



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES DE LINFOCITOS TH17 Y
TREGS EN DERRAMES PLEURALES DE PACIENTES CON CÁNCER
PULMONAR**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

Jimena Orozco Gaytán



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ

VOCAL: Profesor: MÓNICA BERENICE HERAS CHAVARRIA

SECRETARIO: Profesor: HERIBERTO PRADO GARCÍA

1er. SUPLENTE: Profesor: MARIO ADAN MORENO EUTIMIO

2° SUPLENTE: Profesor: GIBRÁN PÉREZ MONTESINOS

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

ESTE TRABAJO SE DESARROLLÓ EN EL LABORATORIO DE CÁNCER PULMONAR DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS “ISMAEL COSIO VILLEGAS”

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Heriberto Prado García

SUSTENTANTE (S):

Jimena Orozco Gaytán

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	v
RESUMEN	vi
INTRODUCCIÓN	1
Cáncer	1
Cáncer Pulmonar	1
Clasificación del Cáncer Pulmonar	2
Derrame Pleural.....	2
Derrame Pleural Maligno	3
Respuesta inmunológica ante el cáncer	4
Inmunoedición.....	5
<i>Fase de eliminación</i>	5
<i>Fase de equilibrio</i>	6
<i>Fase de escape</i>	6
Mecanismos de evasión tumoral.....	7
Linfocitos T CD4+ y subpoblaciones.....	10
<i>Linfocito Th1</i>	10
<i>Linfocito Th2</i>	11
<i>Linfocitos T Reguladores (Tregs)</i>	12
<i>Linfocito Th17</i>	13
ANTECEDENTES	15
Linfocitos T reguladores en cáncer	15
Linfocitos T reguladores (Tregs) en cáncer pulmonar.....	17
Linfocitos Th17 en Cáncer	18
Linfocitos Th17 en cáncer de pulmón	20
Relación entre linfocitos Tregs y Th17	20
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	23
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS PARTICULARES.....	23

MATERIALES Y MÉTODOS	24
RESULTADOS.....	31
Determinación del fenotipo de los linfocitos T reguladores (Tregs)	31
Determinación del fenotipo de los linfocitos Th17	32
Determinación del perfil de citocinas Th1, Th2 y Th17 en los sobrenadantes	35
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES.....	41
REFERENCIAS.....	42

ABREVIATURAS

AICD	Muerte celular inducida por activación
APC	Célula presentadora de antígeno profesional
BSA	Albúmina sérica bovina
CCR	Receptor de quimiocina
CD	Cluster de diferenciación
CMN	Células mononucleares
COX	Ciclooxigenasa
CT	Célula tumoral
CTL's	Linfocitos T citotóxicos
CTLA-4	Antígeno-4 de los linfocitos T citotóxicos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FAS	Receptor de muerte
Foxp3	Factor de transcripción con dominio "forkhead box P3"
ICOS	Coestimulador inducible de linfocitos Tregs
IDO	Indolamina- 2,3, dioxigenasa
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
MDSC	Células supresoras de origen mieloide
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
FCS	Forward scatter
NK	por sus siglas en inglés Natural Killer (Asesina natural)
NOS	Óxido nítrico sintasa
NSLC	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
PD-1	Receptor de muerte programada 1
PGE2	Prostaglandina E2
RAG	Gen activador de la recombinación
ROR γ t	Receptor huérfano relacionado al ácido retinoico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SCLC	Cáncer de pulmón de células pequeñas
SSC	Side scatter
TAP	Transportador asociado con el procesamiento antigénico
TCR	Receptor de células T
TGF- β	Factor de crecimiento transformante - β
Th	Linfocito T cooperador
TILs	Linfocitos infiltrantes al tumor
TLR	Receptor de tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAIL	Ligando inductor de muerte asociado a TNF
Tregs	Linfocitos T reguladores
STAT	Señal del transductor y activador de transcripción
TSLP	Linfopoyetina tímica estromal
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial

RESUMEN

Introducción: En México, el cáncer pulmonar es la segunda causa de muerte en hombres y la cuarta en mujeres. Los linfocitos T reguladores (Tregs) favorecen la progresión del tumor; mientras que la función de los linfocitos Th17 frente al tumor es controversial ya que tienen propiedades pro y anti-tumorales. La participación de estas subpoblaciones en el microambiente tumoral de pacientes con cáncer pulmonar es poco clara.

Objetivo: Determinar el porcentaje de linfocitos Tregs y Th17 empleando diferentes marcadores celulares en muestras de pacientes diagnosticados con cáncer pulmonar que han desarrollado derrame pleural.

Metodología: A partir de los derrames pleurales provenientes de 16 pacientes con cáncer pulmonar y de 7 pacientes con tuberculosis (grupo incluido para evaluar si la presencia de las células Tregs o Th17 se debe al proceso inflamatorio crónico o a la patología maligna), se obtuvieron las células mononucleares (CMN). Se identificaron a los linfocitos Th17 y Tregs empleando diversos marcadores moleculares. Posteriormente, a partir de los linfocitos T CD4+ purificados, se evaluó el perfil de citocinas Th1, Th2 y Th17, mediante CBA's (Cytometric Bead Array). Las muestras fueron adquiridas a través de un citómetro de flujo FACSCanto II.

Resultados: Se determinó el porcentaje de linfocitos Th17 (CD3+CD4+ROR γ +), así como el porcentaje de linfocitos Tregs (CD3+CD4+CD25+CD127-Foxp3+). El porcentaje de linfocitos Th17 fue mayor con respecto al porcentaje de linfocitos Tregs, en ambos grupos de estudio; sin embargo, el porcentaje de linfocitos Th17 provenientes de pacientes con cáncer pulmonar tendió a incrementarse en comparación con el grupo de tuberculosis. El fenotipo que los linfocitos Th17 expresaron, era predominantemente de memoria (CD45RA-) también se presentó una subpoblación de linfocitos Th17 con fenotipo efector (CD127-), esto se observó en ambos grupos de estudio.

Con respecto al perfil de citocinas que secretaban los linfocitos T CD4+ provenientes de pacientes con cáncer pulmonar, se encontró la presencia de las citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-6. A las 72h de estimulación se observó la disminución de la IL-10 y el aumento en la IL-17 A. Por lo que nuestros resultados indican que los linfocitos T CD4+ favorecen el proceso de inflamación, por el cual se podría estar beneficiando la progresión de las células tumorales. Con respecto al perfil de citocinas secretadas por los linfocitos T CD4+ del grupo de Tb, se observó que la secreción de la IL-10 se mantiene, mientras que no hubo secreción de IL-17. Por otro parte se observó un aumento en la concentración de IFN- γ . Lo que sugiere que en Tb el perfil de citocinas corresponde a un perfil Th1, Th3 y no Th17.

Conclusiones: Estos resultados sugieren que en estadios avanzados del cáncer pulmonar, el proceso de inflamación crónica favorece la presencia de los linfocitos Th17 los cuales podrían llevar a cabo una función pro-tumoral.

INTRODUCCIÓN

Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades originadas por cambios genéticos y epigenéticos en el DNA. Estos cambios ocurren en genes supresores del tumor y en los proto-oncogenes, debido a la exposición continua a agentes físicos, químicos o biológicos.^(34, 41) La mayoría de esos cambios genéticos permiten que las células adquieran características conocidas como “hallmarks” o “marcas del cáncer” que transforman una célula normal a una célula tumoral. Estas marcas son: potencial replicativo ilimitado, evasión a la apoptosis, angiogénesis sostenida, insensibilidad a las señales anti-proliferativas, autosuficiencia proliferativa, invasión al tejido, metástasis, reprogramación metabólica y por último la evasión del sistema inmunitario.⁽⁶⁾ Estos eventos incrementan la inestabilidad genómica proporcionando que la célula gane o pierda funciones, favoreciendo de esta manera su proliferación descontrolada y la invasión a otros tejidos (metástasis).^(6, 9)

Mundialmente el cáncer es una de las principales causas de muerte; en el 2008 causó 7,6 millones de defunciones que equivalen aproximadamente el 13% del total de defunciones al año. ⁽⁴¹⁾

Cáncer Pulmonar

El cáncer pulmonar presenta una alta incidencia a nivel mundial y causa 1.6 millones de muertes al año.^(16, 41) En México, el cáncer de pulmón es la segunda causa de muerte para los hombres con un porcentaje de defunción del 7.0% y en las mujeres es la quinta causa de muerte con un porcentaje de defunción del 3.6%.⁽²⁶⁾ El consumo de tabaco es el factor de riesgo más importante, ya que causa el 71% de las muertes mundiales por cáncer pulmonar.⁽⁴¹⁾

El humo del tabaco contiene más de 250 sustancias que actúan como carcinógenos, entre estas sustancias se encuentran: los hidrocarburos aromáticos policíclicos, las aminas aromáticas y nitrosaminas. Estos carcinógenos reaccionan químicamente con el DNA produciendo aductos y predisponiendo al individuo a desarrollar cáncer pulmonar. ^(25, 41)

Clasificación del Cáncer Pulmonar

El cáncer de pulmón se clasifica de acuerdo a su histopatología en dos grupos: Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC por sus siglas en inglés) y Cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC). ^(10, 25, 49)

- a. El NSCLC es el tipo más común de cáncer, representa aproximadamente el 85% de los casos y abarca tres tipos histológicos:
- Adenocarcinoma, este tipo de cáncer se encuentra en la periferia del pulmón y es la forma más común de cáncer pulmonar. Histológicamente se distingue por presentar un patrón acinar, papilar y bronquioloalveolar.
 - Carcinoma de células escamosas, este tipo de cáncer se encuentra cerca de los bronquios, hacia el centro de la cavidad torácica, también se le conoce como carcinoma epidermoide. Su patrón histológico muestra queratinización y/o puentes intercelulares.
 - Carcinoma de células grandes, se presentan en cualquier parte del pulmón y es de crecimiento rápido. Se distingue porque su histología es un tumor pobremente diferenciado que carece de características citológicas y que no presenta diferenciación glandular o escamosa. Por lo tanto, el diagnóstico se realiza por exclusión.
- b. El cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) representa el 15% de los casos es de origen neuroendocrino y se encuentra en las vías centrales. ^(10, 25, 49)

Derrame Pleural

El pulmón está recubierto por una membrana serosa llamada pleura que está compuesta por células mesoteliales, tejido conjuntivo y elástico. La membrana pleural que recubre la cavidad torácica es la pleura parietal, y la que recubre al pulmón es la pleura visceral.⁽³⁵⁾ En la cavidad pleural se produce cierta cantidad de líquido, que en condiciones normales no supera a los 15 mL, este líquido se conoce como líquido pleural, el cual es producido en la pleura parietal y se absorbe en la visceral. La función que lleva a cabo este líquido es la de evitar la fricción durante el proceso de inspiración y espiración.^(4, 35)

Se conoce como derrame pleural a la acumulación anormal del líquido en la cavidad pleural. Los derrames pleurales se pueden clasificar en: trasudados y en exudados. ⁽⁴⁾

- El primer grupo es causado por problemas osmóticos hidráulicos como el aumento de la presión hidrostática o por la disminución de la presión osmótica, y es causado por algunas enfermedades como: insuficiencia cardíaca, cirrosis hepática y síndrome nefrótico, entre otras.
- Los exudados son causados por alguna lesión o enfermedad que dañen la integridad de la pleura y por ende se origina un aumento en la permeabilidad capilar. Algunas de las causas son: por infecciones, tumores, traumatismos, neumonías, etc.⁽⁴⁾

Derrame Pleural Maligno

El derrame pleural maligno es un síntoma que se presenta en los pacientes que han sido diagnosticados con algún tipo de cáncer, como es el cáncer pulmonar, el de mama, o linfoma. ⁽²⁴⁾

