistema inmune innato –células citotóxicas naturales (NK), citotóxicas naturales T (NKT), macrófagos y células dendríticas (DC) – a la región del

tumor. Estas células reconocen estructuras moleculares, en la célula tumoral, originadas por el proceso de transformación *per se*, o inducidas por la respuesta inflamatoria en curso, las cuales estimulan la producción y secreción de interferón gamma (IFN- γ) (Dunn, 2002).

En la segunda fase de la etapa de eliminación el IFN- γ , producido inicialmente, puede limitar parcialmente el crecimiento del tumor mediante mecanismos apoptóticos y antiproliferativos, a la vez que induce, en células tumorales y normales del tejido circundante, la producción de las quimiocinas proinflamatorias: CXCL 9 (monocina inducida por IFN- γ , MIG), CXCL 10 (interferon inducible protein 10, IP-10), y CXCL-11(interferon inducible T cell α chemoattractant, I-TAC). Algunas de esas quimiocinas tienen una potente actividad angiostática y contribuyen a la eliminación del tumor. Los *debris* celulares, son endocitados por las DC locales, las cuales migran hacia los ganglios linfáticos regionales donde presentarán los antígenos a las células T naïve para inducir su diferenciación y activación. Las quimiocinas producidas durante el proceso inflamatorio en curso, reclutan más células NK y macrófagos al sitio del tumor (Dunn, 2002).

En la tercera etapa de la fase de eliminación, los macrófagos y células NK infiltrantes se activan recíprocamente, mediante la producción de IFN- γ e interleucina 12 (IL-12), para ejercer su actividad citocida sobre las células tumorales. Las células NK pueden ejercer su efecto citotóxico mediante dos rutas diferentes; estas son: la vía mediada por receptor y la vía dependiente de gránulos. En la primera participan las moléculas Fas por parte del tumor, y Fas Ligando por parte de las células efectoras. En la vía dependiente de gránulos, la perforina es liberada en el espacio entre la célula efectora y la célula tumoral; acto seguido, esta proteína se inserta en la membrana de la célula tumoral, donde se oligomeriza formando poros por los cuales penetra la granzima, iniciando una cascada de reacciones que inducen la apoptosis de la célula tumoral (Dunn, 2002).

En el ganglio linfático regional, las células dendríticas recién llegadas presentan los antígenos capturados a los linfocitos T, y con ello inducen la diferenciación de células T naïve en T cooperadoras CD4⁺ tumor-

específicas que expresan IFN- γ (Th1), las cuales, a su vez, facilitan el desarrollo de linfocitos T citotóxicos CD8⁺. La presentación de antígenos y activación de linfocitos T citotóxicos, marca el inicio de la respuesta inmune adaptativa (Ullrich, 2008).

En la cuarta fase de la etapa de eliminación, las células específicas de tumor CD4⁺ y CD8⁺, se dirigen al sitio del tumor, donde los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ destruyen las células tumorales remanentes cuya inmunogenicidad ha sido amplificada por el IFN- γ producido localmente (Dunn, 2002).

El proceso de equilibrio. El sistema inmune del huésped y las células tumorales sobrevivientes al proceso de eliminación, entran en un estado de equilibrio dinámico en el que los linfocitos y el IFN- γ ejercen una fuerte presión sobre las células tumorales, la cual es suficiente para contener al tumor, más no para extinguirlo totalmente. Debido a la inestabilidad genética inherente a las células tumorales, en este periodo que puede durar años, se genera una gran variedad de células tumorales sobre las cuales opera un proceso de selección natural en el sentido Darwiniano. En este proceso, la presión de selección ejercida por el sistema inmune elimina a las clonas susceptibles de serlo, y permite la sobrevivencia y reproducción diferencial de las variantes cuyas mutaciones les confieren la capacidad de desarrollar los mecanismos necesarios para evadir su acción (Dunn, 2002).

El proceso de evasión. Las variantes de células tumorales sobrevivientes han adquirido cambios genéticos y epigenéticos que les permiten evadir la detección y/o eliminación por el sistema inmune. Esto resulta en tumores clínicamente detectables que finalmente causan la muerte del huésped (Dunn, 2002)

Mecanismos inmunosupresores

En el proceso de evasión, los tumores explotan una amplia gama de mecanismos inmunosupresores, los cuales pueden actuar de manera concertada para contrarrestar la respuesta inmune (Zitvogel, 2006). Entre los mecanismos mejor descritos se encuentran: defectos en los mecanismos de señalización proximal al receptor de células T (TCR); daño inducido por el tumor a la maquinaria de procesamiento y presentación de antígeno; activación de señales coestimuladoras negativas en el microambiente tumoral (CTLA-4/B7 [Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4/B7], PD-1/PDL-1 [programmed death-1/programmed death ligand-1]); elaboración de factores inmuno supresores (IL-10, factor de crecimiento beta transformante [TGF- β], galectin-1, gangliósidos, prostaglandina E2 [PGE2]); activación de rutas pro-apoptóticas (FasL, TRAIL [Tumor necrosis (TNF)-related apoptosis-inducing ligand],IDO [Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase], e inhibición de los procesos de diferenciación y maduración de las DC (STAT3, [signal transducer and activator of transcription 3] VEGF, IL-10, SOCS1 [suppressor of cytokine signaling 1]). Además, diferentes poblaciones celulares contribuyen a esta red inmunosupresora incluyendo células T reguladoras (Treg) y distintas subpoblaciones de células dendríticas mieloides y plasmacitoides maduras e inmaduras (revisado en Rabinovich, 2007) (Tabla 1).

Tabla 1. Impacto de las seis características de las células tumorales sobre el sistema inmune		
Característica de la célula tumoral	Factor involucrado	Efecto sobre la respuesta inmune
Autosuficiencia en señales de crecimiento	IL-4	<ul style="list-style-type: none"> • Promueve diferenciación hacia células TH2 • Inhibe respuesta inflamatoria mediante señalización aberrante de JAK-STAT3
	IL-6	
	IL-10	<ul style="list-style-type: none"> • Promueve diferenciación hacia células TH2
Insensibilidad a señales anti-crecimiento	Resistencia a TGF β	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibe la presentación de antígeno, proliferación de células T y citotoxicidad de células NK • Activación de células Treg

Tabla 1. continuación		
Característica de la célula tumoral	Factor involucrado	Efecto sobre la respuesta inmune
Evasión de apoptosis	Proteínas de la familia BCL-2 MUC1	<ul style="list-style-type: none"> • Antígenos tumorales • Subversión de la función de la DC • Antígeno tumoral
	Survivin	<ul style="list-style-type: none"> • Promueve la apoptosis de la célula T mediante la inducción de la expresión de CD95L por células tumorales • Antígeno tumoral
	Activación de caspasa disminuida	<ul style="list-style-type: none"> • Disminución de la inmunogenicidad tumoral
Potencial de replicación ilimitado	Mutaciones en p53 TERT	<ul style="list-style-type: none"> • Antígeno tumoral • Antígeno tumoral
Angiogénesis sostenida	COX2	<ul style="list-style-type: none"> • Promoción de la respuesta de células TH2 • Inhibición de citotoxicidad de las células T
	VEGF	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición de la activación de las células T • Inhibición de la activación de NF-κB en DCs
Invasión tisular y metástasis	Expresión de NECL2 disminuida	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición de la citotoxicidad de las células NK mediante CRTAM • Inhibición de la producción de IFN-γ en células T CD8⁺, mediante CRTAM
	Tráfico de lisosomas alterado	<ul style="list-style-type: none"> • Incremento de la inmunogenicidad mediante el incremento de HSP70 en la superficie celular • Induce la escisión de CD25
	MMPs	<ul style="list-style-type: none"> • Activación de TGFβ • Dispersión de ICAM1 e ICAM2

BCL-2, B-cell lymphoma 2; CD95L, CD95 ligand; COX2, cyclooxygenase-2; CRTAM, MHC-class-I-restricted T-cell-associated molecule; DC, dendritic cell; HSP70, heat-shock protein 70; ICAM, intercellular adhesion molecule; IFN-γ, interferon-γ; IL, interleukin; JAK, Janus kinase; MMP, matrix metalloproteinase; MUC1, mucin-1; NECL2, nectin-like 2; NFκ-B, nuclear factor κ-B; NK cell, natural killer cell; p53, tumour-suppressor protein p53; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3; TERT, telomerase reverse transcriptase; TGFβ, transforming growth factor-β; TH2 cell, T helper 2 cell; Treg cell, CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Fuente: Zitvogel, L., et al. (2006). Nature Rev. Immunol. 6, 715-727.

LA RESPUESTA INFLAMATORIA

Durante la generación de un tumor, la respuesta inflamatoria tiene un efecto determinante en la iniciación, promoción, transformación, invasión y metástasis, así como en los procesos de inmunovigilancia e inmunoedición. Las células del sistema inmune que infiltran el tumor se enlazan en una serie de interacciones dinámicas con las células neoplásicas y células del estroma circundante al tumor (Grivennikov, 2010).

La Inflamación se conoce desde el origen de la humanidad, debido a su asociación con la cicatrización e infección; sin embargo, el primero en definir sus síntomas clínicos: *rubor et tumor cum calore et dolore* (rubor y tumor con calor y dolor) fue el romano Cornelius Celsus en el siglo I antes de nuestra era. Las bases fisiológicas de estos los signos cardinales de la inflamación fueron reveladas casi dos mil años después por Augustus Waller (1846) y Julius Cohnheim (1867) quienes, mediante el análisis microscópico de tejidos vivos, descubrieron la migración de leucocitos de los vasos sanguíneos al tejido circundante, así como otros cambios vasculares característicos de la respuesta inflamatoria aguda: vasodilatación y permeabilidad microvascular (revisado en Medzhitov, 2010).

El quinto signo cardinal, *functio laesa* (pérdida de la función) fue añadido por Rudolph Virchow en 1858 en su libro *Cellular pathologie*. Cabe denotar que los cuatro signos cardinales, enunciados por Celsus, sólo aplican a la inflamación aguda, característica de la cicatrización e infección; mientras que el quinto, *functio laesa*, es un signo universal asociado a todos los procesos inflamatorios (revisado en Medzhitov, 2010).

Otro avance importante en el campo de la inmunología, fue el descubrimiento de la fagocitosis por Elie Metchnikoff y su teoría de la inmunidad celular, postulada en 1892, en la cual enfatiza los aspectos de la inflamación resaltando la importancia de los macrófagos y micrófagos (neutrófilos) en la defensa del huésped y en la manutención de la homeostasis tisular (Tauber, 2003). Mientras tanto, Paul Ehrlich se ocupaba en el desarrollo de la teoría de la inmunidad humoral, que llevó al

descubrimiento de la terapia sérica contra la difteria y la toxina tetánica por Emil von Behring y Shibasaburo Kitasato en 1890. El papel de los componentes del suero en la inmunidad fue apoyado más tarde por el descubrimiento del complemento por Jules Bordet en 1896. Finalmente, el establecimiento de la teoría germinal de la enfermedad, por Robert Koch y Louis Pasteur, a finales del siglo XIX, fue crucial para la apreciación de los agentes microbianos como los principales inductores de la respuesta inflamatoria aguda.

Actualmente sabemos que la inflamación se presenta de diferentes formas y modalidades, las cuales son gobernadas por diferentes mecanismos de inducción, regulación y resolución. El espectro de condiciones inflamatorias prevalente ha mudado, desde las reacciones inflamatorias agudas, en respuesta a la cicatrización e infecciones, a los estados de inflamación crónica asociados a enfermedades como la diabetes tipo 2, obesidad, aterosclerosis, asma, enfermedades neurodegenerativas y **cáncer** (Grivennikov, 2010).

Tipos de inflamación asociados con el cáncer

Algunos tipos de inflamación –diferentes en causa, mecanismos, consecuencias e intensidad– pueden promover el desarrollo y progresión del cáncer. La infección persistente por *Helicobacter pylori* está asociada con cáncer gástrico y linfoma en el tejido linfoide asociado a mucosa (MALT). Las infecciones por el virus de la hepatitis B (HBV) o C (HCV) incrementan el riesgo de adquirir carcinoma hepatocelular (HCC), y las infecciones por especies de *Schistosoma* o *Bacteroides* están asociadas al cáncer de vejiga y colon, respectivamente (Karin, 2006; Wu, 2009).

La respuesta inflamatoria, cuyo objetivo final es la eliminación de patógenos, precede al desarrollo del tumor; sin embargo, los agentes patógenos subvierten la inmunidad del huésped y establecen infecciones persistentes asociadas con inflamación crónica de bajo grado. Antagónicamente, la inflamación aguda inducida por ciertas preparaciones microbianas, fue usada con cierto éxito por el doctor William Coley en el tratamiento del cáncer en 1890 (Hoption, 2003), y una de tales

preparaciones se usa actualmente en el tratamiento del cáncer de vejiga (Rakoff-Nahoum, 2009).

Otro tipo de inflamación crónica que precede al desarrollo del cáncer es originada por la desregulación del sistema inmune y autoinmunidad. Un ejemplo de ello es la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), la cual incrementa el riesgo de cáncer colorectal (Waldner and Neurath, 2009).