Alrededor del 40% de los derrames pleurales malignos son originados por cáncer pulmonar. Los derrames pleurales malignos se originan debido al aumento en la permeabilidad capilar o por la obstrucción del drenaje linfático debido a la presencia de las células tumorales.⁽⁴⁾ La acumulación de este líquido se presenta frecuentemente en pacientes con una edad mayor a los 60 años y en los estadios IIIb y IV. El desarrollo del derrame pleural también puede deberse al tratamiento que se le esté dando al paciente como la radioterapia o la quimioterapia.⁽²⁴⁾

Se ha observado que en el derrame pleural maligno se pueden encontrar células tumorales así como células del sistema inmunitario. Por lo que es un sitio adecuado para estudiar la respuesta inmunológica anti-tumoral. Se ha reportado que en el derrame pleural se incrementa la población de linfocitos T CD4+. ^(3, 57)

Respuesta inmunológica ante el cáncer

La noción de que el sistema inmune podría suprimir el desarrollo de las células tumorales fue propuesta inicialmente por Paul Erlich a principios del siglo XX y fue replanteada hasta 1957 por Sir Macfarland Burnet y Lewis Thomas quienes afirmaron que: *“una de las funciones fisiológicas del sistema inmune es la de reconocer y destruir a las células transformadas antes de que se conviertan en células tumorales o matar a las células tumorales ya desarrolladas”*.⁽¹⁵⁾ Ambos científicos especularon que los linfocitos jugaban un papel crítico en el reconocimiento y la eliminación de las células tumorales. Sin embargo, esta hipótesis fue puesta a prueba por Osías Stutman, quien demostró que no existía diferencia en el desarrollo y crecimiento de tumores, entre ratones atímicos “desnudos” y ratones silvestres.^(5, 15) Esta observación implicó que la hipótesis de la inmunovigilancia fuera abandonada por otras posibles teorías que explicaran la función de las células del sistema inmunitario durante el desarrollo del tumor. Con el paso del tiempo, diversos estudios demostraron que los ratones “desnudos” no eran completamente inmunodeficientes ya que ellos tenían otro tipo de células (como NK y una pequeña población de linfocitos T) que podrían estar favoreciendo la supresión del tumor.⁽¹⁵⁾

La teoría de la “Inmunovigilancia” vuelve a cobrar interés debido a que se demostró en modelos animales, que la participación del IFN γ y de los linfocitos T suprimen el crecimiento del tumor. El bloqueo del IFN γ utilizando anticuerpos monoclonales favoreció la aparición del tumor. Asimismo, ratones deficientes en la producción de perforinas o ratones knockout para las enzimas RAG-1 o RAG-2, mostraron desarrollo tumoral.⁽¹⁵⁾ Estos experimentos destacaron la relevancia que tiene el sistema inmunitario al reconocer y eliminar a las células tumorales, y que tanto las células NK como los linfocitos T citotóxicos (CTL's), son esenciales en este proceso.

Al paso del tiempo se encontró que durante el proceso de eliminación de las células transformadas, el sistema inmune podía contribuir a la selección de variantes tumorales capaces de resistir o bloquear las acciones anti-tumorales de las células inmunológicas. Por lo que el término “inmunovigilancia” no describía este último proceso de “escape” que las células transformadas llevan a cabo para evadir la

respuesta inmunitaria. Esto llevó a que se considerara una nueva teoría denominada “Teoría de la Inmunoedición”.^(5, 15)

Inmunoedición

La respuesta inmunitaria frente a las células tumorales impone presiones selectivas que dan lugar a la supervivencia y el crecimiento de variantes de células tumorales. La teoría de la Inmunoedición trata de explicar la participación que tiene el sistema inmunitario en el desarrollo tumoral. Esta teoría consta de tres fases denominadas: eliminación, equilibrio y escape.^(5, 15)

Fase de eliminación

Esta fase engloba a la inmunovigilancia en la cual tanto el sistema inmune innato como el adaptativo participan juntos para detectar y destruir células tumorales. Esta fase involucra 4 etapas:

En la primera etapa, el tumor alcanza un tamaño entre 1-3mm, por lo que empieza a invadir el tejido, requiriendo irrigación sanguínea y llevándose a cabo un arreglo en el estroma, lo que induce señales de alarma y la producción de citocinas pro-inflamatorias. Esto origina el reclutamiento de ciertas células del sistema inmunitario (células NK, NKT, linfocitos T, macrófagos y células dendríticas), que reconocen a las células transformadas. Las células NK inducen la muerte tumoral por la vía de perforina-granzima. Los macrófagos inducen especies reactivas del oxígeno y nitrógeno. Tanto las células NK como los macrófagos producen IL-12 e IFN γ , citocinas que ayudan entre otras cosas, a la diferenciación de los linfocitos Th1. En la segunda etapa se induce la producción de las quimiocinas (CXCL9, CXCL10 y CXCL11, entre otras) por las células tumorales; algunas de estas quimiocinas bloquean la formación de nuevos vasos sanguíneos lo que ocasiona la muerte tumoral por hipoxia, además del reclutamiento de más células NK y macrófagos.⁽¹⁵⁾ En la tercera etapa, las células tumorales muertas son fagocitadas por células dendríticas inmaduras, las cuales al migrar hacia los ganglios linfáticos van madurando y una vez ahí llevan a cabo la presentación del antígeno tumoral a los linfocitos T, los cuales se activan y se diferencian a linfocitos T citotóxicos específicos contra células tumorales. Finalmente

se lleva a cabo la cuarta etapa, en la cual los linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos llegan al sitio del tumor y eliminan a las células tumorales.⁽¹⁵⁾

Fase de equilibrio

Cuando el proceso de eliminación de las células tumorales no es completo, se desarrollarán nuevas variantes tumorales que presentan una inmunogenicidad disminuida y se mantienen en un estado de equilibrio con la respuesta inmunológica. En esta fase se lleva a cabo la selección natural de células tumorales surgiendo nuevas variantes que contienen diversas mutaciones, por lo que las células tumorales adquieren una gran inestabilidad genética, esto les proporcionan cierta capacidad para evadir a la respuesta inmunitaria y por ende favorecer su crecimiento. (5, 15)

Fase de escape

Para este proceso sobreviven las células tumorales que han adquirido cambios genéticos o epigenéticos y que no son detectadas o evaden activamente a las células del sistema inmunitario, por lo que comienzan a expandirse de una manera incontrolada, dando el crecimiento progresivo del tumor hasta su manifestación clínica.

(5, 15)

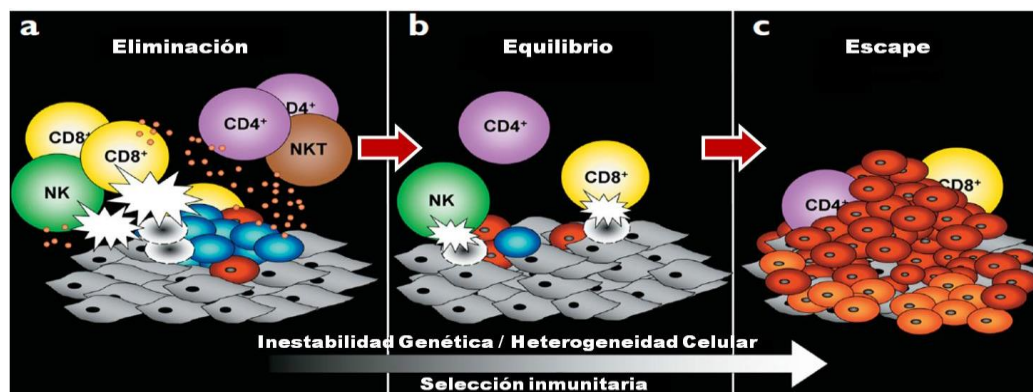


Figura 1. Teoría de la Inmunoedición. a) *Eliminación*. El sistema inmune innato y el adaptativo participan juntos para detectar y destruir células tumorales. b) *Equilibrio*. El proceso de eliminación no fue completo y se desarrollaron nuevas variantes tumorales. Se mantiene en un estado de equilibrio entre las células tumorales y la respuesta inmunitaria. c) *Escape*. Sobreviven las células tumorales y empiezan a expandirse descontroladamente. Modificado de la referencia ⁽⁸⁾

Mecanismos de evasión tumoral

Las nuevas variantes tumorales tienen la capacidad para elaborar mecanismos que les permiten evadir el reconocimiento y la destrucción que lleva a cabo el sistema inmunitario. Algunos de los mecanismos de evasión son:⁽⁴⁴⁾

- La presentación del antígeno, por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase 1, es fundamental para la activación de los linfocitos T citotóxicos (CTL's). Las células tumorales presentan mutaciones en diversos genes que codifican para los componentes necesarios en el procesamiento y la presentación de los antígenos tumorales (Tabla 1). Esto ocasiona una deficiencia en la expresión de moléculas del MHC de clase 1 y por ende los CTL's no puede llevar a cabo su función efectora frente al tumor. ⁽⁴⁷⁾

Tabla 1. Alteraciones que afectan la expresión de la molécula del MHC de clase 1:

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">➤ Mutaciones, deleciones o rearrreglos de los genes que codifican para la microglobulina β_2.➤ Mutaciones en TAP (Transportador asociado con el procesamiento antigénico).➤ Pérdida parcial o total del alelo que codifica para la cadena pesada.➤ Mutaciones en los genes que codifican para los componentes del proteosoma. |
|---|

- Otro mecanismo de evasión es la secreción de citocinas inmunosupresoras por las células tumorales, como la IL-10 y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Ambas citocinas reducen la activación de macrófagos y linfocitos T así como sus funciones efectoras. ^(29, 44)
- Los linfocitos T reguladores (Tregs), subpoblación de linfocitos T CD4+, controlan la respuesta inmunológica inhibiendo la proliferación y la función efectora de otras células. Los linfocitos Tregs secretan citocinas inmunosupresoras como IL-10 y expresan en su superficie moléculas inhibitorias como CTLA-4 (Antígeno-4 de los linfocitos T citotóxicos). ⁽⁴⁷⁾
- Las células tumorales expresan, en su superficie, la molécula PD-L1 (Ligando del receptor de muerte programada 1) que al interaccionar con el receptor PD-1 (Receptor de muerte programada 1), regula negativamente la activación de los linfocitos T. Debido a que la unión PD-L1/PD-1 inhibe la señalización intracelular en el linfocito T. ⁽²⁷⁾

- Las MDSC (células supresoras de origen mieloide) son un grupo heterogéneo conformado por las células dendríticas, los macrófagos, los leucocitos, los basófilos, y los neutrófilos. Las MDSC inhiben las células del sistema inmunitario, mediante la síntesis y liberación de la IL-10. Se ha reportado que durante la progresión de las células tumorales existe un incremento en la cantidad de las MDSC. Esto podría deberse a que se ha encontrado que las células tumorales secretan diversos factores como la prostaglandina E2 (PGE2), IL-6, IL-10, y VEGF (Factor de crecimiento vascular endotelial), que reclutan preferentemente a las MDSC. ⁽⁴⁷⁾
- Otro mecanismo de evasión que llevan a cabo las MDSC es el aumento en la expresión de la arginasa y de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS). Estas enzimas intervienen en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), regulando el metabolismo de la L-arginina hacia óxido nítrico e hidróxido, lo cual produce la inhibición de las células T y las conduce a la muerte. ^(44, 47)
- IDO (Indolamina- 2,3, dioxigenasa) es una enzima que pueden expresar las células tumorales, células dendríticas y los macrófagos. Esta enzima es la responsable de catalizar la degradación del triptófano a cinureína. IDO tiene una función inmunosupresora debido a que degrada el triptófano, un aminoácido esencial para la maduración de los linfocitos. ^(44, 47)
- La prostaglandina E2 tiene funciones pro-tumorales debido a que promueve la angiogénesis y la metástasis de las células tumorales. La PGE2 y los tromboxanos son producidos por la degradación del ácido araquidónico por la enzima ciclooxigenasa dos (COX2) sobre expresada en diversos tipos de cáncer. La PGE2 tiene funciones inmunosupresoras debido a que regula la expresión de IDO y de la enzima arginasa en las MDSC. Lo que con lleva a la inhibición de las células dendríticas y función efectora de los linfocitos T. ^(44, 47)
- Otro mecanismo de evasión es el proceso denominado muerte celular inducida por la activación (AICD). Este proceso involucra al receptor de muerte FAS y su ligando FASL, glicoproteínas de membrana expresadas en células nucleadas. La estimulación crónica de los linfocitos T CD8+ por antígenos tumorales conduce a estos linfocitos a la AICD, ya que expresan las moléculas FAS y FASL sobre su

superficie. La unión de ambas moléculas en la membrana de las células, activa la cascada de caspasas, lo que lleva a la muerte apoptótica del linfocito. ^(42, 47) Otra molécula que induce apoptosis por la vía de las caspasas es TRAIL (ligando inductor de muerte asociado a TNF), que se une a su receptor TRAILR, ambos expresados en los linfocitos T efectores.