Otros tumores, entre ellos los pulmonares, pueden promover la inflamación mediante la secreción activa de moléculas componentes de la matriz extracelular tales como el condroitin sulfato proteoglicano 2 (*versican*) el cual activa macrófagos a través de su receptor tipo Toll (TLR) 2 (Kim, 2009)

Por último, la radiación y la quimioterapia originan necrosis masiva de las células neoplásica y tejidos circundantes. El resultado neto de la inflamación inducida por terapia es controvertido, dado que por una parte, esta puede tener funciones promotoras que acompañan el rápido crecimiento del tumor (Ammirante, 2010; Vakkila and Lotze, 2004) y, por otra parte, puede amplificar la presentación cruzada de antígenos tumorales y la subsecuente respuesta inmune antitumoral (Zitvogel, 2008).

EI MICROAMBIENTE TUMORAL

La composición específica del microambiente tumoral es un factor determinante para el desarrollo de una respuesta inmune efectiva contra el tumor o bien para propiciar la evasión de esta respuesta, contribuyendo a la promoción y desarrollo tumoral. En cualquiera de estos dos escenarios posibles, el infiltrado linfoide circundante al tumor, desempeña un papel fundamental (Álvaro, 2010).

El microambiente tumoral se encuentra integrado por células del sistema inmune innato –macrófagos, neutrófilos, mastocitos, células mieloides supresoras, células dendríticas y células NK– y por diversas poblaciones de linfocitos T, y células B pertenecientes al sistema inmune adaptativo (Tabla 2) así como por células neoplásicas y el estroma circundante, constituido por fibroblastos, células endoteliales, pericitos y células de

mesénquima (de Visser, 2006). La comunicación entre los componentes celulares del microambiente, se lleva a cabo por contacto directo o mediante la producción de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento. De esta manera, mediante la secreción autócrina y parácrina, las diferentes especies celulares controlan y moldean el crecimiento del tumor, ya que la abundancia y estado de activación de las diferentes especies celulares, son determinantes para la promoción del tumor o bien para la promoción de la respuesta inmune antitumoral (Lin and Karin, 2007). En tumores establecidos, el balance se inclina hacia la inflamación pro-tumoral, de manera que, sin intervención terapéutica, rara vez se observa la regresión tumoral.

La evaluación del impacto global de la inmunidad y la inflamación en los eventos tumorigénicos tempranos, se dificulta debido a que nuestro conocimiento actual se basa en mediciones de la carga tumoral en un punto en el que las células neoplásicas podrían ya haber evadido los mecanismos primarios de la inmunovigilancia. Sin embargo, es seguro asumir que la inflamación promotora del tumor y la inmunidad antitumoral coexisten en diferentes etapas del desarrollo tumoral y que las condiciones microambientales tienen un papel preponderante en la determinación de estos dos escenarios (Bui and Schreiber, 2007; Swann, 2008).

Células del sistema inmune en el microambiente tumoral

Las células del sistema inmune encontradas con mayor frecuencia en el microambiente tumoral son: macrófagos asociados a tumor (TAMs) y linfocitos T. Los linfocitos T maduros suelen ser divididos en dos grandes grupos con base en el TCR que expresen: las células T $\alpha\delta$ y $\alpha\beta$; estos últimos, a su vez, se clasifican –con base en sus funciones– como células T citotóxicas CD8⁺ (CTLs) y células T cooperadoras CD4⁺ (Th), las cuales incluyen células Th1, Th2, Th17, y Treg, así como células NKT.

Con base en su fenotipo y función, los linfocitos T de humanos suelen ser divididos en cuatro diferentes subpoblaciones. Las células T naïve (T naïve, CCR7⁺ CD45RA⁺) y las de memoria central (T_{CM}, CCR7⁺ CD45RA⁻) muestran un alto potencial proliferativo y carecen de funciones efectoras inmediatas, mientras que las células T de memoria efectora (T_{EM} CCR7⁻

CD45RA⁻) presentan baja capacidad proliferativa y las de memoria efectora terminalmente diferenciados CD45RA⁺ (T_{EMRA}, CCR7⁻ CD45RA⁺), representadas por los linfocitos T citotóxicos CD8⁺, producen citocinas y presentan actividad citotóxica (Geginat, 2003). Además, las células T_{EMRA}CD45RA⁺ representan el tipo más maduro entre las células de memoria; son altamente susceptibles a la apoptosis y expresan altos niveles de las moléculas citotóxicas, granzima, perforina y Fas ligando.

Los linfocitos T_{CM} Y T_{EM}, muestran patrones de distribución característicos: los T_{CM} se encuentran principalmente en ganglios linfáticos, mientras que en pulmón, hígado e intestino la población predominante es la T_{EM}. (Campbell, 2001).

Nuestro grupo de investigación ha reportado que en el líquido pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar, el fenotipo predominante entre células CD8⁺ es de memoria efectora (CD45RA⁻CD45RO⁺CD27⁺CD28⁺), y que los Linfocitos de memoria efectora terminalmente diferenciados (CD45RO⁻CD45RA⁺CD27⁻CD28⁻) son escasos (Prado-García, 2005). Hallazgos similares han sido reportados en linfocitos infiltrantes de tumores (TILs) de carcinoma colorectal (Ye, 2006). Ambos trabajos coinciden además en que –en comparación con lo observado en linfocitos de sangre periférica de los mismos pacientes– la expresión de perforina se encuentra disminuida, por lo que puede inferirse que en el microambiente tumoral existen factores que alteran el proceso de maduración de los linfocitos T o que bloquean la producción de perforina; en cualquier caso, esto puede ser un mecanismo de evasión de la respuesta inmune antitumoral.

Coincidentemente, la depleción de células T o la manipulación de los mecanismos citotóxicos en animales de experimentación, los hace más susceptibles a la carcinogénesis ya sea espontánea o inducida químicamente (Shankaran, 2001; Swann and Smyth, 2007). También hay evidencias de que los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (Roberts, 2007), células Th1 productoras de IFN- γ , células Th2 y Th17, encontradas en los tumores sólidos, pueden favorecer la promoción, progresión o metástasis.

Citocinas

El perfil de citocinas y quimiocinas del microambiente tumoral podría ser más relevante que su contenido de células con función inmunológica, ya que diferentes citocinas pueden promover o inhibir el desarrollo y progresión del tumor sin importar su origen (Lin and Karin, 2007).

Mediante la activación de factores de transcripción (v.gr., NFκ-B [nuclear factor κ-B], AP-1 [activator protein 1], STAT-3 [signal transducer and activator of transcription 3]); y de caspasas, las citocinas pueden favorecer la inmunidad antitumoral (IL-12, TRAIL e IFN-γ) o potenciar la progresión del tumor (IL-6, IL-17 e IL-23) e incluso tener efecto directo sobre la sobrevivencia y proliferación de la célula neoplásica (TRAIL, FasL, TNF-α [tumor necrosis factor α], ligandos del receptor para el factor de crecimiento endotelial [EGFR], TGF-β, e IL-6).

Los TAMs son una de las especies celulares más importantes en el campo de la inflamación y cáncer, y una fuente importante de citocinas, especies reactivas de nitrógeno (RNS) y de oxígeno (ROS) (Schmid, 2010). Al igual que los linfocitos T se clasifican en Th1 y Th2, los macrófagos pueden ser clasificados en macrófagos tipo 1 (M1) y tipo 2 (M2) (Sica et al., 2008;). Los M1 activados por IFNγ y productos microbianos expresan altos niveles de citocinas pro-inflamatorias (TNF-α, IL-1, IL-6, IL-12 o IL-23); moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Schmid, 2010). Además, son capaces de eliminar patógenos y estimular la respuesta inmune antitumoral. Por el contrario, los macrófagos activados “alternativamente” o M2 (inducidos *in vitro* por IL-4, IL-10 e IL-13) atenúan la expresión de moléculas del MHC clase II e IL-12 y presentan un incremento en la expresión de la citocina anti-inflamatoria IL-10, del receptor “scavenger” A, y de arginasa. La mayoría de los TAMs presentan fenotipo M2 y promueven la angiogénesis y remodelación tisular (Sica et al., 2008; Schmid, 2010)

Otras células del sistema inmune que afectan la tumorigénesis son los neutrófilos, los cuales pueden desempeñar funciones tumorocidas y protumorales, dependiendo de su estado de diferenciación y la presencia de TGF-β; los linfocitos B y mastocitos contribuyen también de manera

importante al crecimiento tumoral (Ammirante, 2010). Los macrófagos convencionales y células dendríticas son importantes en la captura, procesamiento y presentación de antígenos, condición indispensable para la activación de las células T e inicio de la respuesta inmune adaptativa en contra del tumor, aunque también pueden contribuir a los mecanismos de inmunosupresión, en tumores establecidos, mediante la producción de citocinas (Grivennikov, 2010).

Quimiocinas

Las quimiocinas son citocinas quimotácticas que regulan la migración de leucocitos en condiciones fisiológicas basales y bajo condiciones inflamatorias. Las células dendríticas inmaduras expresan un perfil único de receptores de quimiocinas *i. e.*, CCR1, CCR2, CCR5, CCR6. Estos receptores tienen por ligandos quimiocinas inflamatorias, entre ellas, CCL5, CCL2, CCL3, CCL4 y CCL20. Además, las DC inmaduras expresan el receptor CXCR4, cuyo ligando es el factor derivado del estroma (SDF-1/CXCL12), una quimiocina que es expresada constitutivamente en tejidos linfoides y no linfoides. (Sozzani, 2005 y 2007).

El SDF y su receptor CXCR4, han sido estudiados en varios tipos de cáncer, incluido el carcinoma pulmonar de células no pequeñas, en los que se ha reportado que el eje CXCR4/CXCL12 está involucrado en la regulación de la metástasis (Phillips, 2003) y en la diseminación de células tumorales en el espacio pleural (Oonakahara, 2004).

También se ha reportado que los linfocitos T migran a favor de un gradiente de SDF de baja concentración, mientras que las concentraciones altas de este factor, como las observadas en médula ósea y en el timo, inducen quimio-repulsión (Poznansky, 2000 y 2002). Según Wald, la capacidad migratoria de las células NK, en respuesta al SDF, es menor que la de los linfocitos T CD8⁺, siendo las células CD4⁺ las que poseen mayor capacidad migratoria en respuesta a este factor *in vivo* (Wald, 2006) Lo anterior pone de manifiesto el papel preponderante por las quimiocinas en la configuración del infiltrado inflamatorio de los tumores sólidos.

CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las células dendríticas (DC) son una familia de células especializadas en la presentación de antígenos (APC) e integran una red de vigilancia para la detección de virus, bacterias, tejido dañado e inflamación. Para efectuar estas tareas, las DC emplean sus receptores reconocedores de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), así como sus receptores para patrones moleculares asociados a daño celular (DAMPs) (Re, 2004).

Las DC adquieren antígenos mediante rutas endocíticas diferentes: fagocitosis, macropinocitosis, micropinocitosis y endocitosis mediada por receptor (e.g., complejos antígeno-anticuerpo vía FcRs o lectinas tipo C) (Robson, 2010). De esta manera, las DC endocitan antígenos exógenos en los endosomas y /o fagosomas y pueden procesarlos para su presentación, asociados con moléculas del MHC clase II, a los linfocitos T CD4⁺. Alternativamente, estos antígenos pueden ser translocados en el citosol de manera que entren a la ruta de procesamiento de MHC clase I para su presentación cruzada a los linfocitos T CD8⁺ específicos de tumor (Savina, 2007; Robson, 2010), lo cual es una condición indispensable para el reconocimiento de los péptidos presentados por las células tumorales. Además, la generación de linfocitos T cooperadores (Th) CD4⁺ y citotóxicos CD8⁺ a partir de células T naïve, requiere la activación antígeno-específica por las DC, las cuales proveen las señales coestimuladoras (e.g. CD40, CD80 y CD86) y citocinas (e.g. IL-12p70) necesarias para dicha activación (Robson, 2010). La actividad citolítica de las células NK puede ser potenciada por contacto con las DC locales; a su vez, las células NK activadas contribuyen a la maduración de las DC, condición necesaria para la estimulación de células T naïve en los ganglios linfáticos (Ullrich, 2008).

ANTECEDENTES

En 1863 Rudolf Virchow observó linfocitos en el tejido neoplásico e hizo una asociación entre inflamación y cáncer, sugiriendo que el “infiltrado reticular” reflejaba el origen del cáncer en sitios de inflamación crónica (Balkwill, 2001). En los últimos años se ha efectuado un sinnúmero de estudios enfocados a la caracterización de los linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) y a establecer relaciones entre éstos y la esperanza de vida del paciente (Drescher, 2005). En este sentido, los tipos de cáncer más estudiados han sido: cáncer colorectal (Ohtani, 2007) melanoma (Darryl, 2009), cáncer de vejiga (Liakou, 2007), cáncer de cuello y cabeza (Uppaluri, 2008), glioma (Dunn, 2007) y carcinomas pulmonares (Watanabe, 1983; Johnson, 2000; Konishi, 2004; Wald, 2006; Esendagli, 2008; Ruffini, 2009).

En carcinomas pulmonares se ha reportado que la densidad de población de TILs es variable, dependiendo del histotipo y grado de diferenciación (Watanabe, 1983; Ruffini, 2009); que la principal especie infiltrante son linfocitos T CD8+, los cuales son escasos, en comparación con el tejido sano, y que éstos se hallan dispersos en el área tumoral, encontrándose preferentemente en el margen de invasión del tumor.

La escasez de TILs en el área intratumoral ha sido asociada, entre otras cosas, con la expresión de B7-H1 (PD-L1) por las células tumorales y la expresión de PD-1 en los TILs. Konishi ha reportado la existencia de una relación inversa entre B7-H1 y el número de TILs. (Konishi, 2004).

También se ha reportado que el número de células NK en el tumor es menor que en el tejido sano. En un estudio realizado en adenocarcinomas pulmonares por Esendagli, se reportó que las células NK se encuentran excluidas del tejido maligno, encontrándose predominantemente en el tejido no maligno (Esendagli, 2008). Este hallazgo es consistente con las observaciones hechas por otros autores en carcinomas pulmonares de células no pequeñas (Watanabe, 1983; Wald, 2006). De hecho, en un trabajo realizado por Johnson et al., quien tomando como criterio el número de células positivas por campo de alta magnificación (HPF) para clasificar los tumores como altamente y pobremente infiltrados, debido a la

escasez de células NK sólo aplica el criterio de ausencia o presencia, mientras que para los linfocitos T, CD3⁺ y CD8⁺, una densidad < a 10 células/HPF se considera baja, mientras que una densidad ≥ 10 células/HPF es considerada alta. Para las células dendríticas, una densidad < 5 células/HPF es baja y una densidad ≥ 5 células/HPF se considera como alta (Johnson, 2000). Aun cuando este autor no encuentra ninguna correlación entre el número de DC, y linfocitos T o células NK, es claro que el grado de infiltración por estas células varía notablemente.

La variabilidad en densidad de DC, ha sido reportada por Kurabayashi, quien asoció la densidad de población de estas células con la cantidad de células tumorales en apoptosis (Kurabayashi, 2004), y por Inoshima, quien reportó una relación inversa entre el VEGF y DCs, y una relación directa de este factor de crecimiento con la densidad microvascular (Inoshima, 2002).

También se ha reportado que las células dendríticas infiltrantes de tumores pulmonares de células no pequeñas se encuentran en estado inmaduro (Perrot, 2007). Cabe mencionar que este autor realizó su estudio por citometría de flujo, no obstante, nuestro grupo de investigación ha podido constatar lo reportado por Perrot empleando inmunohistoquímica.

En síntesis, la densidad celular de las células infiltrantes del tumor, así como su distribución y relación con diversos factores microambientales ha sido estudiada por varios autores. Sin embargo, no existen estudios que relacionen la densidad de células dendríticas con la capacidad citolítica de las células citotóxicas del infiltrado inflamatorio. Cabe mencionar que aun cuando la mayoría de los trabajos citados han empleado inmunohistoquímica para sus determinaciones, ninguno ha empleado el doble marcaje inmunohistoquímico en cortes seriados, lo cual es uno de los aspectos relevantes del presente trabajo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México, como en todo el mundo, el cáncer es un problema de salud pública debido sus altas tasas de morbilidad y mortalidad (Jemal, 2011). En los últimos años, los linfocitos infiltrantes de tumor han sido materia de estudios realizados con la intención comprender los mecanismos naturales de control, usados por el huésped, y explotarlos en el desarrollo de estrategias inmunoterapéuticas efectivas para la erradicación del tumor. La gran mayoría estos trabajos se han centrado en: la distribución de las células del sistema inmune con respecto al tumor; la densidad de población de estas células; y en las relaciones existentes entre las células infiltrantes con quimiocinas, citocinas y factores de crecimiento. En cualquier caso, la relación de estas variables con la esperanza de vida del paciente, ha sido el tema central; sin embargo, no hay estudios que hayan analizado *in situ*, la capacidad citolítica de las células citotóxicas infiltrantes del tumor y la relación de estas células con las células dendríticas infiltrantes del tumor.

Recientemente, nuestro grupo de trabajo ha reportado que en el líquido pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar hay un alto porcentaje de células con fenotipo de memoria y un bajo porcentaje con fenotipo efector, y de la subpoblación de CTLs, sólo un pequeño porcentaje expresan perforina (Prado-García, 2005). Este conocimiento nos permite inferir que en los adenocarcinomas pulmonares *in situ*, el comportamiento de las células potencialmente citotóxicas (CTLs y NK), en cuanto a la expresión de las proteínas citolíticas granzima B y perforina, podría ser similar a lo observado en el líquido pleural. El presente estudio fue diseñado para explorar esta posibilidad en adenocarcinomas pulmonares *in situ* y, de esta manera, contribuir al conocimiento de la biología de los adenocarcinomas pulmonares en el marco de la inmunoterapia.

HIPÓTESIS.

Si la la densidad de población y/o la expresión de proteínas citolíticas en las células citotóxicas están determinadas por la densidad de población de células dendrítica infiltrantes del tumor, entonces estos parámetros serán diferentes en tumores con diferente grado de infiltración por células dendríticas.

OBJETIVO.

Investigar si las células dendríticas infiltrantes de tumor guardan alguna relación con la densidad de población celular, distribución espacial y/o la expresión de proteínas citotóxicas, de los linfocitos T y células NK presentes en el infiltrado inflamatorio de adenocarcinomas pulmonares *in situ*.

TIPO DE INVESTIGACIÓN.

Se realizó una investigación observacional, retrospectiva y transversal El trabajo se realizó en el Laboratorio de Cáncer Pulmonar en colaboración con el Departamento de Patología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) Ismael Cosío Villegas. El material biológico empleado fue cortes histológicos seriados embebidos en parafina, provenientes de autopsias de pacientes fallecidos por adenocarcinoma pulmonar. El tamaño de la muestra fue de 8 casos. Las variables bajo estudio fueron: la densidad de población celular y localización –intratumoral o peritumoral– de las células dendríticas, linfocitos T citotóxicos y células NK, así como la expresión de las proteínas granzima B, perforina, TIA-1 y CD45RO.

DISEÑO EXPERIMENTAL.

Síntesis del proyecto:

El objetivo de este estudio fue investigar si las células dendríticas infiltrantes de tumor (TIDC) guardan alguna relación con la densidad de linfocitos infiltrantes del tumor, con su distribución y/o la expresión de gránulos y proteínas citolíticas de los CTLs y células NK presentes en el infiltrado inflamatorio de adenocarcinomas pulmonares. Para lograr este objetivo, se fenotipificaron –mediante tinción inmunohistoquímica– las poblaciones celulares presentes en el infiltrado inflamatorio, así como las células positivas para proteínas citotóxicas. Las células positivas para cada marcador fueron cuantificadas en micrografías fotónicas adquiridas a un aumento de 40x y se determinó su número en la región circundante al tumor (peritumoral) y en el nido tumoral (intratumoral).

MATERIALES Y MÉTODOS.

Material biológico.

El material biológico empleado consistió en tumores pulmonares tipo adenocarcinoma provenientes de autopsias (21 casos) practicadas en el INER, del año 1985 al año 2000. En este material, embebido en parafina, se realizaron cortes histológicos seriados con un espesor de 4 μm , en los cuales se examinó el contenido de células dendríticas. Con base en esto, la muestra se estratificó en dos grupos, referidos en este trabajo como: a) tumores con alto grado de células dendríticas infiltrantes del tumor (TIDCs) (≥ 10 DCs/por campo de alta magnificación [HPF]) y b) tumores con bajo grado de TIDCs (< 10 DCs/HPF). De cada grupo se seleccionaron 4 casos para investigar la relación que guarda la densidad de población de las TIDCs con la densidad de población, localización y producción de granzima y perforina de las citotóxicas.

Anticuerpos

La inmunofenotipificación de las poblaciones celulares presentes en el infiltrado inflamatorio se hizo mediante tinción inmunohistoquímica doble, mientras que para la identificación de proteínas citotóxicas se empleó la tinción inmunohistoquímica simple; en ambos casos se empleó el método de inmunoperoxidasa. El panel de anticuerpos empleado, así como las condiciones estandarizadas se muestran en la tabla 3

Los anticuerpos empleados para la inmunofenotipificación fueron:

Anticuerpo monoclonal (mAb) contra la proteína S-100 (CMC717; clona 4C4; Cell Marque USA) presente en células dendríticas; mAb contra la cadena épsilon (ϵ) del complejo CD3 (CM110A; Biocare Medical CA) presente en linfocitos T; mAb contra el antígeno CD57 (CBL519B; Chemicon International) presente en células NK; anticuerpo policlonal contra la molécula CD8 (ab4055-500; abcam Cambridge) presente en la superficie celular de los linfocitos T citotóxicos; mAb contra el antígeno leucocitario de superficie CD45RO (CBL 132; clon UCHL1; Chemicon) presente en la subpoblación de linfocitos T con fenotipo de memoria.

Para identificar las células productoras de proteínas citotóxicas se emplearon los siguientes marcadores: mAb contra el antígeno intracitoplásmico de células T ([TIA-1/GMP-17], CM130A; Biocare Medical) presente en la membrana de los gránulos portadores de proteínas citotóxicas; mAb contra perforina (VP-P967; clon 5B10; vector), proteína formadora de poros citolíticos, marcador específico de células citotóxicas efectoras; mAb contra la serin-proteasa granzima B humana, presente en las células NK y linfocitos T citotóxicos activados.

Anticuerpos secundarios

Los anticuerpos antes mencionados, con excepción del anti-CD8, son hechos en ratón, razón por la cual se empleó un anticuerpo biotinilado hecho en conejo como anticuerpo secundario, mientras que para el anti-CD8, el cual está hecho en conejo, se empleó un anticuerpo biotinilado hecho en cabra.

Como sistema amplificador se utilizó el complejo Estrepto-Avidina-Biotina-peroxidasa (StreptABComplex; Dako Corporation; Carpinteria, CA). El sistema revelador en las tinciones simples contenía peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como sustrato y tetrahidrocloruro de 3,3'diaminobenzidina (DAB) como cromógeno, mientras que en las tinciones dobles, el segundo estrato se reveló con un kit de vector (VIP substrate Kit for Peroxidase SK-4600; Vector Lab. Inc., USA) siguiendo las instrucciones del productor.

Tabla 3. PANEL DE ANTICUERPOS Y CONDICIONES DE USO ESTANDARIZADAS *								
Ac. Prim.	CD3	CD8	CD57	S-100	CD45RO	TIA-1	GrB	Perf.
Dilución	1:100	1:60	1:50	1:60	1:80	1:80	1:60	1:30
Incubación**	18	18	18	18	18	18	18	18
Temperatura	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C
Ac. Sec.	RαM	GαR	RαM	RαM	RαM	RαM	RαM	RαM
Dilución	1:250	1:250	1:250	1:250	1:250	1:250	1:250	1:250
Incubación*	1	1	1	1	1	1	1	1
Temperatura	32°C	1:250	1:250	1:250	1:250	1:250	1:250	1:250
Complejo	ABC	ABC	ABC	ABC	ABC	ABC	ABC	ABC
Dilución	1:150	1:150	1:150	1:150	1:150	1:150	1:150	1:150
Incubación**	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Temperatura	32°C	32°C	32°C	32°C	32°C	32°C	32°C	32°C

*Las condiciones de reactivación de epítopes y protocolo de tinción inmunohistoquímica se detallan en el anexo I.

**Tiempo en horas.

Muestreo.

Partiendo de una muestra de 21 casos, de los cuales 12 presentaron una alta la densidad de DCs (≥ 10 DCs S-100⁺/HPF) y 9 presentaron una baja densidad de DC (> 10 DCs S-100⁺/HPF), la muestra fue estratificada en dos grupos:

- a) tumores con alto grado de TIDCs y
- b) tumores con bajo grado de TIDC.

De cada grupo se seleccionaron 4 casos considerados “informativos” (ver más abajo). En cada caso, 8 cortes histológicos seriados fueron teñidos inmunohistoquímicamente con un panel de 8 diferentes marcadores.

El criterio para seleccionar un campo para su exploración fue la presencia de células dendríticas en el tumor.

Una vez seleccionado el campo se hizo un seguimiento del mismo, localizándolo en los cortes seriados subsecuentes, para evaluar las células positivas para cada uno de los marcadores empleados.

Se analizaron y fotografiaron entre 15 y 20 campos por cada marcador en cada caso.

Se consideró como “campo informativo” aquel en el que fue posible su seguimiento, a través de los cortes seriados, y la obtención de información de la serie completa de marcadores.

Los campos en los que no fue posible el seguimiento se consideraron “no informativos y fueron excluidos del análisis.

En el grupo de adenocarcinomas con alto grado de TIDC (n = 4) se evaluaron 46 campos informativos; mientras que en el grupo de adenocarcinomas con bajo grado de TIDC (n = 4) se evaluaron 34 campos.

Cuantificación de células positivas.