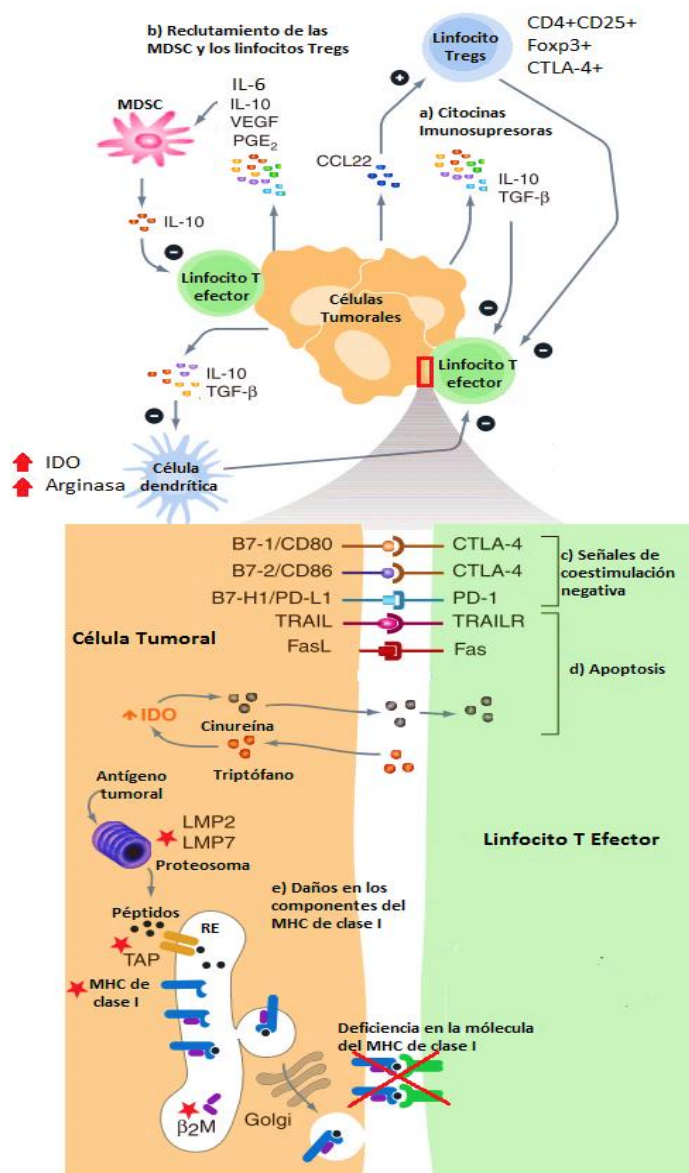


Figura 2. Mecanismos de evasión tumoral. Algunos de estos mecanismos son: a) Elaboración de citocinas con actividad inmunosupresora, b) reclutamiento de MDSC y linfocitos Tregs, c) activación de las señales de coestimulación negativa, d) muerte celular e) daños en los componentes necesarios para la presentación de antígenos por el MHC de clase I. Imagen modificada de la referencia. ⁽⁴⁴⁾

Linfocitos T CD4+ y subpoblaciones

Los linfocitos T se dividen de acuerdo al tipo de cadenas que conforman a su receptor, en linfocitos T $\alpha\beta$ y en linfocitos T $\gamma\delta$. Estos últimos se encuentran principalmente en las mucosas y en baja proporción en la circulación sanguínea. En cambio, los linfocitos T $\alpha\beta$ se encuentran en la circulación y se dividen en linfocitos T CD8+ y CD4+.^(1, 19)

Los linfocitos T cooperadores (CD4+) actúan coordinando la respuesta inmunitaria de otras células del sistema inmunológico, a través de la síntesis y secreción de diversas citocinas, así como también coordinan la producción de anticuerpos.⁽¹⁾

La activación de los linfocitos T CD4+ se da en los ganglios linfáticos cuando un linfocito T naïve reconoce, a través de su TCR, a un péptido derivado de un antígeno que fue asociado a una molécula de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), el cual está presente en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APC). A este proceso de reconocimiento se le conoce como la primera señal para la activación de los linfocitos T CD4+. La segunda señal se lleva a cabo por ciertas moléculas que están situadas en la superficie de las APC, a estas moléculas se les conoce como “moléculas coestimuladoras”, ya que funcionan, junto con el péptido presentado, a estimular la activación de los linfocitos T CD4+. Sin esta segunda señal, que es realizada por las moléculas coestimuladoras, los linfocitos T que se encuentran con el antígeno no responden y mueren por apoptosis o entran en un estado de falta de reactividad llamado anergia.^(1, 30, 55) Finalmente, una vez que el linfocito T CD4+ está activado, necesita de la presencia de citocinas y factores de crecimiento que estimulen su proliferación celular y la diferenciación a las distintas subpoblaciones de linfocitos T CD4+.⁽⁵⁵⁾

Linfocito Th1

La función principal de los linfocitos Th1 es la activación de macrófagos, células dendríticas y células NK. Para llevar a cabo la diferenciación de un linfocito T naïve a un linfocito Th1, se necesita de la presencia del IFN γ y la IL-12.⁽³⁰⁾

El IFN γ se une a su receptor que está constituido por las cadenas IFN γ -RI e IFN γ -RII que se encuentran ubicados en la superficie de los linfocitos T CD4+ (así como en otras células del sistema inmune), cuando la unión se lleva a cabo se activa al factor de transcripción STAT1, que a su vez estimula la expresión de T-bet que promueve la

producción de IFN γ . El factor T-bet se considera el regulador maestro de diferenciación a células Th1. ⁽²⁸⁾ Por otro lado la IL-12 también contribuye a la diferenciación de los linfocitos Th1. El receptor para la IL-12 es un heterodímero conformado por las cadenas IL-12p35 e IL-12p40. Al unirse la IL-12 a su receptor se activa una cascada de señalización que activa al factor de transcripción STAT4 que incrementa la producción de IFN γ . ^(28, 55)

Con respecto al cáncer, se ha reportado que los linfocitos Th1 participa liberando IFN γ . La cuál es una citocina que favorece la expresión de la molécula del MHC de clase I. Por otra parte se ha reportado que el IFN γ es capaz de activar a los CTL's y a las células NK, las cuales destruyen a las células tumorales. ⁽²³⁾

Linfocito Th2

Los linfocitos Th2 reconocen antígenos derivados de microbios, así como antígenos que despiertan una reacción alérgica, sin causar una inflamación persistente ni la producción de citocinas pro-inflamatorias. También el linfocito Th2 promueve el cambio de isotipo y la producción de IgE en los linfocitos B. ⁽¹⁾

Los linfocitos Th2 se diferencian a partir de los linfocitos T CD4+ por la activación de los factores de transcripción GATA3 y STAT6. Las citocinas efectoras que son producidas por Th2 son IL-4, IL-5 e IL-13. ⁽²⁸⁾

La IL-4 activa al factor de transcripción STAT6 que induce la activación del factor de transcripción maestro para esta población, conocido como GATA-3. Una vez que se activa GATA-3 se induce la producción de las interleucinas antes mencionadas.

La IL-5 es un factor de crecimiento para los eosinófilos y la IL-13 induce a las células epiteliales a producir moco, debido a que estas células expresan al receptor de la IL-13 sobre su superficie. ⁽¹⁾ Con respecto a los linfocitos Th2 en cáncer, se ha reportado que estos linfocitos al sintetizar y secretar IL-4 e IL-13 contribuyen a la activación de los macrófagos M2, los cuales contribuyen a la progresión del tumor. Esto se debe a que los macrófagos M2 secretan factores solubles, como VEGF que promueven la angiogénesis tumoral.⁽¹³⁾

Linfocitos T Reguladores (Tregs)

La principal función de los linfocitos Tregs es la de inhibir la proliferación y la función efectora de otras células del sistema inmunológico. ⁽¹⁾

Existen dos poblaciones de linfocitos Tregs, aquellos que se originan a partir de los linfocitos T CD4⁺ que se encuentran en el timo, a los cuales se les conoce como linfocitos T reguladores naturales (nTregs) y aquellos que se originan a partir de los linfocitos T CD4⁺ que se encuentran en la periferia, a los cuales se les conoce como linfocitos T reguladores inducidos (iTregs). ⁽⁸⁾ Los linfocitos nTregs se originan debido a que presentan una alta afinidad entre su TCR y el péptido presentado por las células estromales del timo. La segunda señal de activación está dada por las células dendríticas CD11c⁺ que son reclutadas y activadas por el TSLP (Linfopoyetina Estromal Tímica), una citocina que es secretada en los corpúsculos de Hassall. Las células dendríticas CD11c⁺ favorecen la expresión de Foxp3 en los linfocitos T CD4⁺, los cuales adquieren una función reguladora. Por otro lado los linfocitos iTregs son una subpoblación de linfocitos T CD4⁺ cuyo desarrollo, mantenimiento y diferenciación, depende de la estimulación vía TCR y de las citocinas TGF- β e IL-2. ⁽⁸⁾

Los linfocitos Tregs se caracterizan por presentar los factores de transcripción STAT5 y Foxp3, este último factor es el factor de transcripción maestro para los linfocitos Tregs. ^(28, 30, 55)

Foxp3 es un miembro de la familia de factores de transcripción forkhead box (FOX), que se caracterizan por poseer un dominio de unión al ADN. Este gen codifica para una proteína conocida como Foxp3, que se expresa principalmente en los linfocitos Tregs. La función que lleva la proteína Foxp3 es la de asociarse a factores de transcripción que codifican para los genes de CD25, CTLA-4 y GIRT; moléculas que favorecen la función supresora por parte de los linfocitos Tregs. ⁽¹⁸⁾

Los linfocitos T reguladores (nTregs como iTregs) llevan a cabo su función inmunosupresora a través de:

- La síntesis y liberación de citocinas inmunosupresoras como la IL-10 y TGF- β , que inhiben la activación de linfocitos T, macrófagos y células dendríticas.
- La capacidad que tienen los linfocitos Tregs para inhibir a las APC mediante la expresión de la molécula CTLA-4 que interacciona con B7-1 y B7-2 (moléculas

expresadas en las APC). Al interactuar la molécula CTLA-4 con B7 (1 o 2) se origina una vía de señalización negativa que da como resultado que las APC ya no sean células funcionales, y por ende no se lleve a cabo una correcta activación de los linfocitos T.

- Otro mecanismo de supresión que llevan a cabo estos linfocitos, es el consumo de IL-2 presente en el microambiente. Los linfocitos Tregs presentan el receptor para IL-2 (CD25) con alta afinidad. Por lo que la disminución de esta citocina conduce a la apoptosis de células efectoras. (8, 30, 55)

Por otra parte, se ha observado la presencia de los linfocitos Tregs en diversos tipos de cáncer. Este fenómeno ha sido asociado a que las células tumorales reclutan por medio de la quimiocina CCL22, a los linfocitos Tregs como mecanismo de evasión del sistema inmunitario, favoreciendo la progresión del tumor.