Los resultados obtenidos luego de la tinción inmunohistoquímica fueron evaluados por tres observadores diferentes empleando un microscopio óptico marca Leica, modelo CME (Leica microsystems Inc., Buffalo New Cork, USA) a una magnificación de 40X. Con base en su localización, las células positivas se definieron como intratumorales –si estaban presentes en el interior del nido tumoral– y peritumorales –si se encontraban distribuidas en la periferia del tumor (Naito, 1998).

Las medidas de resumen en que se muestran los resultados son la media aritmética y desviación estándar del número de células positivas por campo de alta magnificación (células⁺ /HPF).

Análisis estadístico.

En este estudio se realizó un análisis comparativo de la densidad de población celular (intratumoral o peritumoral) entre dos grupos: adenocarcinomas con alto grado de TIDCs (n = 4) y adenocarcinomas con bajo grado de TIDCs (n = 4). La prueba de hipótesis utilizada fue la prueba t de "Student", con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

Las variables analizadas fueron:

- a) densidad de población de células dendríticas S-100⁺,
- b) densidad de población de linfocitos T CD3⁺.
- c) densidad de población de linfocitos T citotóxicos CD8⁺.
- e) densidad de población de células T de memoria, CD45RO⁺
- f) densidad de población de células NK, CD57⁺
- g) densidad de población de células citotóxicas (CTLs CD8⁺ y NK CD57⁺).
- h) densidad de población de células citotóxicas con gránulos citolíticos TIA-1⁺
- i) densidad población de células citotóxicas perforina⁺
- j) densidad de población de células citotóxicas granzima B⁺.

RESULTADOS

Células dendríticas infiltrantes de tumor

En el presente trabajo se analizaron adenocarcinomas pulmonares en los que se observó que la densidad de población células dendríticas infiltrantes de tumor (TIDCs) es variable, habiendo tumores con alto grado y tumores con bajo grado de TIDCs (figura 1A y 1B). En los tumores con alto grado de TIDCs, la mayor parte las DCs se encuentran concentradas en la región intratumoral ($p < 0.05$); en cambio, en los tumores con bajo grado de TIDCs, las DCs se encuentran igualmente distribuidas en las regiones intratumoral y peritumoral ($p > 0.05$) (Tabla 4).

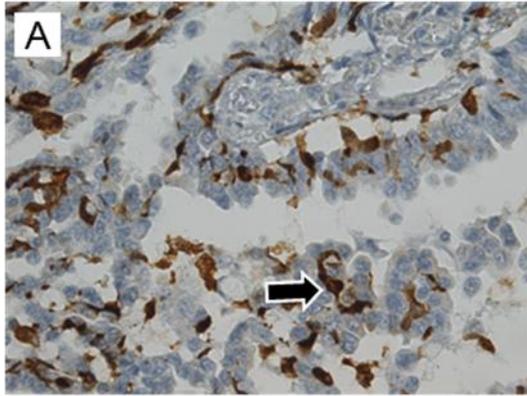
TABLA 4. CÉLULAS DENDRÍTICAS INFILTRANTES DE TUMOR EN ADENOCARCINOMAS PULMONARES				
	TOTALES*	PERITUMORAL*	INTRATUMORAL*	p
ALTO TIDC n = 46	15.54 ± 9.4	6.04 ± 5.3	9.5 ± 9.1	< 0.05
BAJO TIDC n = 34	5.74 ± 3.9	3.15 ± 2.9	2.58 ± 2.7	>0.05
p	<0.05	<0.05	<0.05	

*Promedio y desviación estándar de la densidad de población celular.

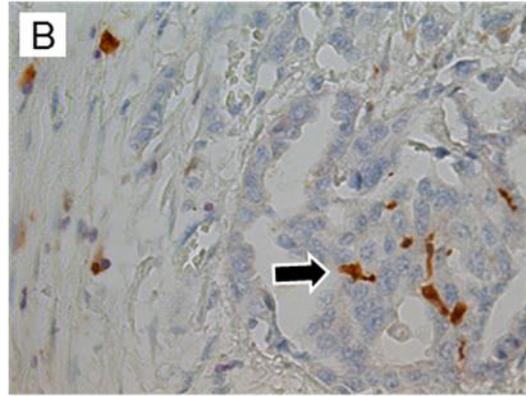
El estado de maduración de las DCs ha sido estudiado en varios tipos de carcinomas (Middel, 2010; Sandel, 2005; Bell, 1999), incluyendo adenocarcinomas pulmonares (Inoshima, 2002; Perrot, 2007). Estos trabajos coinciden en que las DCs que infiltran el tumor se encuentran en estado inmaduro. Nosotros, al igual que estos autores, observamos –en cortes seriados– que la mayoría de las células dendríticas positivas para S-100, también son positivas para el marcador CD1a, lo cual implica que estas células se encuentran en estado inmaduro, indistintamente de su localización o del grado de infiltración (figuras 1C a 1F).

Alto grado de TIDC

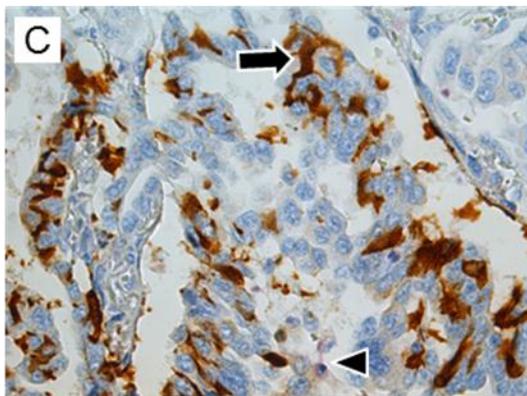
Bajo grado de TIDC



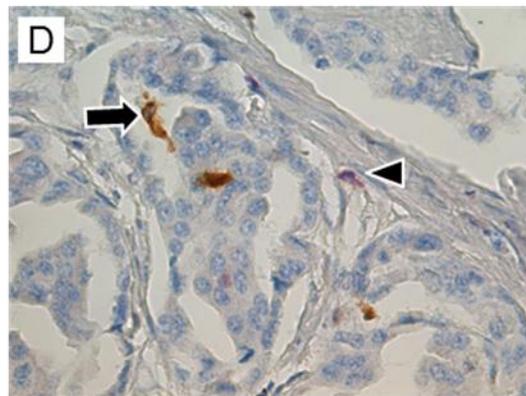
S-100



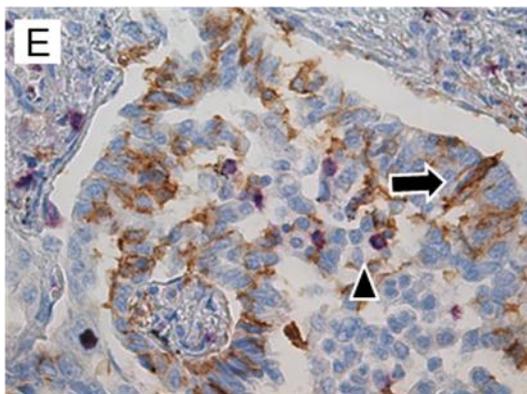
S-100



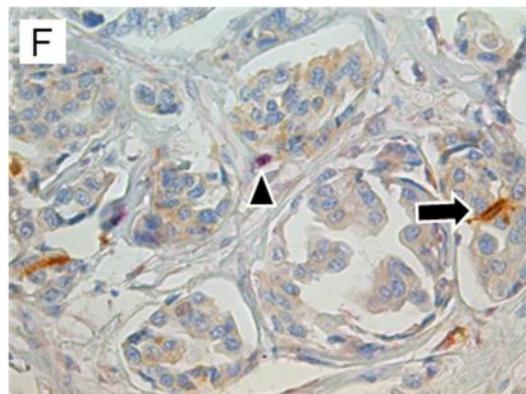
S-100/CD8



S100/CD8



CD1a/CD8



CD1a/CD8

Figura1. Micrografías fónicas de adenocarcinomas pulmonares con alto (A) y bajo (B) grado de TIDC. C y D células dendríticas totales (maduras e inmaduras); E y F, células dendríticas inmaduras. A y B tinción inmunohistoquímica simple; C a F, tinción inmunohistoquímica doble en las que las flechas señalan células dendríticas (color café), y las cabezas de flecha indican linfocitos T citotóxicos (color violeta). Inmunoperoxidasa. 40X.

Densidad de y localización de células citotóxicas infiltrantes.

La densidad de las células citotóxicas (CTLs y NK) presentes en el infiltrado inflamatorio de los adenocarcinomas con alto grado de TIDCs fue significativamente mayor que la de los adenocarcinomas con bajo grado de TIDCs ($p < 0.05$); esta condición se debe a que, tanto en los adenocarcinomas con alto grado como en los de bajo grado de TIDC, los linfocitos T citotóxicos representan el 87% y 81%, respectivamente, de la población citotóxica y, como puede observarse en la tabla 5, la diferencia en densidad de población de esta especie celular, es significativamente mayor en los adenocarcinomas con alto grado de TIDC ($p < 0.05$), mientras que la densidad de población de células NK es igual en ambos grupos (Tabla 5).

TABLA 5. CÉLULAS CITOTÓXICAS PERITUMORALES EN ADENOCARCINOMAS PULMONARES CON ALTO Y BAJO GRADO DE TIDC			
	CITOTÓXICAS*	CTL*	NK*
ALTO TIDC	26.9	23.4	3.5
n = 46	± 17.5	± 16.0	± 5.4
BAJO TIDC	14.9	12.2	2.7
n = 34	± 12.4	± 10.8	± 3.5
P	< 0.05	<0.05	>0.05

*Promedio y desviación estándar de la densidad de población celular. CTL, linfocitos T citotóxicos; NK, células citotóxicas naturales.

Densidad de población de células citotóxicas peritumorales.

El análisis individual de las especies celulares citotóxicas, en cuanto a su localización, nos muestra que la distribución de las células NK es similar en las regiones intratumoral y peritumoral, tanto en los adenocarcinomas con alto grado de TIDC, como en los adenocarcinomas con bajo grado

(Tabla 6). De acuerdo con lo anterior puede inferirse que, en los adenocarcinomas pulmonares, el grado de TIDC no influye en la densidad de población ni en la distribución de las células NK, mientras que la densidad de población de CTLs tiende a variar con el grado de infiltración de células dendríticas (Tablas 5, y 6; figura 2). Esta última afirmación se basa en el hecho de que –tal como sucede con la densidad de células dendríticas– la densidad de linfocitos T citotóxicos, localizados en la región peritumoral de los adenocarcinomas con alto grado de TIDC, es significativamente mayor que la densidad de población de linfocitos T citotóxicos presentes en la región peritumoral de los adenocarcinomas con bajo grado de TIDC.

Densidad de población de células citotóxicas intratumorales.

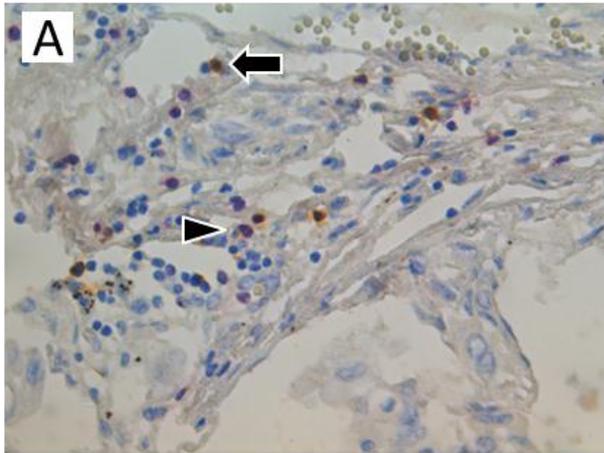
La densidad de células citotóxicas localizadas en la región intratumoral es estadísticamente igual en los adenocarcinomas con alto y bajo grado de TIDCs (tabla 6), lo cual sugiere que la infiltración de células citotóxicas al nido tumoral es independiente de la densidad de células dendríticas intratumorales.

TABLA 6. CÉLULAS CITOTÓXICAS POR REGIÓN EN ADENOCARCINOMAS PULMONARES CON ALTO Y BAJO GRADO DE TIDC				
	PERITUMORAL *		INTRATUMORAL *	
	CTL	NK	CTL	NK
ALTO TIDC n = 46	23.4 ± 16.0	3.5 ± 5.4	1.13 ± 1.6	0.96 ± 1.4
BAJO TIDC n = 34	12.2 ± 10.8	2.7 ± 3.5	2.06 ± 3.1	0.62 ± 1.2
p	< 0.05	>0.05	>0.05	>0.05

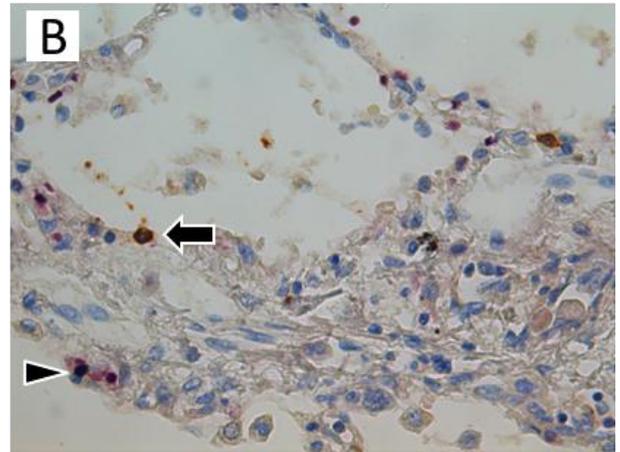
*Promedio y desviación estándar de la densidad de población celular. CTL, linfocitos T citotóxicos. NK, células citotóxicas naturales.