Linfocito Th17

La función principal que llevan a cabo los linfocitos Th17 es la de estimular respuestas inflamatorias ricas en neutrófilos que eliminan bacterias extracelulares y hongos. (1)

Para que se lleve a cabo la diferenciación de los linfocitos T naïve hacia linfocitos Th17, se necesita la combinación de varias citocinas pro-inflamatorias. Se ha reportado que la presencia de la IL-1 β , la IL-6 y la IL-23, así como el TGF- β favorecen el desarrollo de los linfocitos Th17. Estas citocinas en cooperación inducen la activación de los factores de transcripción STAT3 y ROR γ t; siendo este último factor, el factor de transcripción maestro para los linfocitos Th17.

ROR γ t es miembro de la superfamilia de receptores nucleares de esteroides. El papel fundamental que lleva a cabo ROR γ t es la transcripción de los genes que codifican para la IL-17A, IL-21 e IL-22 que son las citocinas que sintetizan y secretan los linfocitos Th17. (28, 30, 31, 55, 58) La función que llevan a cabo estas citocinas son:

- La IL-17A se une a sus receptores IL-17RA e IL-17RC los cuales son expresados en la superficie de las células epiteliales, fibroblastos, macrófagos, y neutrófilos. La IL-17A induce a estas células a producir citocinas (IL-1, IL-6 y TNF- α) y metaloproteinasas, las cuales promueven el proceso de inflamación. (31)

- La función de la IL-21 es bloquear la expresión de Foxp3 evitando que las células se diferencien hacia linfocitos T reguladores. ⁽³¹⁾
- La IL-22 forma parte de la familia de IL-10, sus receptores son IL-22R e IL-10R2 que se encuentran expresados en células epiteliales y endoteliales. La función que realiza la IL-22 es la de inducir la expresión de péptidos antimicrobianos en células epiteliales. ⁽³¹⁾

En estudios recientes se ha observado que los linfocitos Th17 tienen una participación crítica en el desarrollo de las enfermedades autoinmunes y han sido identificados como linfocitos importantes en la inmunopatogénesis de la inflamación. Con respecto al cáncer, se ha observado la presencia de los linfocitos Th17 en el ambiente tumoral; sin embargo, la función que estos linfocitos realizan frente al tumor aún es controversial, debido a que hay reportes que indican que los linfocitos Th17 realizan una función pro-tumoral y por el contrario, hay reportes que indican que realizan una función anti-tumoral. ^(30, 31, 55, 58)

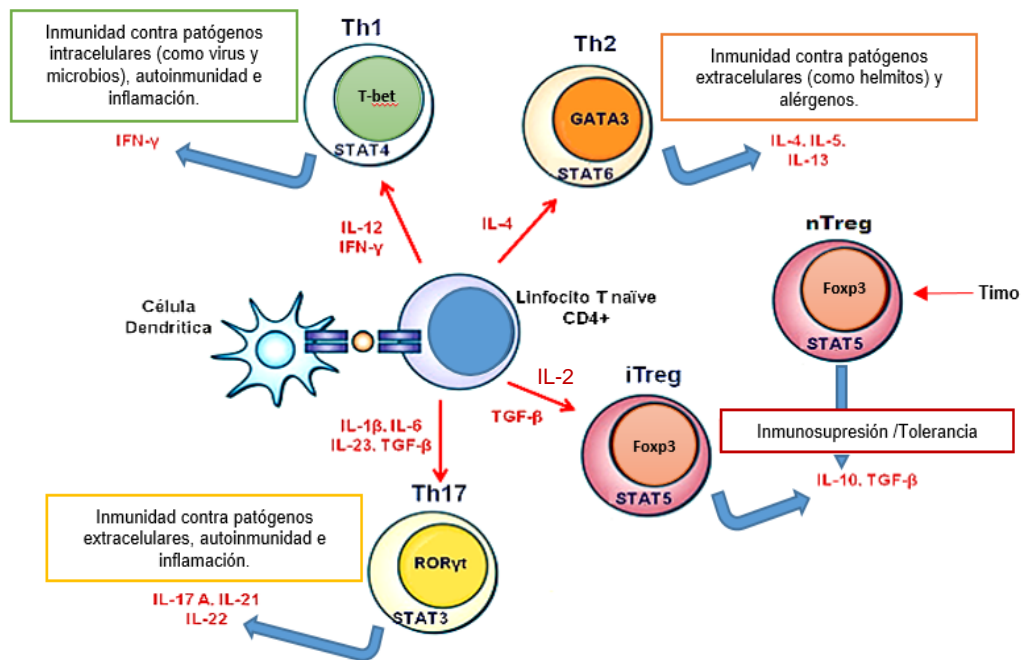


Figura 3. Diferenciación y función de cada subgrupo de linfocito T CD4+. Los linfocitos T CD4+ pueden diferenciarse en diversas subpoblaciones de linfocitos T, debido a las citocinas presentes en el microambiente. Modificado de la referencia ⁽¹⁷⁾

ANTECEDENTES

Linfocitos T reguladores en cáncer

En 1970, Gershon y Kondo demostraron por primera vez que existía una población de células que podían suprimir la respuesta de los linfocitos T efectores. Estos resultados se obtuvieron al inducir tolerancia antígeno-específica a ratones naïve mediante la transferencia de células T. ⁽⁸⁾ A esta nueva población de células las llamaron “células supresoras”. Sin embargo, debido a que no se identificaron marcadores particulares para este tipo de células, la importancia de esta población disminuyó. Más de 20 años después la idea de las células supresoras renació. En 1995 Sakaguchi y cols. ^(7, 8, 39) identificaron que estas células expresaban las moléculas CD4 y CD25. A esta población de células se les conoce como linfocitos T reguladores (Tregs).

La población de linfocitos Tregs constituyen el 5% de los linfocitos T presentes en sangre periférica de sujetos sanos. Su función es inhibir la activación y la proliferación de diversas células del sistema inmunitario, así como mantener la tolerancia frente a lo propio. ⁽⁵²⁾

Con respecto al cáncer se ha observado que los linfocitos Tregs favorecen la progresión del tumor. Jaberipour y cols. ^(2, 27) demostraron una relación proporcional entre el porcentaje de linfocitos Tregs (CTLA-4+Foxp3+) y los estadios avanzados que presentaban los pacientes con cáncer de mama. Concluyendo que la presencia de los linfocitos Tregs en estadios tempranos son de mal pronóstico para el desarrollo de la enfermedad. De forma similar Xiang-Liang Yuan y cols. ⁽⁶¹⁾ reportaron que en sangre periférica de pacientes diagnosticados con cáncer gástrico, se observó un incremento del 8% de linfocitos Tregs (CD4+Foxp3+) comparados con sujetos sanos. Este fenómeno fue asociado con la presencia de TGF- β (una citocina necesaria para la diferenciación hacia linfocitos Tregs) en el ambiente tumoral. Por otro lado, Conrad y cols. ⁽¹¹⁾ atribuyeron el aumento en el porcentaje de linfocitos Tregs a la alta expresión del ligando ICOS sobre la superficie de las células dendríticas. Al llevarse a cabo la interacción entre ICOSL/ICOS (expresada en la superficie del linfocito T), se incrementa la diferenciación al fenotipo regulador, además del aumento en la síntesis y liberación de la IL-10, por este tipo de linfocitos.

También se ha reportado que en líneas leucemicas, la presencia de la prostaglandina E2 estimula la activación del factor de transcripción Foxp3, que favorece la transcripción de los genes para la molécula CD25. Esto permite que los linfocitos T (CD4+CD25-) tengan la capacidad para convertirse en linfocitos T reguladores (CD4+CD25+Foxp3+), y así lleven a cabo su función inmunosupresora.⁽⁵³⁾ Por otra parte en un modelo de ratón con glioma se demostró que al bloquear la molécula CTLA-4, (expresada sobre la superficie del linfocito T regulador) y suministrar IL-12, se disminuía la función supresora de los linfocito Tregs y se incrementaba la función efectora de los linfocitos T, lo que favorecía la respuesta inmunitaria frente al cáncer.⁽⁵⁰⁾ Estos resultados sugieren que en el ambiente tumoral la diferenciación y el incremento de los linfocitos Tregs, podría favorecer el desarrollo de las células tumorales dando paso a la progresión de la enfermedad.

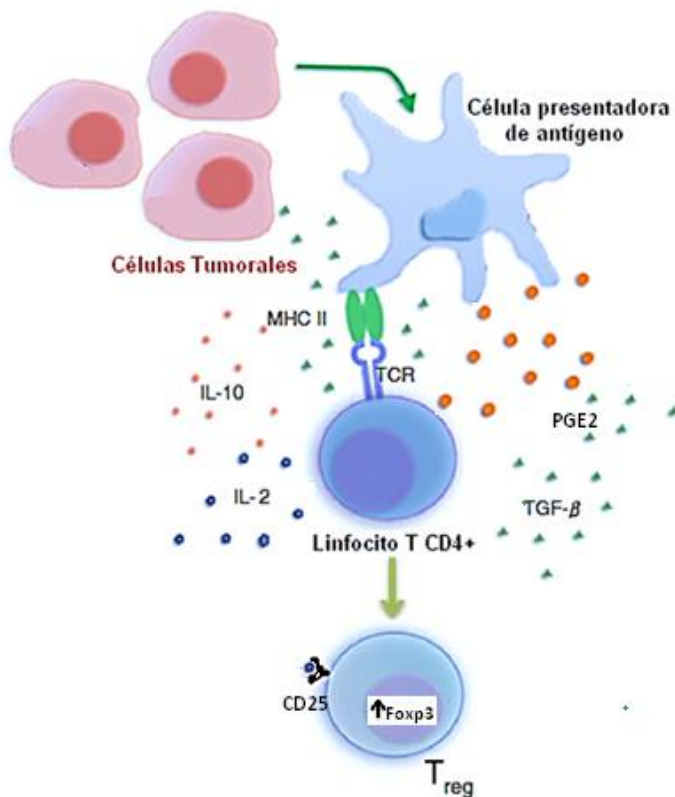


Figura 4. Reclutamiento y diferenciación de linfocitos Tregs en cáncer. En el microambiente tumoral se ha observado que debido a la presencia de las citocinas: TGF- β , IL-2 e IL-10, así como la presencia de PGE2, se favorece la diferenciación hacia los linfocitos Tregs. Modificado de la referencia ⁽³⁹⁾

Linfocitos T reguladores (Tregs) en cáncer pulmonar

En el cáncer pulmonar también se ha observado la presencia de los linfocitos Tregs. Se ha reportado que en muestras de sangre periférica de pacientes con cáncer pulmonar, el porcentaje de linfocitos Tregs se encuentra incrementado con respecto al porcentaje de linfocitos Tregs en sangre periférica de sujetos sanos. Hui Li y col.⁽³⁶⁾ asociaron este fenómeno con el incremento en la cantidad de linfopoyetina tímica estromal (TSLP), la cual podría favorecer la activación de los linfocitos Tregs (CD4+CD25+). Por otro lado, Woo y cols.⁽⁵⁴⁾ observaron que en biopsias de pacientes con cáncer pulmonar (en estadios I y II), se presentaba un incremento en el porcentaje de linfocitos Tregs (CD4+CD25+) infiltrantes del tumor, con respecto al porcentaje de los linfocitos Tregs de sangre periférica de los mismos pacientes. Identificaron que los linfocitos Tregs infiltrantes del tumor incrementaron la expresión de la molécula CTLA-4. Concluyendo que en los estadios iniciales del cáncer pulmonar, los linfocitos Tregs llevan a cabo su función inmunosupresora a través de la expresión de la molécula CTLA-4, lo que podría estar favoreciendo la progresión de la enfermedad.