Alto grado de TIDC

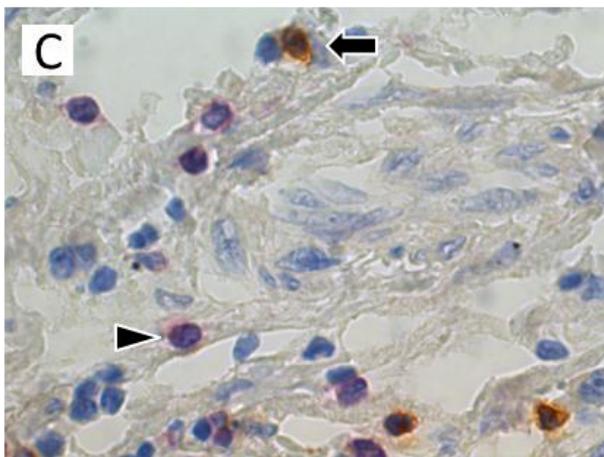
Bajo grado de TIDC



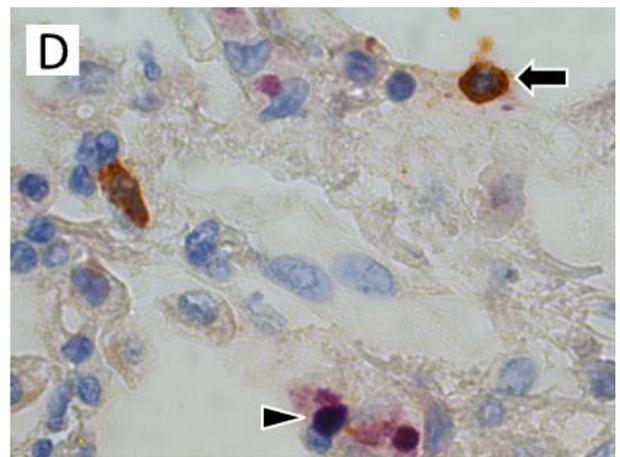
CD57/CD8



CD57/CD8



CD57/CD8



CD57/CD8

Figura 2. Células citotóxicas en adenocarcinomas pulmonares con alto (A y C) y bajo (B y D) grado de células dendríticas infiltrantes de tumor (TIDC). Las flechas señalan células NK (color café) y las cabezas de flecha indican linfocitos T citotóxicos (CTLs, color violeta). Nótese que la abundancia de CTLs es mayor en los tumores con alto grado de TIDC, mientras que las células NK, son escasas en ambos grupos. Inmunoperoxidasa. A y B 40X; C y D 100X.

Linfocitos infiltrantes de tumor

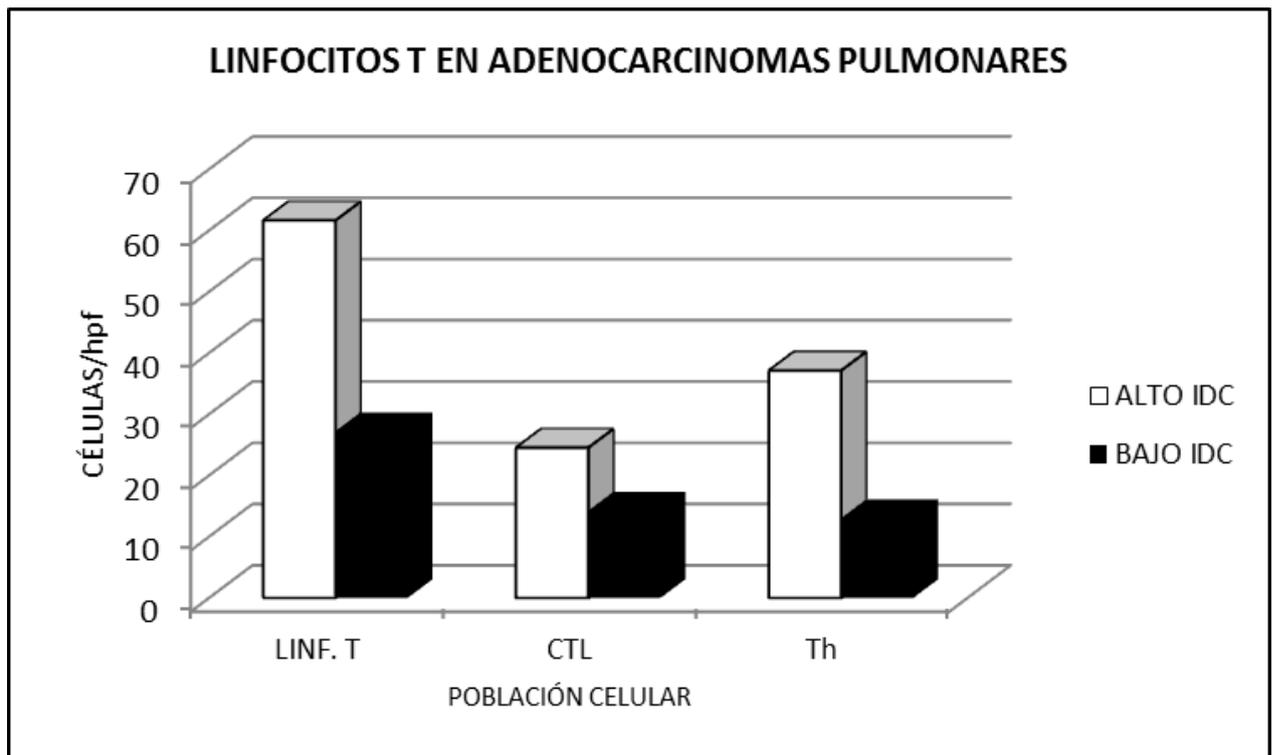
En nuestro estudio encontramos que los adenocarcinomas altamente infiltrados por células dendríticas, la densidad de población celular de linfocitos T, T citotóxicos y T cooperadores, es significativamente mayor que en los adenocarcinomas de baja infiltración (Tabla 6, gráfica 1).

La densidad de población celular de linfocitos T CD3⁺ fue 61.53 ± 53.10, en los adenocarcinomas altamente infiltrados, y 27.24 ± 17.84 en los de baja infiltración (p<0.05), mientras que la densidad celular promedio de linfocitos T citotóxicos CD8⁺ en los adenocarcinomas con alto grado de TIDC fue de 24.52 ± 16.26; esta cifra representa el 40% de las células T CD3⁺, por lo que puede inferirse que el 60% restante corresponde a la proporción de linfocitos T cooperadores. Asimismo, la densidad de población celular de CTL en los adenocarcinomas con bajo grado de TIDC fue de 14.24 ± 10.42, lo cual representa el 52% de las células T totales y nos permite inferir que el 48% restante corresponde a linfocitos T cooperadores.

Con los datos anteriores calculamos la razón CD4⁺/CD8⁺, encontrando que, en los adenocarcinomas con alto grado de TIDC, es de 1.5; mientras que en los de bajo grado, es de 0.9. Esto implica que en los adenocarcinomas altamente infiltrados, los linfocitos T cooperadores son más abundantes que en los de bajo grado de infiltración.

TABLA 6. DENSIDAD DE POBLACIÓN CELULAR DE LINFOCITOS T EN ADENOCARCINOMAS PULMONARES				
	LINFOCITOS*			P
	T	CTL	Th	
ALTO TIDC	61.6	24.5	37.1	< 0.05
n = 46	± 53.1	± 16.3	± 50.0	
BAJO TIDC	27.2	14.2	13.0	< 0.05
N = 34	± 17.8	± 10.4	± 19.7	
P	< 0.05	< 0.05	< 0.05	

*Promedio y desviación estándar de la densidad de población celular. T, linfocitos T CD3⁺; CTL, linfocitos T citotóxicos CD8⁺; Th, linfocitos T.



Gráfica 1. Densidad de población celular de linfocitos T en adenocarcinomas pulmonares con alto y bajo grado de TIDC. Linf. T, linfocitos T CD3⁺; CTL, linfocitos T citotóxicos CD8⁺; Th, linfocitos T cooperadores.

TABLA 7. LINFOCITOS T CON FENOTIPO DE MEMORIA EN ADENOCARCINOMAS PULMONARES			
	LINFOCITOS T*		RELACIÓN
	CD3 ⁺	CD45RO ⁺	CD45RO ⁺ /CD3 ⁺
ALTO TIDC n = 46	59.3 ± 52.4	56.5 ± 40.7	95.2 %
BAJO TIDC n = 34	24.5 ± 17.5	18.3 ± 17.2	74.7 %
p	< 0.05	< 0.05	

*Promedio y desviación estándar de la densidad de población celular.

Estado de diferenciación de los linfocitos T

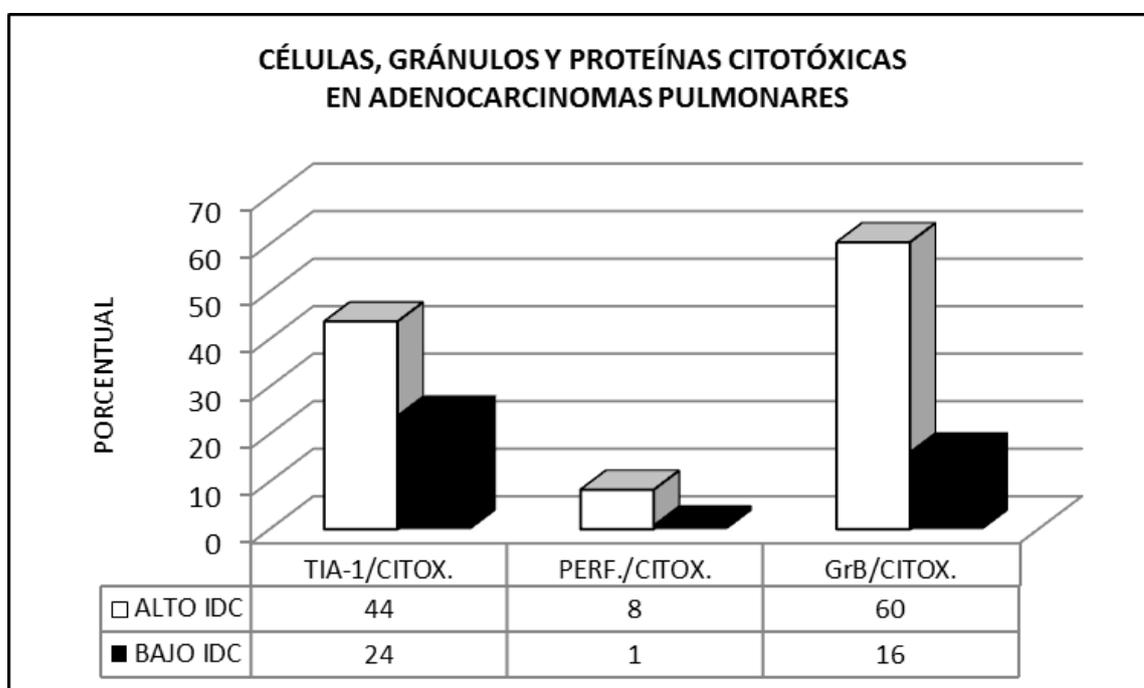
Una observación interesante en este trabajo es que la mayoría (92%) de los linfocitos T, presentes en la región peritumoral de los adenocarcinomas con alto grado de TIDC, son positivos para el marcador de memoria CD45RO⁺, mientras que en los de bajo grado de TIDC, sólo el 74% de los linfocitos T resultaron positivos para este marcador (tabla 8). Esto implica que los linfocitos presentes en el infiltrado inflamatorio, no sólo difieren en densidad de población, sino también en el estado de maduración (figura 3 A y B), Debido a que los linfocitos negativos para CD45RO, pueden ser de memoria efectora terminalmente diferenciados (T_{EMRA}), –caracterizados por la alta producción perforina–, en este trabajo cuantificamos la densidad de población de células positivas para granzima, perforina y gránulos citotóxicos (Figura 3). Los resultados se muestran en la tabla 8, en la que puede observarse que la densidad de población de células positivas para gránulos o proteínas citotóxicas –en la región peritumoral–, es estadísticamente igual en los adenocarcinomas con alto y bajo grado de TIDCs. En la región intratumoral, por el contrario, aun cuando la densidad celular de células citotóxicas no refleja diferencia, la densidad de células positivas para granzima B es mayor en los adenocarcinomas con alto grado de infiltración por células dendríticas (Tabla 8). Cabe notar que la densidad de células positivas para perforina es prácticamente nula en ambos grupos (Figura 3 G y H). La representación gráfica de los resultados descritos para la región intratumoral se muestran en la gráfica 2, en la que puede observarse que el porcentaje de células citotóxicas potencialmente positivas para granzima B, es mayor en los adenocarcinomas con alto grado de TIDC.

En síntesis: en los adenocarcinomas con alto grado de TIDC, la densidad de población de linfocitos T, células citotóxicas y células dendríticas es mayor que en los de bajo grado; la densidad de población de células NK es independiente del grado de Infiltración y la población de células citotóxicas, Granzima B⁺, intratumorales es mayor en los adenocarcinomas con alto grado de TIDC.

**TABLA 8 CÉLULAS, GRÁNULOS Y PROTEÍNAS CITOTÓXICAS
EN ADENOCARCINOMAS PULMONARES**

	PERITUMORAL*				INTRATUMORAL*			
	CITOX.	TIA-1	Gr B	PERF.	CITOX.	TIA-1	Gr B	PERF.
ALTO n = 46	26.9 ± 17.5	6.5 ± 9.3	3.00 ± 3.03	0.15 ± 0.63	2.09 ± 2.25	0.9 ± 1.3	1.26 ± 2.16	0.17 ± 0.53
BAJO n = 34	14.9 ± 12.4	3.9 ± 3.2	2.47 ± 3.15	0.06 ± 0.02	2.06 ± 3.72	0.6 ± 1.0	0.44 ± 0.75	0.03 ± 0.17
p	< 0.05	>0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	< 0.05	> 0.05

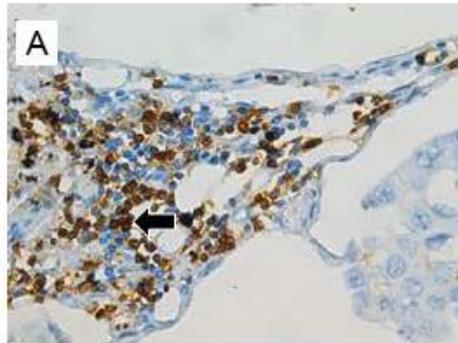
*Promedio y desviación estándar de la densidad de población celular. CITOX, células citotóxicas. TIA-1, antígeno intracelular de células T; PERF., perforina; GrB, granzima B.



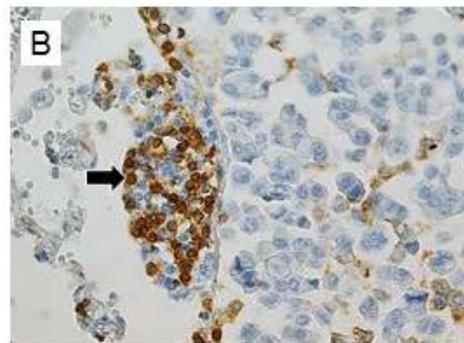
Gráfica 2. Relación de células citotóxicas con células positivas para proteínas y gránulos citotóxicos. CITOX, células citotóxicas; TIA-1, antígeno intracelular de células T; PERF., perforina; GrB, granzima B.

Alto grado de TIDC

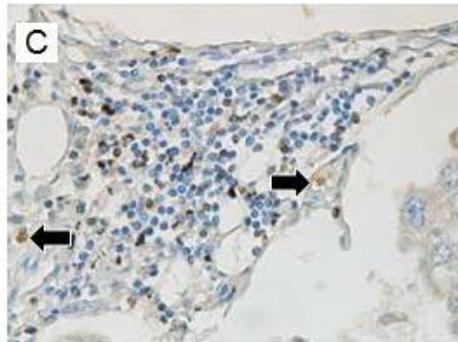
Bajo grado de TIDC



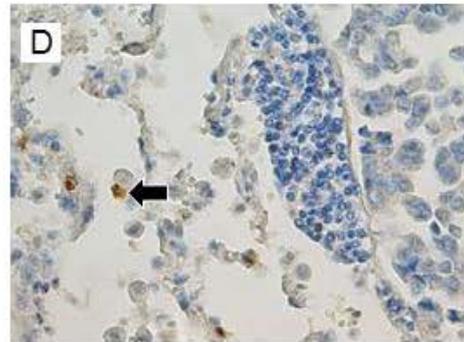
CD45RO



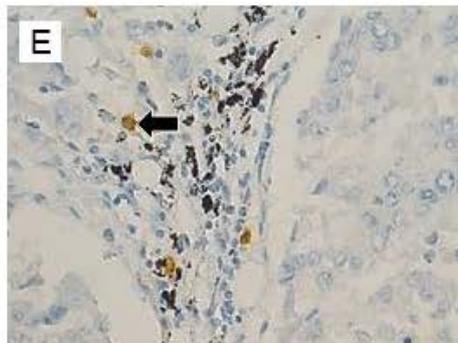
CD45RO



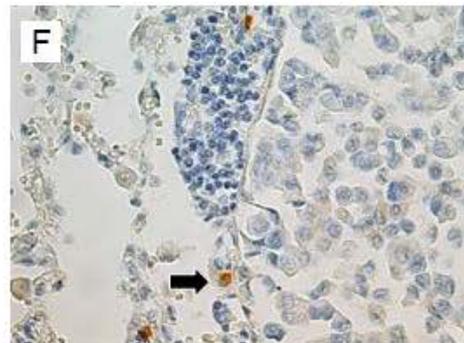
TIA-1



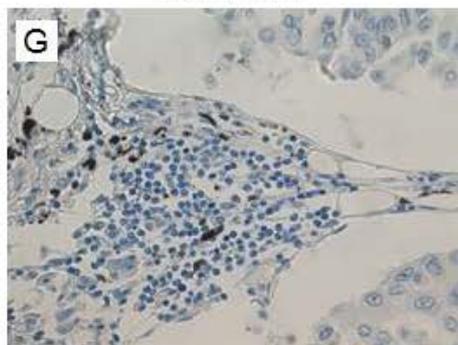
TIA-1



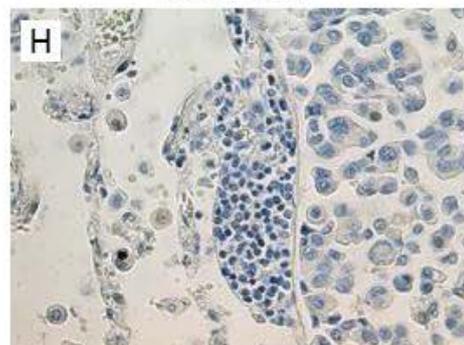
GRANZYMA B



GRANZYMA B



PERFORINA



PERFORINA

Figura 3. Proteínas y gránulos citotóxicos en cortes seriados de adenocarcinomas pulmonares. Inmunoperoxidasa. 40X.

DISCUSIÓN.

La mayoría de los estudios sobre el infiltrado inflamatorio de tumores, han sido dirigidos a establecer relaciones entre las células infiltrantes del tumor y la esperanza de vida del paciente; el presente trabajo no versa sobre ese tema, ya que su objetivo fue investigar si las células dendríticas infiltrantes de tumor guardan alguna relación con la densidad de población celular y/o la capacidad citolítica de las células citotóxicas (linfocitos T citotóxicos y células NK) infiltrantes de los adenocarcinomas pulmonares.

Densidad de población de células dendríticas

En los adenocarcinomas pulmonares estudiados nosotros observamos que la densidad de población de TIDCs es variable, habiendo tumores con alto grado y tumores con bajo grado de TIDCs. Este resultado es consistente con lo reportado por otros autores en carcinomas pulmonares de células no pequeñas. En este sentido, Inoshima ha reportado que en los adenocarcinomas pulmonares, cerca del 50% de los tumores presentan un alto grado de TIDCs (> 20 DC S-100⁺/HPF), y en el 50% restante, son tumores con bajo grado de TIDC (≥ 20 DC S-100⁺/HPF) (Inoshima, 2002). Esta observación es avalada por el grupo de Kurabayashi, quien, empleó un punto de corte de 10 DC S-100⁺/HPF para estratificar su muestra en tumores con alto y bajo grado de TIDCs. Este autor reporta, además, que la densidad de TIDCs, S-100⁺, en el nido tumoral es significativamente mayor que la densidad de estas células en el estroma, (Kurabayashi, et al., 2004).

Nuestros resultados en relación a la proporción de tumores con alto (≥ 10 DCs S-100⁺/HPF) y bajo (< 10 DCs S-100⁺/HPF) grado de TIDCs son similares a los reportados por Inoshima; y en cuanto a la predominancia de TIDCs en el nido tumoral, nosotros hicimos la misma observación que Kurabayashi únicamente en los tumores con alto grado de TIDCs, y observamos adicionalmente que, en los tumores con bajo grado de TIDCs, la densidad de DCs intratumorales y peritumorales no difieren significativamente.

La diferencia en el grado de TIDCs, podría ser explicada por la biodisponibilidad del factor de crecimiento de células endoteliales (VEGF) asociado al proceso angiogénico. Inoshima observó que este factor correlaciona negativamente con la densidad de población de DC en el tumor, y positivamente con la densidad microvascular (MVD) (Inoshima, 2002); de lo cual puede inferirse que los altos niveles de VEGF pueden inhibir la infiltración de DC al tumor. Sin embargo, el grupo de Grunewald ha reportado que –durante el proceso angiogénico– el VEGF induce la expresión perivascular del factor derivado del estroma (SDF/CXCL12), cuya función en el proceso es el reclutamiento y retención de células de la circulación incluidas, las células dendríticas mieloides (Grunewald, 2006). Mientras que el reporte de Inoshima abona la inhibición de la infiltración de DC al tumor por el VEGF, el reporte de Grunewald y otros (Gabrilovich, 1996; 1998) apoyan la retención de estas células en el nido tumoral, merced al efecto del VEGF.

Con base en lo anterior, nosotros consideramos que la diferencia en densidad de población de TIDCs, observada entre los grupos estudiados podrían ser el resultado de diferencias en la biodisponibilidad de factores de crecimiento y quimiocinas asociadas con la angiogénesis, lo cual implica que en tumores del mismo origen histológico, existen diferencias microambientales que afectan no solo la microvascularización sino además, la densidad de población y estado de maduración de las células dendríticas infiltrantes de tumor. Sin embargo, se requieren más estudios para probar esta hipótesis

Estado de maduración de las células dendríticas.

El estado de maduración de las células dendríticas infiltrantes de tumor, ha sido estudiado en carcinomas renales (Middel, 2010), colorectales (Sandel, 2005), de seno (Bell, 1999) y en carcinomas de células no pequeñas (Inoshima, 2002; Perrot, 2007). Se ha reportado que la mayoría de las DC presentes en el nido tumoral se encuentran en estado inmaduro. Nosotros, en un trabajo preliminar observamos que la mayoría de las TIDCs positivas para S-100 también son positivas para CD1a, lo cual

implica que estas células se encontraban en estado inmaduro, lo cual coincide con los reportes previos.

Células citotóxicas infiltrantes: células NK

Se ha reportado que las células NK son escasas en el tejido tumoral de carcinomas pulmonares de células no pequeñas, encontrándose predominantemente en el tejido no maligno. (Watanabe, 1983; Wald, 2006; Esendagli, 2008). Nuestros resultados coinciden con estos reportes, ya que cerca del 80% de las células NK, se localizaron en la región peritumoral de los tumores estudiados. Además, la densidad de población de las células NK no reflejó diferencias significativas entre los grupos con alta y baja infiltración de DCs, ni entre las regiones –peritumoral e intratumoral– de cada grupo. Una posible explicación de la escasa densidad de células NK en el tejido maligno, podría ser la baja capacidad migratoria de las células NK en respuesta a factores secretados por el tumor, tales como el SDF. Según Wald, la sensibilidad de las células NK a esta quimiocina es menor que la de los linfocitos T CD8⁺, siendo las células CD4⁺ las que poseen mayor capacidad migratoria en respuesta a este factor *in vivo* (Wald, 2006). De acuerdo con lo anterior, puede inferirse que el grado de TIDC no influye en la densidad ni en la distribución de las células NK.

Células Citotóxicas infiltrantes: Linfocitos T citotóxicos.

Se ha reportado que de los histotipos de NSCLC, los adenocarcinomas son los que presentan menos CTLs en el nido tumoral (Mori, 2000) y que el número de células CD8⁺ o CD4⁺ peritumorales, es mayor que en el nido tumoral. (Hiraoka, 2006). En este estudio observamos que los linfocitos T CD8⁺, y los T cooperadores, presentan un patrón de distribución similar, encontrándose predominantemente en la región peritumoral. Además, en los adenocarcinomas con alto grado de TIDCs, la densidad de población de linfocitos T es significativamente mayor que la de los adenocarcinomas con bajo grado de TIDCs.

El hecho de que en la región peritumoral de los adenocarcinomas con alto grado de TIDC, la densidad de TILS sea alta, mientras que en los

adenocarcinomas con bajo grado de TIDC, la densidad de TILs sea baja nos permite inferir que el grado de infiltración por células dendríticas está directamente relacionado con la densidad de linfocitos T peritumorales.

El hecho de que los adenocarcinomas con alto grado de TIDC, presenten una mayor densidad de TILs, puede ser explicada por la estrecha relación, fisiológica existente entre DC y linfocitos T, ya que las DC activadas por las células Th inducen la expresión del receptor CD25 en los CTLs antígeno específicas, propiciando la proliferación de estas células en los ganglios linfáticos regionales de donde pueden regresar al sitio del tumor.