Por otro lado, existen pocos estudios sobre los linfocitos Tregs presentes en el derrame pleural de pacientes con cáncer pulmonar. En estos estudios han identificado a esta población de linfocitos por medio de los fenotipos CD4+CD25+⁽⁵⁴⁾ y CD3+CD4+CD25+CD45+⁽¹⁴⁾. También han reportado que el porcentaje de los linfocitos Tregs, provenientes del derrame pleural causado por cáncer pulmonar, es mayor en comparación al porcentaje de los linfocitos Tregs en sangre periférica, o en comparación a los derrames pleurales causados por mesotelioma.⁽¹⁴⁾ La presencia de los linfocitos Tregs en el derrame pleural ha sido asociado con el incremento de las quimiocinas CCL17 y CCL22 que reclutan a esta población linfocitaria.⁽⁴³⁾ Los estudios previos sugieren que el ambiente tumoral es supresor, debido a la presencia de los linfocitos Tregs; los cuales al llevar a cabo su función, inhiben a las células del sistema inmunitario, lo que favorece la progresión del tumor. Sin embargo se desconoce si la presencia de los linfocitos Tregs en el ambiente tumoral se pueda deber al proceso de inflamación por el cual está cursando la enfermedad, o a la presencia de las células

tumorales que pudieran favorecer el reclutamiento de los linfocitos Tregs para su beneficio.

Linfocitos Th17 en Cáncer

Los linfocitos Th17 fueron identificados en el 2005 como una subpoblación de linfocitos T CD4+, que sintetizan y secretan IL-17 mediante la activación de su factor de transcripción ROR γ t.⁽⁵⁸⁾

Se ha observado que los linfocitos Th17 regulan la respuesta inmunitaria frente al cáncer. Zhan y cols⁽⁶²⁾, reportaron que en pacientes con cáncer gástrico en estadios avanzados, se presentó un incremento en el porcentaje de los linfocitos Th17 (CD4+IL17+). De forma similar Su y cols,⁽⁴⁸⁾ también observaron un incremento en el porcentaje de linfocitos con el fenotipo CD4+IL17+, de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama, melanoma y colon. Estos resultados se asociaron a la presencia de las quimiocinas CCL2 (MPC-1) y CCL5 (Rantes), presentes en el ambiente tumoral. Miyahara y cols,⁽³⁸⁾ reportaron en pacientes con cáncer de ovario un incremento en el porcentaje de linfocitos Th17 que expresaron los receptores CCR6 y CCR4, los cuales son receptores de diversas quimiocinas. Además, en este mismo estudio se identificó la presencia de las citocinas IL-1 β , IL-6 y TGF- β (citocinas necesarias para la diferenciación a linfocitos Th17). Los estudios previos sugieren que en el desarrollo del cáncer, la generación y el reclutamiento de linfocitos Th17 pueden ser inducidos por factores presentes en el microambiente tumoral; sin embargo, la función biológica que llevan a cabo estos linfocitos aún es controversial. Algunos reportes, en modelos murinos, indican que estos linfocitos realizan una actividad pro-tumoral:

- Numasaki y cols⁽⁴⁰⁾ reportaron que la IL-17A estimula la producción del factor angiogénico VEGF por fibroblastos y células endoteliales, promoviendo así el crecimiento tumoral. Así mismo, Lian Wang y cols⁽⁵¹⁾ demostraron que la IL-17 puede estimular a las células dendríticas y fibroblastos a producir IL-6. Dicha citocina activa al factor de transcripción Stat3, lo que confiere a las células tumorales la capacidad proliferativa, antiapoptótica y la expresión de diversas moléculas con actividad angiogénica.

Por otro lado otros reportes, en modelos murinos, indican que estos linfocitos tienen actividad anti-tumoral:

- Martín–Orozco y cols. ⁽³⁷⁾ demostraron que la IL-17 estimula la secreción de las quimiocinas CCL22 y CCL20 que participan en el reclutamiento de las células dendríticas y leucocitos al sitio tumoral. También observaron que la IL-17 estimula la síntesis de la IL-12 que ayuda a la activación de los linfocitos T citotóxicos (CTLs) y de los linfocitos Th1. Kryczek y cols.⁽³²⁾ encontraron que los linfocitos Th17, provenientes de pacientes con cáncer de ovario, inducen junto con la presencia de IFN γ , a los linfocitos Th1 a secretar quimiocinas como CXCL9 y CXCL10 que reclutan a más células efectoras al sitio de inflamación.

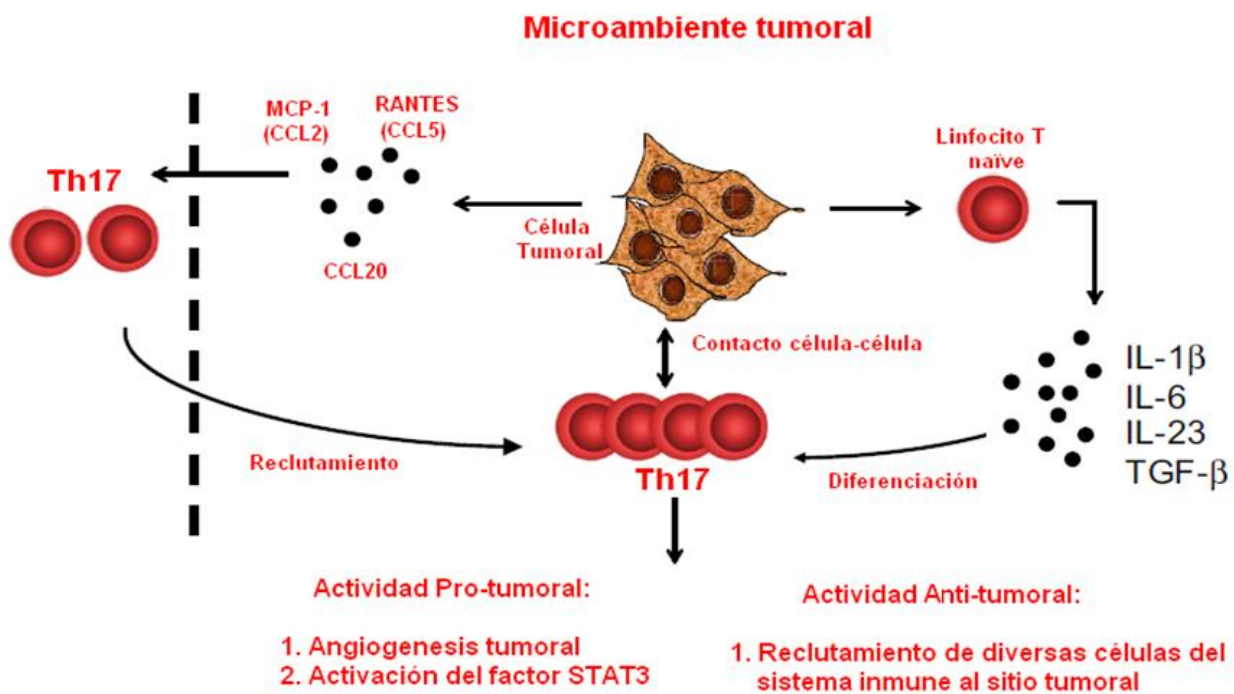


Figura 5. Reclutamiento y diferenciación de linfocitos Th17 en el microambiente tumoral.

Se ha observado que los linfocitos Th17 se encuentran presentes en el ambiente tumoral debió: 1) al reclutamiento mediado por las quimiocinas MCP-1, RANTES y CCL20 que han sido secretadas por células tumorales, y 2) por la presencia de diversas citocinas como la IL-1 β , IL-6, IL-23 y TGF- β que están presentes en el microambiente tumoral. Modificado de la referencia ⁽⁵⁸⁾

Linfocitos Th17 en cáncer de pulmón

En pacientes con cáncer pulmonar se ha reportado la presencia de linfocitos Th17; sin embargo, la función que estos linfocitos realizan aún es controversial. Hamai y cols.⁽²⁰⁾ reportaron que los linfocitos T CD4+ al ser estimulados por el antígeno tumoral MAGE-A3, se diferencian a linfocitos Th17 (ROR γ +IL-17+), lo que explica el aumento en la producción de IL-17. Por otro lado, en líneas celulares de cáncer pulmonar, se ha observado que la IL-17 promueve la progresión de las células tumorales por medio de la activación de la vía IL-6/STAT3.

Con respecto a los linfocitos Th17 provenientes de los derrames pleurales ocasionados por cáncer pulmonar, se conoce poco. Zhian-jian Ye y cols.⁽⁵⁹⁾ reportaron que en los derrames pleurales de pacientes con cáncer pulmonar, el porcentaje de linfocitos Th17 (CD3+CD4+IL-17+) es alrededor del 4%, en comparación al porcentaje de los linfocitos Th17 provenientes de sangre periférica de sujetos sanos (0.6%). Estos resultados fueron asociados a la presencia de las citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6, IFN γ y TGF- β) y a las quimiocinas (CCL20 y CCL22), en los derrames pleurales.

A partir de estos resultados se puede concluir que, en los derrames pleurales producidos por cáncer pulmonar, se encuentran presentes los linfocitos Th17 que han sido reclutados o que han llevado a cabo su diferenciación en este sitio de tumor, por lo que estos resultados podrían sugerir que el ambiente tumoral es inflamatorio. Sin embargo se desconoce si la presencia de los linfocitos Th17 en el ambiente tumoral se pueda deber al proceso de inflamación por el cual está cursando la enfermedad, o a la presencia de las células tumorales que pudieran favorecer el reclutamiento de los linfocitos Th17 para su beneficio. Por lo que se necesita profundizar en el tema.

Relación entre linfocitos Tregs y Th17

Al estudiar las citocinas necesarias para la diferenciación tanto de los linfocitos Tregs como de los linfocitos Th17, se encontró que ambas subpoblación de linfocitos T CD4+ necesitan de la presencia de TGF- β para llevar a cabo su diferenciación; este fue el primer indicio que relacionó a estas dos subpoblación de linfocitos T CD4+. El TGF- β es una citocina que regula a Foxp3 (factor de transcripción maestro para los linfocitos Tregs), y al factor de transcripción ROR- γ , que caracteriza a los linfocitos Th17. Lo que conlleva a que TGF- β pueda suprimir la respuesta inmunitaria, debido a la generación

de los linfocitos Tregs, o pueda promover el proceso de inflamación por medio de los linfocitos Th17. ⁽³¹⁾

Además los linfocitos Tregs y Th17 llevan a cabo el proceso de plasticidad celular. En un estudio reciente, en pacientes diagnosticados con cáncer de esófago, se reportó la presencia de linfocitos Tregs infiltrantes del tumor con el fenotipo Foxp3+, capaces de producir IL-17. ^(22, 33) De la misma manera, se encontró en muestras provenientes de pacientes con cáncer de mama⁽⁴⁸⁾ y de ovario⁽⁴⁸⁾, la presencia de linfocitos Th17 con fenotipo RORγt+Foxp3+, que realizan una función supresora. A este fenómeno se le conoce como plasticidad celular. El proceso de plasticidad celular ha sido atribuido al cambio en el perfil de citocinas, presentes en el microambiente tumoral. Esto origina que los linfocitos Tregs, así como los linfocitos Th17, re-programen su diferenciación, debido a la regulación en sus factores de transcripción.

Con respecto a las funciones que estos linfocitos llevan a cabo, se podría decir que realizan funciones antagónicas. Mientras los linfocitos Tregs inhiben la respuesta inmunológica por medio de la secreción de la IL-10; los linfocitos Th17, a través de la IL-17, reclutan y activan a las células del sistema inmunitario.

Se puede concluir que la relación que se presenta entre los linfocitos Tregs y Th17 está mediada por las citocinas presentes en el microambiente, lo que ocasiona que estos linfocitos se diferencien y por ende realicen o no su función biológica.