Recientemente se ha demostrado en un modelo de ratón, que, las células CD4⁺ participan en la remodelación de las arteriolas que alimentan los ganglios linfáticos regionales, lo cual incrementa la tasa de entrada de células provenientes de la circulación periférica. (Kumamoto, 2011). De esta manera, las células T cooperadoras pueden ser un factor determinante en la densidad de población de los linfocitos T citotóxicos, sin embargo, es necesario realizar más estudios al respecto.

En nuestro estudio encontramos que la razón CD4⁺/CD8⁺, en la región peritumoral de los adenocarcinomas varía con el grado de TIDC. En los tumores con alto grado de TIDC, la razón CD4⁺/CD8⁺ es de 1.5; mientras que en los de bajo grado de TIDCs, es de 0.9. De acuerdo a lo anterior, en los adenocarcinomas con alto grado de TIDCs, hay más linfocitos CD4⁺ que CD8⁺, mientras que en los de bajo grado de TIDCs ambas poblaciones son prácticamente iguales. Los valores reportados para esta variable en carcinomas pulmonares de células no pequeñas son de 1.4 y 1.5, y en adenocarcinomas pulmonares es de 1.78. (Yoshino, 1992; 1993). Cabe mencionar que en los estudios citados se empleó la citometría de flujo, por lo que no es posible distinguir entre células infiltrantes intra y peritumorales. De acuerdo con un reporte de Hiraoka el ratio CD4⁺/CD8⁺, en el estroma de NSCLC, es de 1.1 (Hiraoka, 2006), sin embargo, este autor incluye en su estudio carcinomas epidermoide, adenocarcinomas, carcinomas de células grandes y otros, mientras que nosotros estudiamos únicamente adenocarcinomas. Ya que el ratio CD4⁺/CD8⁺ varía con el grado de infiltración de células dendríticas, este hallazgo apoya la

hipótesis de que la diferencia en la densidad de población de linfocitos T CD8⁺, podría estar influenciada por la densidad de células dendríticas infiltrantes del tumor.

Estado de diferenciación de los linfocitos T.

De acuerdo al modelo de diferenciación propuesto por Champagne, las células positivas para CD45RO, pueden ser de memoria central o memoria periférica, mientras que las células negativas para CD45RO podrían ser linfocitos T naïve (CCR7⁺CD45RA⁺) o linfocitos T de memoria efectora terminalmente diferenciados (T_{EMRA}, CCR7⁻CD45RA⁺) (Champagne. 2001).

Una observación interesante en el presente trabajo es la diferencia en el porcentaje células T CD3⁺ con fenotipo de memoria. En los adenocarcinomas con alto grado de TIDC, el 95%, del Linfocitos T, fueron positivos para CD45RO, mientras que en los de bajo grado, sólo el 75%, de los linfocitos T, fueron positivos para este marcador.

Si consideramos que la fracción de células negativas para CD45RO, son positivas para CD45RA, entonces, en los tumores con alto grado de TIDC la población CD45RA⁺ sería del 5%, y en los adenocarcinomas con bajo grado de TIDC dicha población sería del 25%. La presencia de linfocitos T CD45RO⁻, infiltrantes de carcinomas pulmonares de células no pequeñas, ha sido observada por Yoshino quien encontró que el 86.8 ± 4.8 % de las células CD3⁺ son positivas para CD45RO (Yoshino, 1992), y el resto 13% son CD45RA⁺. La diferencia de nuestros resultados con los reportados por Yoshino, pueden explicarse porque este autor incluye diferentes tipos de carcinomas pulmonares mientras que nuestro estudio estuvo restringido a adenocarcinomas pulmonares. Además, sus determinaciones fueron hechas por citometría de flujo, mientras que nosotros evaluamos directamente en el tejido tumoral, distinguiendo las poblaciones peritumorales e intratumorales y, más aún, la muestra analizada por nosotros fue estratificada con base en la densidad de TIDC.

Derniane, ha sugerido que la presencia de linfocitos T negativos para CD45RO (CD45RA⁺) en adenocarcinomas pulmonares, podría ser un indicio del reclutamiento de células T naïve al sitio del tumor o bien de la

existencia de células de memoria terminalmente diferenciadas (Derniame, 2008); otra posibilidad es que el proceso de diferenciación de los linfocitos esté siendo bloqueado por factores del microambiente tumoral.

Capacidad citolítica de las células citotóxicas.

Para explorar estas posibilidades nosotros evaluamos la densidad de población de células citotóxicas positivas para el marcador de gránulos citolíticos TIA-1/GMP-17, y las proteínas citotóxicas granzima B y perforina.

Takata, et al., han sugerido que las Células T CD8⁺ adquieren gradualmente la expresión de Perforina, granzima A y granzima B durante la diferenciación periférica (Takata, 2006).

En este estudio observamos que en la región peritumoral de los adenocarcinomas con alto y bajo grado de TIDC, la fracción de células citotóxicas positivas para el marcador de gránulos citolíticos TIA-1, fue de 24% y 27%, respectivamente. También observamos que la fracción de células citotóxicas positivas para granzima B es prácticamente el doble de lo observado en los tumores con bajo grado de TIDCs, mientras que la densidad de células positivas para perforina es prácticamente nula en ambos grupos. Cabe observar que aun cuando la densidad de células citotóxicas es diferente entre ambos grupos, la proporción de células poseedoras de gránulos y proteínas citotóxicas es igual en ambos grupos.

En la región intratumoral de los adenocarcinomas con alto grado de TIDC se observó que el 60% de las células citotóxicas son positivas para Granzima B, mientras que en los adenocarcinomas con bajo grado de TIDC, sólo el 16% son positivas para esta proteína.

Tomando en cuenta que la población de células citotóxicas, así como la densidad de células TIA-1⁺, es similar en los grupos estudiados y sólo la densidad de población de células Granzima B⁺ es significativamente mayor en los tumores con alto grado de TIDCs, puede inferirse que la capacidad efectora de las células citotóxicas presentes en el nido tumoral, de los adenocarcinomas con alto grado de TIDC es mayor que la de los adenocarcinomas con bajo grado de TIDCs y que, en ambos grupos, la

carencia de perforina es el factor limitante de la respuesta inmune antitumoral.

La biodisponibilidad, en el sitio del tumor, de citocinas tales como IL-15 e IL-7, los cuales desempeñan un papel fundamental en la generación y homeostasis de las células de memoria CD8⁺, podría prevenir la maduración eficiente de las células T. Se ha reportado el TGF- β secretado por las células tumorales y otras, presentes en el microambiente tumoral, pueden suprimir la función citotóxica de los CTLs *in vivo* mediante un programa de represión transcripcional de cinco productos génicos, entre ellos, perforina, granzima A, y granzima B, (Thomas, 2005), por lo que es probable que la baja expresión de granzima B y perforina, observada en este estudio, puedan tener origen en la secreción de TGF- β por las células tumorales.

Una explicación alternativa para la baja expresión de factores citotóxicos en las linfocitos T CD8⁺, es su constante degranulación, sin embargo nosotros no observamos granzima o perforina asociada con las células neoplásicas, lo cual es indicio de la degranulación y transferencia de factores citotóxicos de los linfocitos a las células neoplásicas (Medley, 1996). Con base en lo anterior, nosotros pensamos que la baja densidad de células positivas para proteínas citotóxicas, puede ser el resultado de factores microambientales secretados por las células tumorales, los cuales restringen la maduración y, con ello, el perfil citotóxico, de los linfocitos infiltrantes de tumor.

En síntesis, nuestros resultados indican que en los adenocarcinomas pulmonares existen diferencias en la densidad y patrón de distribución de las células dendríticas; estas diferencias parecen repercutir en la densidad de población de los linfocitos T, mientras que las células NK no resultan afectadas. La baja densidad de células citotóxicas positivas para proteínas citolíticas es un factor común en los adenocarcinomas pulmonares estudiados, lo cual podría estar más relacionado con la secreción de citocinas y factores de crecimiento que restringen la maduración terminal de los linfocitos T citotóxicos, que con el grado de infiltración por células dendríticas

CONCLUSIONES.

En este estudio reportamos que los tumores pulmonares de tipo adenocarcinoma, presentan diferencias en la densidad y patrón de distribución de células dendríticas.

La densidad de población de DC parece no afectar la densidad y ni el patrón de distribución de las células NK, pero sí el de los linfocitos T.

La escasez de linfocitos T CD8⁺, así como la baja proporción de células positivas para granzima B y perforina, en los linfocitos infiltrantes de los adenocarcinomas pulmonares sugiere que la capacidad citotóxica de los linfocitos infiltrantes está notablemente afectada y que esta condición es independiente de la densidad de población de células citotóxicas y del grado de TIDC.

La baja expresión de granzima B, y la casi nula expresión de perforina parece ser independiente del grado de infiltración o patrón de distribución de células dendríticas, lo cual implica que los factores que restringen la maduración de los linfocitos T y la producción subsecuente de proteínas citolíticas es un factor común en los grupos estudiados.

La densidad de población de células citotóxicas intratumorales positivas para granzima B, es significativamente mayor en los tumores con alto grado de TIDC, comparada con los tumores con bajo grado de TIDC, lo cual parece indicar que en los tumores altamente infiltrados por DC, la respuesta inmune antitumoral coexiste con los mecanismos promotores del tumor.

La escasez de células T y la baja proporción de células citotóxicas positivas para granzima B y perforina, sugieren que –para potenciar la respuesta inmune antitumoral– es necesario el diseño de estrategias terapéuticas que promuevan la maduración e infiltración de células T al nido tumoral, así como la infiltración de células dendríticas en los tumores con bajo grado de infiltración.

ANEXO I

PROTOCOLO DE TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA

I RECUPERACIÓN DE ANTÍGENO

Después de desparafinar y rehidratar las secciones histológicas, las laminillas se colocaron en una jarra de Coplin conteniendo buffer de citratos (0.01M, pH = 6). Y se incubaron durante 15 minutos a ebullición constante en un horno de microondas marca Sharp (Sharp carousel). Al finalizar la incubación se dejó enfriar durante 30 min hasta alcanzar la temperatura ambiente.

II BLOQUEO DE PEROXIDASA ENDÓGENA

Con la finalidad de eliminar la actividad de la peroxidasa endógena, los tejidos fueron incubados en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% (v/v) en alcohol metílico durante 30 min. La incubación se efectuó a temperatura ambiente y, al final de la misma, las secciones histológicas fueron lavadas con buffer salino de fosfatos (PBS) durante 5 min en agitación constante.

III BLOQUEO DE UNIÓN INESPECÍFICA

Con la finalidad de evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a los tejidos, estos fueron incubados previamente con una solución de PBS conteniendo suero de cerdo al 2% y Tritón X-100 al 0.5% (v/v) durante 30 min a temperatura ambiente. Acto seguido, las laminillas fueron rotuladas para identificar su tratamiento. El área de tejido tratado fue delimitada, mediante el trazo circular con un lápiz hidrofóbico (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA).

IV INCUBACIÓN CON EL ANTICUERPO PRIMARIO

Las secciones de tejido fueron incubadas con 100 µl del anticuerpo primario y se incubaron durante 18 horas en cámara húmeda a una temperatura de 4°C. Como controles se emplearon cortes histológicos en los que se omitió el anticuerpo primario. En cualquier caso, al final de la incubación las laminillas fueron lavadas con una solución de PBS

conteniendo Tween 20 al 0.1% (v/v) seguido de otro lavado con PBS. Los lavados se efectuaron durante 5 min en agitación constante.

V ANTICUERPO SECUNDARIO

Las secciones histológicas fueron incubadas con 100 µl del anticuerpo secundario biotilado durante una hora en cámara húmeda a 32°C. Al final, las muestras fueron lavadas como se indicó anteriormente.

VI ADICION DEL COMPLEJO ABC

Las muestras fueron tratadas con 100 µl del complejo estrepto-avidina-biotina-peroxidasa a una dilución 1:150 durante 30 min a 32°C en cámara húmeda. Al final de la incubación las muestras fueron lavadas como se indicó anteriormente.

VII Sistema revelador

Como sistema revelador se utilizó una solución de PBS conteniendo peróxido de hidrógeno (0.4 µl/ml) y tetrahidrocloreto de 3,3'diaminobenzidina (DAB) (0.4 µg/ml). Las muestras histológicas fueron incubadas durante 5 min con esta solución y al final la reacción fue interrumpida con agua corriente.

En la tinción inmunohistoquímica doble, luego de haber sido reveladas con DAB, las muestras fueron incubaron en buffer de citratos y se trataron mediante dos ciclos de cinco minutos cada uno en horno de microondas. Acto seguido se comenzó con el protocolo de tinción arriba estipulado partiendo de la incubación con suero de cerdo al 2% y Tritón X-100 al 0.5% (v/v).

El segundo estrato se reveló con un kit de vector (VIP substrate Kit for Peroxidase SK-4600; Vector Lab. Inc., USA) siguiendo las instrucciones del productor.

VIII CONTRATINCIÓN

Las muestras fueron contra teñidas, con hematoxilina de Harris (Hematoxilin QS; H3404, Vector Lab. Inc. USA) durante 3 min, deshidratadas empleando alcohol a varias graduaciones y finalmente las laminillas fueron montadas con resina sintética (Neo-Entellan; Merck).