JUSTIFICACIÓN

Se ha reportado que en los derrames pleurales causados por cáncer pulmonar el porcentaje de los linfocitos Tregs se encuentra incrementado, con respecto a esta población linfocitaria en muestras provenientes de sangre periférica. Los linfocitos Tregs suprimen a la respuesta inmunitaria, como mecanismo de evasión de las células tumorales. Además en estos estudios se llevó a cabo la identificación de los linfocitos Tregs por medio del fenotipo CD4+CD25+; sin embargo CD25 no es un marcador exclusivo de estos linfocitos. Con respecto a los linfocitos Th17 hay reportes que los identifican mediante los marcadores CD4+IL-17+, dicha población también se ha reportado que se encuentra incrementada en los derrames pleurales de pacientes con cáncer pulmonar, y que promueven el proceso de inflamación. Por lo que existe controversia si el ambiente tumoral que se presenta en el derrame pleural es inflamatorio o supresor.

Por tal motivo, en este estudio se determinó los porcentajes de los linfocitos Tregs y Th17 en los derrames pleurales de pacientes con cáncer pulmonar, por medio de una combinación de marcadores celulares que nos permitió caracterizar más estrictamente a estas poblaciones linfocitarias. De esta manera se observó la relación que los linfocitos Tregs y Th17 llevan a cabo en el ambiente tumoral.

HIPÓTESIS

Si en los pacientes con cáncer pulmonar hay un proceso de inflamación crónica entonces en el derrame pleural maligno se encontrara un aumento en el porcentaje de linfocitos Th17 con respecto a los linfocitos Tregs.

OBJETIVO GENERAL

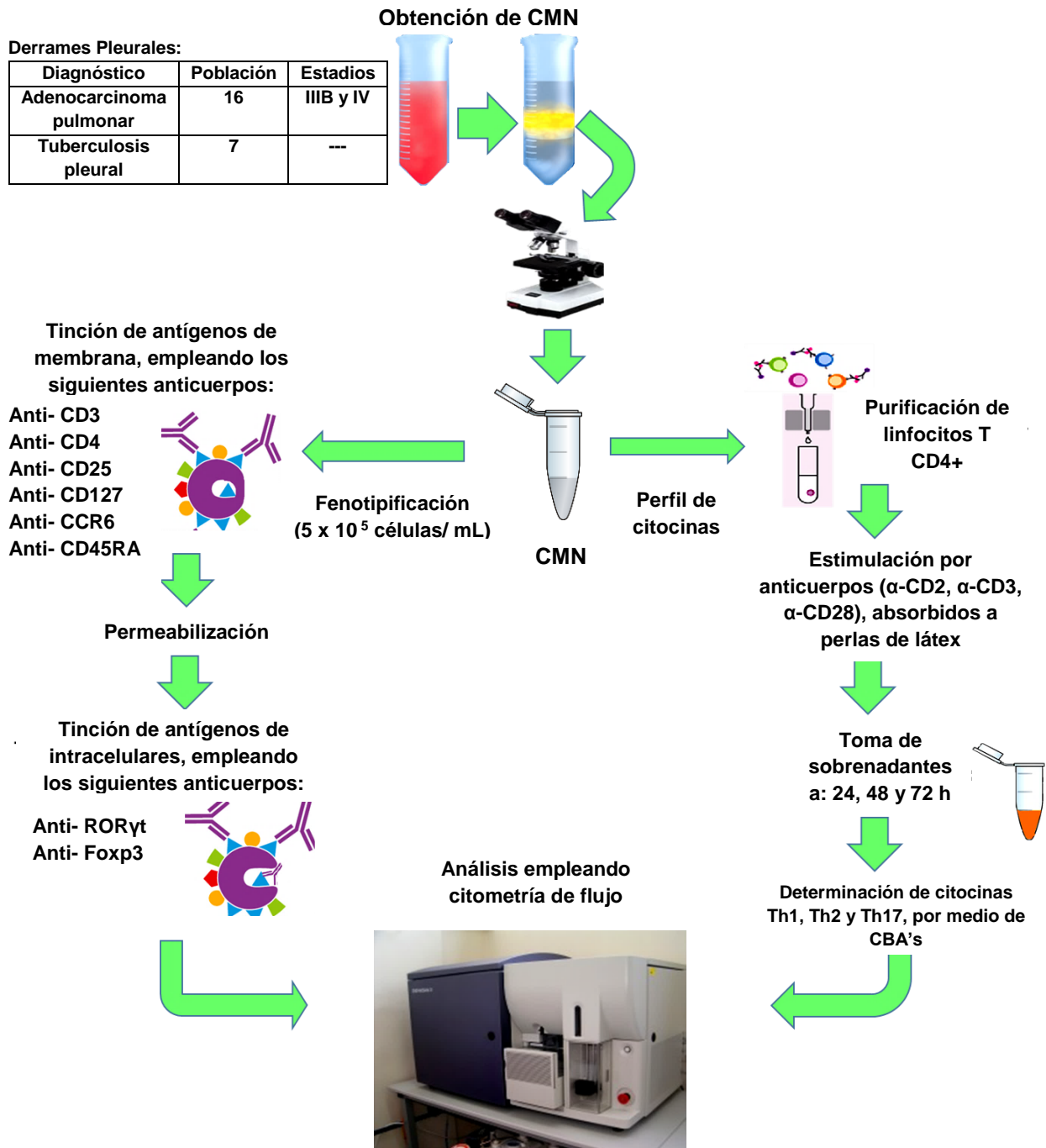
Determinar el porcentaje de linfocitos Tregs y Th17 empleando diferentes marcadores celulares en muestras de pacientes con cáncer pulmonar que han desarrollado derrame pleural.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar el porcentaje de linfocitos Tregs por medio de los marcadores celulares CD25, CD127 y Foxp3.
- Identificar el porcentaje de linfocitos Th17 por medio de los marcadores celulares CD4 y ROR γ .
- Determinar el fenotipo de los linfocitos Th17 por medio de los marcadores moleculares CCR6 y CD127.
- Purificar los linfocitos T CD4+ provenientes de los derrames pleurales de pacientes diagnosticados con cáncer pulmonar y tuberculosis.
- Estimulación poblacional de los linfocitos T CD4+ purificados, a través de perlas de activación.
- Determinar el perfil de citocinas Th1, Th2 y Th17, producido por los linfocitos T CD4+ provenientes de derrames pleurales malignos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estrategia experimental



Material Biológico

Se incluyeron muestras de 25 pacientes diagnosticados con adenocarcinoma pulmonar y de 3 pacientes con mesotelioma; ambos tipos de pacientes desarrollaron derrame pleura. La edad promedio de los pacientes fue de 58 años con un intervalo de edad de 40 a 76 años. Como grupo de comparación se incluyeron 7 muestras de pacientes con tuberculosis que desarrollaron derrame pleural. La edad promedio fue de 50 años con un intervalo de edad de 30 a 70 años. Las muestras fueron recolectadas antes de que los pacientes recibieran tratamiento.

Separación de células mononucleares (CMN)

Los derrames pleurales fueron obtenidos por toracocentesis aséptica realizada por personal médico del INER. Los derrames fueron recolectados en matraces con heparina. El líquido fue centrifugado a 2500 rpm por 15 min. Del paquete celular obtenido se separaron las células mononucleares (CMN) y las células tumorales provenientes del líquido pleural mediante gradientes discontinuos de Ficoll (Lymphoprep, Axis-Shield), centrifugando a 1500 rpm por 30 min. Tanto las CMN como las CT (células tumorales) fueron recolectadas de cada interface y lavadas dos veces con medio RPMI-1640 (Medio Roswell Park Memorial Institute-1640). Las CMN se congelaron en nitrógeno líquido hasta su posterior uso.

Fenotipificación de linfocitos Th17 y Tregs por la técnica de cantidades mínimas de anticuerpos (Microescala)

El fundamento de la técnica de microescala se basa en que la cantidad promedio de antígenos en una célula oscila entre 10,000 a 100,000 moléculas, por lo que si se agregan 0.2 µg de anticuerpos (que representa alrededor de 8×10^{11} moléculas de anticuerpos), se encontraría en exceso la cantidad de anticuerpos dirigidos a antígenos blanco presentes en 2 millones de linfocitos.⁽⁴⁵⁾ La técnica de microescala tiene como objetivo disminuir la cantidad de anticuerpos como el volumen final de tinción, utilizando 0.2 µg de cada anticuerpo en un volumen final de 20 µL. Con este procedimiento se obtuvo un patrón similar de fluorescencia y la misma distribución de conjuntos celulares que al utilizar la

metodología estándar, donde se colocaba 1 µg de cada anticuerpo en un volumen final de 100 µL. ⁽⁴⁵⁾

Las CMN fueron descongeladas y lavadas en medio RPMI-1640. Se ajustó la concentración celular a 5×10^5 células/mL. Las células se lavaron a 2000 rpm durante 4 min con solución salina amortiguadora de fosfatos conteniendo 1% de albúmina sérica bovina (BSA) y 0.1% de NaN₃ (PBS/BSA). Se retiró el sobrenadante y el botón celular fue resuspendido. Posteriormente se llevó a cabo la tinción para los antígenos de membrana utilizando la técnica de microescala. Los anticuerpos utilizados y sus combinaciones fueron:

- Para identificar a los linfocitos T CD4+ se utilizaron los anticuerpos anti-CD3 PE-TEXAS Red (clona 7D6, Invitrogen, USA) y anti-CD4 Alexa 700 (clona OKT4, BioLegend, San Diego CA)
- Para distinguir a los linfocitos Tregs se utilizaron los anticuerpos anti-CD25 PercP5.5 (clona BC96, BioLegend, San Diego CA), anti-CD127 Alexa 647 (clona 0323, BioLegend, San Diego CA) y anti-Foxp3 Alexa 488 (clona150D, BioLegend, San Diego CA)
- Para distinguir a los linfocitos Th17 se utilizaron los anticuerpos anti-CCR6 Alexa 488 (clona TG7/CCR6, BioLegend, San Diego CA), anti-CD45RA PECy7 (clona DREG-56, BioLegend, San Diego CA) y anti-RORyt PE (clona AFKJS-9, eBioscience, Santa Clara CA)
- Se emplearon los correspondientes controles de isotipo para los marcadores CD25, CD127, Foxp3 y RORyt. También se incluyeron controles adicionales para delimitar las regiones correspondientes de los linfocitos utilizando FMO's (Fluorescence Minus One) para cada marcador.

Las muestras fueron incubadas en oscuridad, a temperatura ambiente (TA) y con agitación constante, durante 30 min. Posteriormente las células fueron lavadas con buffer PBS/BSA. El botón celular fue resuspendido en 200 µL de la disolución de permeabilización Foxp3 Fix/Perm 1x (BioLegend, San Diego CA). Las muestras fueron incubadas en las mismas condiciones antes mencionadas durante 5 min. Pasado el tiempo, las muestras fueron lavadas con PBS/BSA y posteriormente se les realizó un segundo lavado con 500µL de la disolución Foxp3 Perm Buffer 1x (BioLegend, San Diego CA). El botón celular obtenido

fue resuspendido en 200 μ L de la disolución antes mencionada y se incubó bajo las mismas condiciones, durante 15 min. Posteriormente se retiró el sobrenadante y se llevó a cabo la tinción contra antígenos intracelulares utilizando los anticuerpos: anti-Foxp3 y anti-ROR γ t, que distinguen a los linfocitos Tregs y Th17 respectivamente. Las muestras fueron incubadas durante 30 min y posteriormente lavadas con PBS/BSA. Finalmente se fijaron con 250 μ L de paraformaldehído al 1%. Las muestras se analizaron por citometría de flujo.

Purificación de los linfocitos T CD4+

A partir de las CMN (provenientes de los derrames pleurales) se purificaron los linfocitos T CD4+ mediante selección negativa empleando el kit CD4+ T cell Isolation Kit II human (MACS). Este kit está conformado por dos tipos de componentes:

- Biotin Antibody Cocktail, el cual contiene los anticuerpos: anti-CD8, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD36, anti-CD56, anti-CD123 y glucoforinas, que están conjugados con biotina.
- Anti-biotin Microbeads, el cual contiene anticuerpos anti-biotina que están absorbidos a microperlas de látex.

A las CMN se agregaron 10 μ L del reactivo (Biotin Antibody Cocktail, MACS) y 40 μ L de la disolución salina amortiguadora de fosfatos conteniendo 0.5% de albúmina sérica bovina (BSA) y 2 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ahora denominado PBS/BSA/EDTA. Se incubó en oscuridad con hielo y agitación constante, durante 10 min. Posteriormente se adicionaron 20 μ L del reactivo (Anti- biotin Microbeads, MACS) y 30 μ L de la disolución de PBS/BSA/EDTA. La muestra se incubó bajo las condiciones antes mencionadas, durante 15 min. Las células fueron lavadas y el botón celular se resuspendió en 500 μ L de la disolución PBS/BSA/EDTA. A continuación se colocó la muestra en una columna magnética donde las CMN marcadas por los anticuerpos se quedaron retenidas en el campo magnético de la columna, dejando pasar a los linfocitos T CD4+. Finalmente, se llevaron a cabo varios lavados con la solución PBS/BSA/EDTA, se retiró la columna del magneto y por fuerza mecánica se recolectó la fracción correspondiente a las células CD4-. A partir de los linfocitos T CD4+ purificados, se llevó a cabo la estimulación a través de perlas de activación.

Estimulación de linfocitos T CD4+

La estimulación de los linfocitos T CD4+ purificados, se realizó mediante perlas de activación empleando el kit T Cell Activation/Expansion (Milteng Biotec). Para llevar a cabo la preparación de las perlas de activación se colocaron 50 µL de cada uno de los anticuerpos (anti-CD2, anti-CD3 y anti-CD28) marcados con biotina, posteriormente se adicionaron 250 µL de perlas de látex recubiertas con anti-Biotina (MACS Bead) y se agregaron 100 µL de PBS estéril. Finalmente, la preparación se incubó en agitación constante, durante 2 h.

Para llevar a cabo la estimulación, se ajustó la concentración de los linfocitos T CD4+ purificados a 5×10^6 células, después se agregaron 10 µL de las perlas de activación (anteriormente preparadas) y se llevó a un volumen final de 500 µL con medio RPMI-1640. Las muestras se colocaron en placas de 48 pozos y se incubaron en atmosfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C durante 72 h. Cada 24 h se tomaron 100 µL del sobrenadante y se agregó 100 µL de medio RPMI-1640 fresco, para reestablecer el volumen de la placa. Esta acción se llevó a cabo hasta completar las 72 h de incubación.

Determinación de citocinas Th1, Th2 y Th17 en sobrenadantes

Se determinó la concentración de citocinas presentes en los sobrenadantes obtenidos a diferentes tiempos (24, 48 y 72 h) durante la estimulación de los linfocitos T CD4+.

Se empleó el kit de CBA Cytometric Bead Array Human Th1/Th2/Th17 Citokine Kit (BD Biosciences), el cual captura las citocinas solubles presentes en los sobrenadantes a través de perlas que contienen anticuerpos específicos contra IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN γ e IL-17A, y son detectadas por medio de un reactivo revelador que incluye anticuerpos conjugados con PE, dirigidos contra las citocinas solubles.

Se colocaron 50 µL de cada perla de captura, 50 µL del sobrenadante y 50 µL del reactivo revelador y se incubó por 3 h a TA en oscuridad. Posteriormente se agregaron 300 µL del buffer proporcionado por el kit.

Las muestras fueron adquiridas a través del citómetro de flujo FACSCanto II, y los resultados fueron analizados por el programa FacsArray para conocer la concentración de cada una de las citocinas.

Análisis de muestras por citometría de flujo

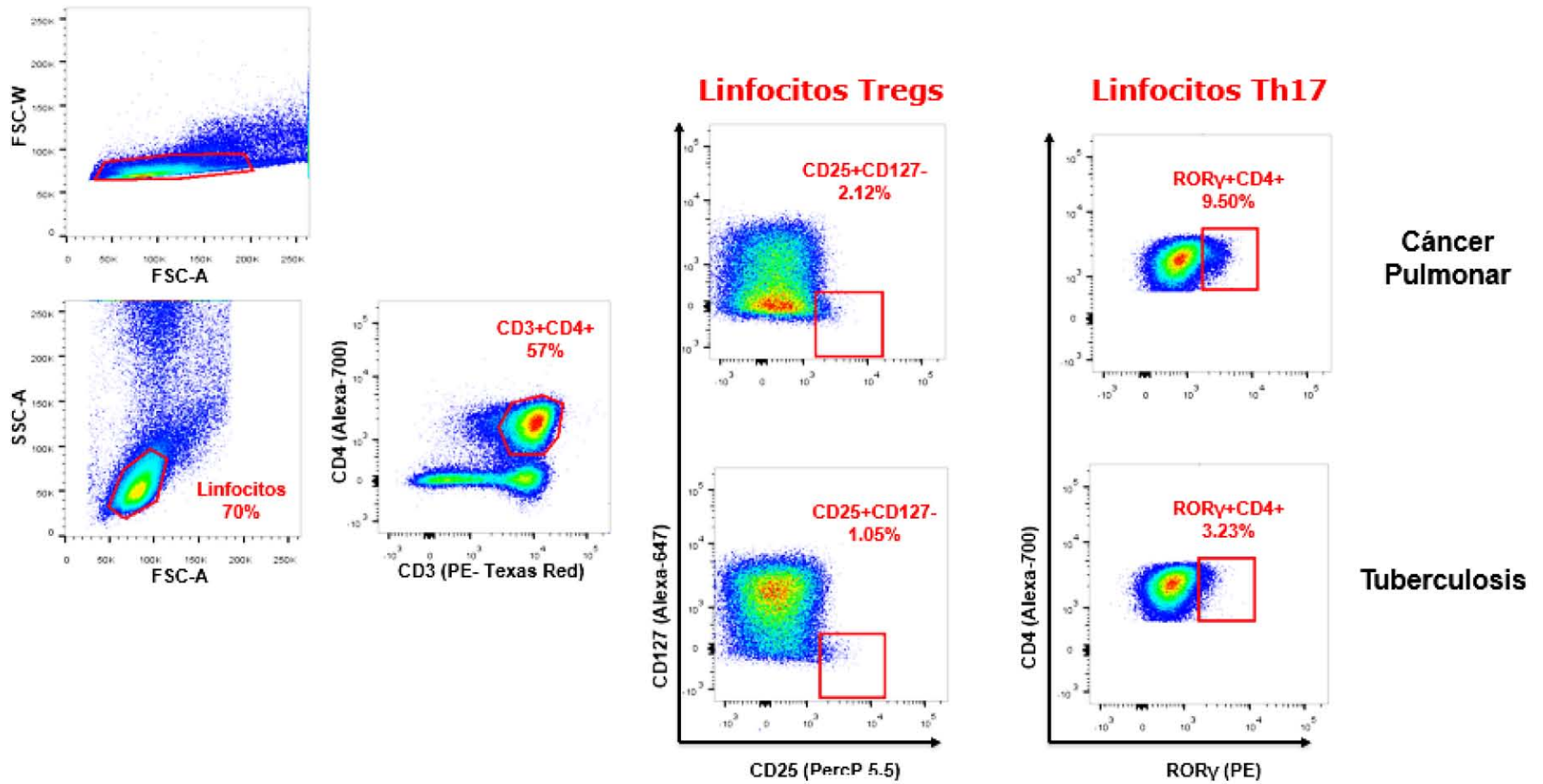
Las muestras fueron adquiridas a través del citómetro de flujo FACSCanto II, y los resultados fueron analizados por el programa FlowJo. En todas las muestras se realizaron las gráficas de:

- Tamaño ancho (FCS-W) vs tamaño área (FCS-A), a partir de la cual se delimitó la región correspondiente a las células individuales eliminando los agregados. A partir de la región seleccionada como células individuales, se graficó tamaño (FCS-A) vs complejidad (SSC-A) y se delimitó la región correspondiente a los linfocitos. A partir de esta región se realizó la gráfica de CD3 vs CD4, donde se ubicó a los linfocitos T CD4+ como CD3+CD4+. Se determinó el porcentaje de linfocitos Tregs como CD25+CD127-, a partir de esta región se observó la expresión del factor de transcripción Foxp3. Por otro lado a partir de la región CD3+CD4+ se determinó el porcentaje de linfocitos Th17 como RORγ+CD4+ (Figura 6). Las regiones se establecieron con respecto a los controles de isotipos o los FMO's para cada marcador.

Análisis estadístico

Para elegir las pruebas estadísticas adecuadas se determinó la distribución de las poblaciones estudiadas, tanto en la determinación de linfocitos Treg como de linfocitos Th17. Las poblaciones mostraron una distribución normal, por lo que las comparaciones realizadas entre la población de pacientes con cáncer pulmonar así como los pacientes con tuberculosis, fueron mediante la prueba t-Student. Se consideró una $p < 0.05$ como nivel de significancia estadística.

Figura 6. Análisis representativo para la determinación de los porcentajes de linfocitos Treg y Th17 en derrames pleurales de pacientes con cáncer pulmonar y tuberculosis. Los cuadrantes fueron establecidos con respecto a los controles de isotipo y los FMO's.



RESULTADOS

Determinación del fenotipo de los linfocitos T reguladores (Tregs)

A partir de la población de linfocitos T CD3+CD4+ se determinó el porcentaje de los linfocitos T reguladores (Tregs) presentes en los derrames pleurales provenientes de pacientes diagnosticados con cáncer pulmonar y tuberculosis, (grupo incluido para evaluar si la presencia de los linfocitos Tregs y Th17 se debe al proceso de inflamación crónica o a la patología maligna).

La identificación de los linfocitos Tregs se llevó a cabo por medio de la molécula CD25; no obstante, ya que esta molécula no es un marcador específico de los linfocitos Tregs también se empleó la molécula CD127, debido a que se ha reportado que los linfocitos Tregs expresan este receptor en bajas cantidades.⁽⁵⁰⁾ Se detectó a nuestra población de interés con el fenotipo CD3+CD4+CD25+CD127-. A partir de esta población, se corroboró la expresión del factor de transcripción Foxp3 por los linfocitos Tregs. El análisis representativo se muestra en la Figura 7.

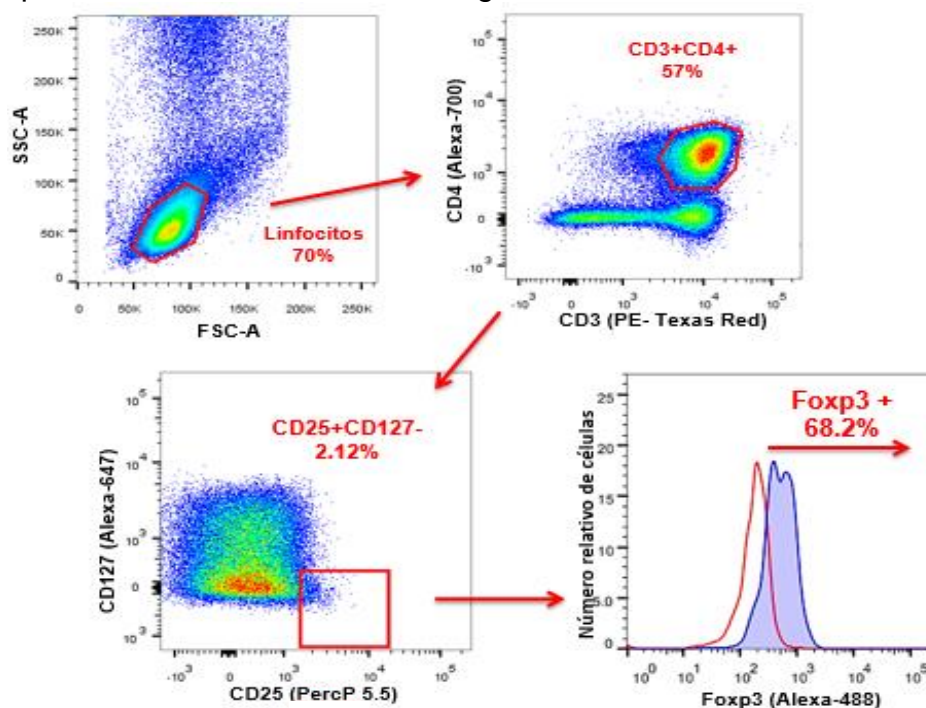


Figura 7. Identificación de los linfocitos Tregs. Se identificó a los linfocitos en función de sus características, tamaño (FCS-A) vs complejidad (SSC-A); se seleccionó el cuadrante correspondiente a los linfocitos T (CD3+CD4+) y finalmente se identificaron a los linfocitos Tregs CD25+CD127-. A partir de esta población se corroboró la expresión de Foxp3+. En el histograma se representa, en color rojo al control de isotipo y en color azul a los linfocitos Tregs.