BIBLIOGRAFÍA

- Álvaro, T., Cruz-Merino, L. de la C., Henao-Carrasco, F., et al. (2010). Tumor microenvironment and immune effects of antineoplastic therapy in lymphoproliferative syndromes. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* Vol. **2010**, Article ID 846872, 17 pages doi:10.1155/2010/846872.
- Ammirante, M., Luo, J.-L., Grivennikov, S., et al. (2010). B cell-derived lymphotoxin promotes castration-resistant prostate cancer. *Nature* **464**: 302–305.
- Balkwill, F., and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. **357**:539–545
- Bell, D., Chomarat, P., Broyles, D., et al. (1999). In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med* **190**: 1417–26.
- Bui, J.D., and Schreiber, R.D. (2007). Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr. Opin. Immunol* **19**: 203–208.
- Campbell, J. J., Kristine E. Murphy, C. E., et al. (2001). CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *Journal of Immunology*, **166**: 877–884.
- Champagne, P., Ogg, G. S., King, A. S., et al. (2001). Maturation of memory HIV-specific CD8+ T lymphocytes. *Nature (Lond.)*, **410**: 106–111.
- de Visser, K.E., Eichten, A., and Coussens, L.M. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat. Rev. Cancer* **6**: 24-37.
- Derniame, S., Vignaud, J.-M., Faure, G.C., et al. (2008). Alteration of the immunological synapse in lung cancer: a microenvironmental approach. *Clinical and Experimental Immunology*, **154**: 48–55
- DeVita, T.V. Jr., Hellman, S. & Rosenberg, S.A. (1989). *Cancer principles & practice of oncology*. J. B. Lippincott Company, Philadelphia tercera edición. Cap. 7-8, pp. 98-132
- Drescher and Linch. (2005). Tumor infiltrating lymphocytes (TILs): Lessons learned in 30 years of study. *Clinical and Applied Immunology Reviews* **5** :149–166
- Dunn, P.G., Bruce, A.T., Ikeda, H., et al. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunol* **3**: 991-998.
- Dunn, P.G., Old, L.J. and Schreiber, R.D. (2004).. The tree es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* **22**:329–60
- Dunn, G. P., Dunn, I.F. and Curry, W.T. (2007). Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human glioma. *Cancer Immunity*. **7**:p. 12 y sig.
- Esendagli, G., Bruderek, K., Goldmann, T., et al. (2008). Malignant and non-malignant lung tissue areas are differentially populated by natural killer cells and regulatory T cells in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **59**: 32-40
- Farzan, S. (1985). *A concise handbook of respiratory diseases*. Reston Publishing Company, Inc. A Prentice Hall Company Reston, Virginia. Segunda edición. Cap. 18 pp. 173-78.
- Gabrilovich, D. I., Chen, H. L., Girgis, K. R., et al. (1996). Production of vascular endothelial

- growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat. Med.*, **2**: 1096–1103.
- Gabrilovich, D., Ishida, T., Oyama, T., et al. (1998). Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages *in vivo*. *Blood*, **92**: 4150–4166.
- Geginat, J., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., et al. (2003). Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood* **101**:4260–66.
- Greenberg, K.A., Yee, H. and Rom, N.W. (2002). Preneoplastic lesions of the lung. *Respir. Res.* **3**: 20-29.
- Grivennikov, S. I., Greten, R. F., and Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**: 883–899.
- Grunewald, M., Avraham, I., Dor, Y., et al. (2006). VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory Cells. *Cell* **124**: 175–189
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57–70.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011). The hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646–673
- Hiraoka, K., Miyamoto, M., Cho, Y., et al. (2006). Concurrent infiltration by CD8+ T cells and CD4+ T cells is a favourable prognostic factor in non-small-cell lung carcinoma. *Br J Cancer* **94**: 275–80.
- Hollings, N. & Shaw, P. (2001). Diagnostic imaging of lung cancer. *Eur. Respir. Mon.* **17**:120-50
- Hoption, S.A., Cann, J. P. van Netten, C. (2003). Dr William Coley and tumor regression: a place in history or in the future. *Postgrad Med J* **79**: 672-680.
- Inoshima, N., Nakanishi, Y., Minami, T., et al. (2002).The influence of dendritic cells infiltration and vascular endothelial growth factor expression on the prognosis of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **8**: 3480-3486.
- Johnson, S.K., Kerr, K.M., Chapman, A.D., et al. (2000). Immune cell infiltrates and prognosis in primary carcinoma of the lung. *Lung Cancer* **27**: 27–35
- Karin, M. (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* **441**: 431–436.
- Kim, S., Takahashi, H., Lin, W.W., et al. (2009). Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* **457**: 102–106.
- Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**: 159–170.
- Konishi, J., Yamazaki, K., Azuma, M., Kinoshita, I., et al. (2004). B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin. Cancer Res.* **10**: 5094–5100.
- Kumamoto, Y., Matteia, L.M., Sellers, E., et al. (2011). CD4+ T cells support cytotoxic T lymphocyte priming by controlling lymph node input. *PNAS* 2011; *published ahead of print May 9, 2011*.

- Kurabayashi, A., Furihata, M., Matsumoto, M., et al. (2004). Distribution of tumor-infiltrating dendritic cells in human non-small cell lung carcinoma in relation to apoptosis. *Pathol. Int.* **54**: 302–310.
- Liakou, C. I., Narayanan, S., Tang, D. N., et al. (2007). Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human bladder cancer. *Cancer Immunity.* **7**: p. 10 y sig.
- Lin, W.W., and Karin, M. (2007). A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J. Clin. Invest.* **117**: 1175–1183.
- Medley, Q. G., Kedersha, N., O'Brien, S., et al. (1996). Characterization of GMP-17, a granule membrane protein that moves to the plasma membrane of natural killer cells following target cell recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 685–689.
- Medzhitov, R. (2010). Inflammation 2010: New adventures of an old flame. *Cell* **140**: 771-776
- Middel, P., Brauneck, S., Meyer, W., et al. (2010). Chemokine-mediated distribution of dendritic cell subsets in renal cell carcinoma. *BMC Cancer*, **10**:578
- Minna, J.D., Roth, J.A. and Gazdar, A.F. (2002). Focus on lung cancer. *Cancer Cell* **1**: 49-52.
- Molina, J.R., Yang, P., Cassivi, S. D., et al. (2008). Non–small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc.***83**:584-594
- Mori, M., Ohtani, H., Naito, Y., et al. (2000). Infiltration of CD8⁺ T cells in non-small cell lung cancer is associated with dedifferentiation of cancer cells, but not with prognosis. *Tohoku J. Exp. Med.* **191**: 113-118
- Naito, Y., Saito, K., Shiiba, K., et al. (1998). CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res* **58**: 3491-3494.
- Nicolson, G.L. (1979). Metástasis cancerosas. *Investigación y Ciencia.* **32**: 22-33.
- Oble, D. A., Loewe, R., Yu, P. et al. (2009). Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. *Cancer Immunity.* **9**: p. 3 y sig.
- Oonakahara, K., Matsuyama, W., Higashimoto, I., et al. (2004). Stromal-derived factor-1 α /CXCL12-CXCR 4 axis is involved in the dissemination of NSCLC cells into pleural space. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **30**: 671–677
- Ohtani, H. (2007). Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human colorectal cancer. *Cancer Immunity.* **7**: p. 7 y sig.
- Perrot, I., Blanchard, DS, Fremont, N., et al. (2007). Dendritic cells infiltrating human non-Small cell lung cancer are blocked at immature stage *J. Immunol.* **178**: 2763-2769
- Phillips, R. J., Burdick, M.D., Lutz, M., et al. (2003). The stromal derived factor–1/CXCL12–CXC chemokine receptor 4 biological axis in non–small cell lung cancer metastases. *Am J Respir Crit Care Med* **167**: 1676–1686
- Poznansky, M.C., Olszak, I. T., Foxall, R. et al. (2000). Active movement of T cells away from a chemokine. *Nat. Med.* **6**: 543–548
- Poznansky, M.C., Olszak, I. T., Evans, R. H., et al. (2002). Thymocyte emigration is mediated by

- active movement away from stroma-derived factors. *J. Clin. Invest.* **109**: 1101-1110
- Prado-García, H., Aguilar-Cazares, D., Flores-Vergara, H., et al. (2005). Effector memory and naïve CD8+ T cells in peripheral blood and pleural effusion from lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer* **47**: 361-371.
- Rabinovich, A.G., Gabrilovich, D. and Sotomayor, M.E. (2007). Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol.* **25**: 267-296.
- Rakoff-Nahoum, S., and Medzhitov, R. (2009). Toll-like receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **9**: 57-63
- Re, F. and Strominger, J.L. (2004). Heterogeneity of TLR-induced responses in dendritic cells: from innate to adaptive immunity. *Immunobiology* **209**: 191-198
- Roberts, S.J., Ng, B.Y., Filler, R.B., et al. (2007). Characterizing tumor-promoting T cells in chemically induced cutaneous carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 6770–6775.
- Robson, N., Hoves, S., Maraskovsky, E., et al. (2010). Presentation of tumour antigens by dendritic cells and challenges faced. *Curr Opin Immunol* **22**: 137–144
- Ruffini, E., Ascoli, S., Filosso, P.L. et al. (2009). Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in lung neoplasms. *Ann Thorac Surg.***87**:365–72
- Sandel, H.M., Dadabayev, A.R., Menon, et al. (2005). Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells in colorectal cancer; role of maturation status and intratumoral localization. *Clinical Cancer Res.* **11**: 2576-82
- Savina, A., Amigorena, S. (2007). Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev* **219**: 143-156.
- Schmid, M. C., and Varner, J. A. (2010). Myeloid cells in the tumor microenvironment: modulation of tumor angiogenesis and tumor inflammation. *Journal of Oncology* **2010**, Article ID 201026, 10 pages
- Sica, A., Allavena, P., and Mantovani, A. (2008). Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer Lett.* **267**: 204-215.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., et al. (2001). IFN gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**: 1107-1111.
- Sozzani, S. (2005). Dendritic cell trafficking: More than just chemokines. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **16**: 581–592.
- Sozzani, S., Rusnati, M., Riboldi, E., et al. (2007). Dendritic cell–endothelial cell cross-talk in angiogenesis. *TRENDS in Immunology.* **28**: 385-392
- Swann, J.B., and Smyth, M.J. (2007). Immune surveillance of tumors. *J. Clin. Invest.* **117**: 1137-1146
- Swann, J.B., Vesely, M.D., Silva, A., et al. (2008). Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 652-656.
- Takata, H. and Takiguchi, M. (2006) Three memory subsets of human CD8+ T cells differently

- expressing three cytolytic effector molecules. *Journal of Immunology*, **177**: 4330–4340.
- Tauber, A.I. (2003). Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**: 897-901
- Thomas, D.A., Massague, J. (2005). TGF- β directly targets cytotoxic T-cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* **8**: 369-380.
- Ullrich, E., Ménard, C., Flament, C., et al. (2008). Dendritic cells and innate defense against tumor cells. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **19**: 79-92.
- Uppaluri, R., Dunn, G.P., Lewis, J.S. Jr. (2008). Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in head and neck cancers. *Cancer Immunity*. **8**: p. 16 y sig.
- Vakkila, J., and Lotze, M.T. (2004). Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nat. Rev. Immunol.* **4**: 641-648.
- Wald, O., Izhar, U., Amir, G., et al. (2006). CD4⁺CXCR4^{high}CD69⁺ T cells accumulate in lung adenocarcinoma. *Journal of Immunology* **177**: 6983-6990.
- Waldner, M.J., and Neurath, M.F. (2009). Colitis-associated cancer: the role of T cells in tumor development. *Semin. Immunopathol.* **31**: 249-256.
- Watanabe, S., Sato, Y., Kodama, T. et al. (1983) Immunohistochemical study with monoclonal antibodies on immune response in human lung cancers. *Cancer Research* **43**: 5883-5889
- Wu, S., Rhee, K.J., Albesiano, E., et al. (2009). A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat. Med.* **15**: 1016-1022
- Webster, C.K. and White, L.R. (1995). The genetic basis of cancer. *Sci. Am.* **272**: 50-57
- YE, S-W., WANG, Y., VALMORI, D., et al. (2006) Ex-vivo analysis of CD8+ T cells infiltrating colorectal tumors identifies a major effector-memory subset with low perforin content. *J Clin Immunol.* **26**:447-56
- Yoshino, I., Yano, T., Murata, M., et al. (1993). Phenotypes of lymphocytes infiltrating non-small cell lung cancer and its variation with histological types of cancer. *Lung Cancer* **10**: 13-19
- Yoshino, I., Yano, T., Murata, M., et al. (1992). Tumor-reactive T-Cells accumulate in lung cancer tissues but fail to respond due to tumor cell-derived factor. *Cancer Res* **52**: 775-781
- Zitvogel, L., Tesniere, A. and Kroemer, G. (2006). Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nature Rev Immunol.* **6**: 715-727.
- Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., et al. (2008). Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nature Rev Immunol.* **8**: 59-72