Los resultados del porcentaje de linfocitos Tregs provenientes de los derrames pleurales de origen maligno y tuberculoso muestran que en ambas enfermedades los linfocitos Tregs fueron similares (ver Figura 8). Se observó una tendencia no significativa a presentar más linfocitos Tregs en el grupo de cáncer con respecto a tuberculosis.

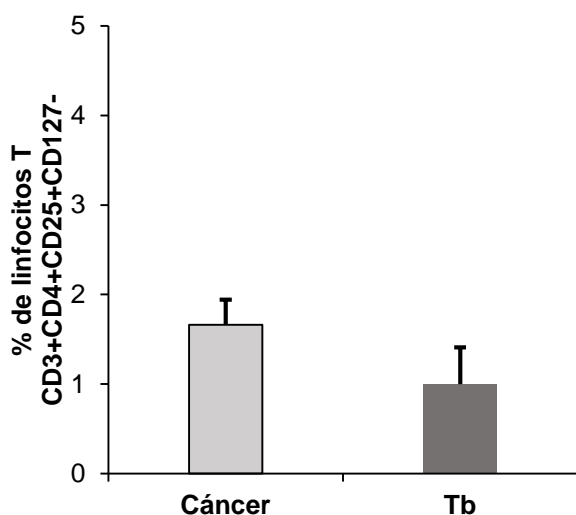


Figura 8. Porcentaje de linfocitos Tregs (CD3+CD4+CD25+CD127-) provenientes de pacientes con cáncer pulmonar (n=16) y con tuberculosis (n=7) que desarrollaron derrame pleural. Se indica la media y el error estándar.

Determinación del fenotipo de los linfocitos Th17

Para la identificación de los linfocitos Th17 provenientes de los derrames pleurales de origen maligno o tuberculoso, se empleó al factor de transcripción ROR γ t, ya que se ha considerado un marcador exclusivo de estos linfocitos T⁽⁵⁵⁾ (Figura 9).

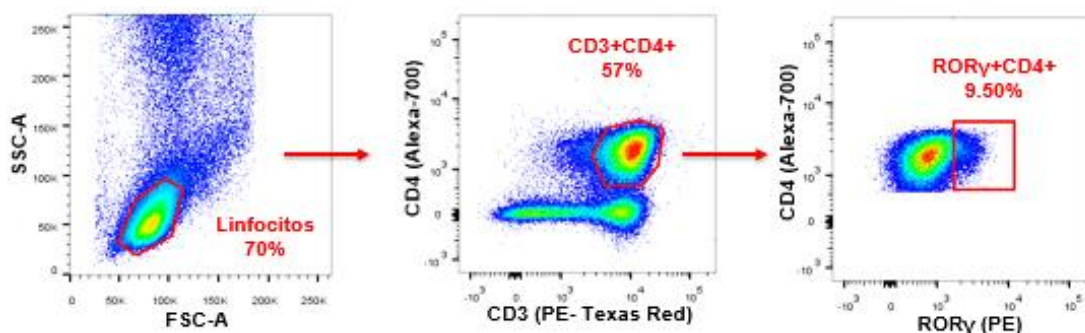


Figura 9. Identificación de los linfocitos Th17. A partir del gráfico tamaño vs complejidad (FCS-A vs SSC-A), se seleccionó a la población correspondiente a los linfocitos T debido a que expresan el fenotipo CD3+CD4+. Finalmente se identificó a los linfocitos Th17 por el fenotipo ROR γ +CD4+.

Posteriormente se realizó la comparación de los porcentajes de linfocitos Th17 (CD4+RORγt+) presentes en ambos grupos de estudio. En la figura 10 se observó que el porcentaje de linfocitos Th17, provenientes de los derrames pleurales ocasionados por cáncer pulmonar, fue alrededor del 10%. Este porcentaje no fue significativamente diferente al presentado por el grupo de tuberculosis.

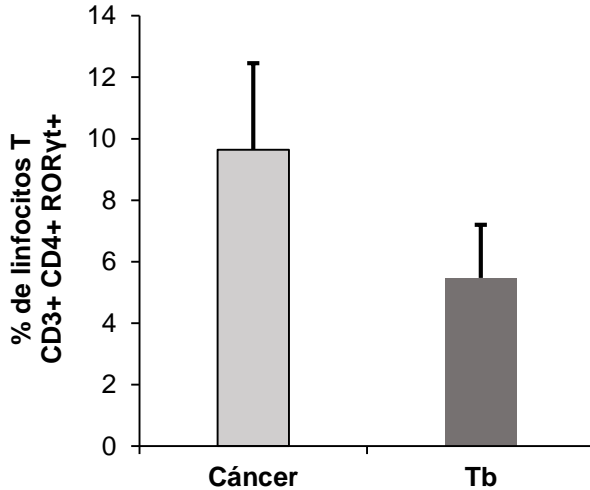


Figura 10. Porcentaje de linfocitos Th17 (CD3+CD4+RORγt+). En muestras provenientes de derrames pleurales de pacientes diagnosticados con cáncer pulmonar (n=16) y tuberculosis (n=7). Se graficó la media y el error estándar.

Adicionalmente las medias de los porcentajes obtenidos en la identificación de los linfocitos Tregs y los linfocitos Th17 fueron comparados en los pacientes con cáncer pulmonar y tuberculosis (Figura 11). Observándose que el porcentaje de linfocitos Th17 fue mayor con respecto al porcentaje de linfocitos Tregs en ambas enfermedades, lo que sugiere que el proceso de inflamación crónica se está viendo favorecido.

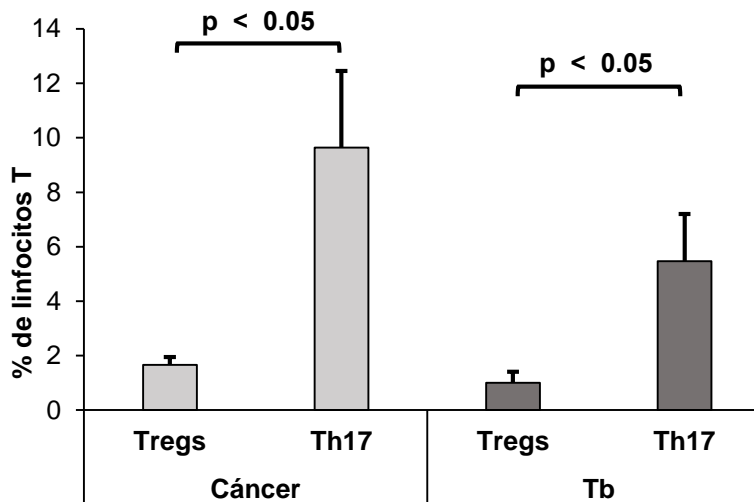


Figura 11. Porcentaje de linfocitos Tregs y Th17 en ambos grupos de estudio. Los linfocitos Tregs fueron identificados con el fenotipo CD3+CD4+CD25+CD127- y los linfocitos Th17 se identificaron con el fenotipo CD3+CD4+RORγ+. Se graficó la media y el error estándar.

Posteriormente se determinó el fenotipo que los linfocitos Th17 presentaron en los derrames pleurales de cáncer pulmonar y tuberculosis, esto se llevó a cabo por medio de la identificación de los marcadores CCR6 (receptor de la quimiocina CCL20) y CD127 (molécula expresada en la superficie de los linfocitos T naïve y en los linfocitos T de memoria). Los resultados se muestran en la figura 12.

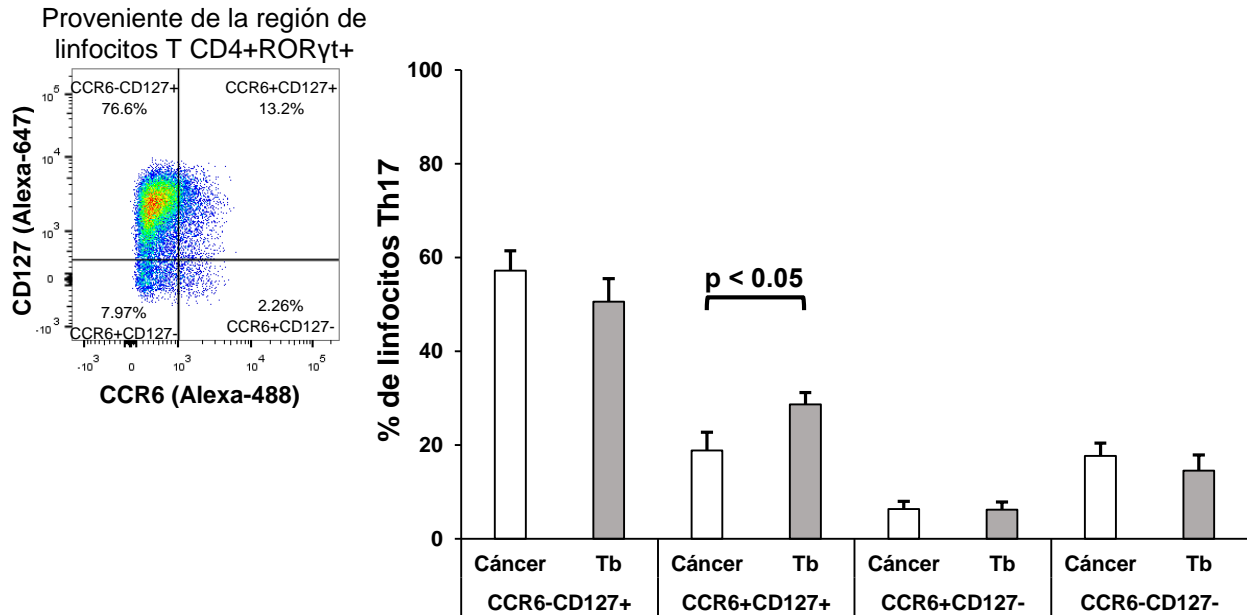


Figura 12. Fenotipo de los linfocitos Th17. A partir de la población de linfocitos T CD4+RORγt+ se observó la expresión de los marcadores moleculares CCR6 y CD127; tanto en pacientes con cáncer pulmonar (n=16) como en Tuberculosis (n=7). Se graficó la media y el error estándar.

Los resultados muestran que los linfocitos Th17 se encontraron presentes en ambas enfermedades expresando un fenotipo predominantemente de memoria por la ausencia del marcador CD45RA- (Datos no mostrados). Por otro lado, en ambos grupos de estudio se identificaron los fenotipos CCR6-CD127+, CCR6+CD127- y CCR6-CD127-; sin embargo, hubo un porcentaje significativamente menor de linfocitos Th17 con fenotipo CCR6+CD127+ en cáncer con respecto al grupo de tuberculosis.

Determinación del perfil de citocinas Th1, Th2 y Th17 en los sobrenadantes

Se determinó la concentración de las citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN γ e IL-17 A, secretadas a partir de los linfocitos T CD4+ purificados y estimulados empleando perlas recubiertas con anti-CD2, anti-CD3 y anti-CD28 a diferentes. (Ver Figura 13).

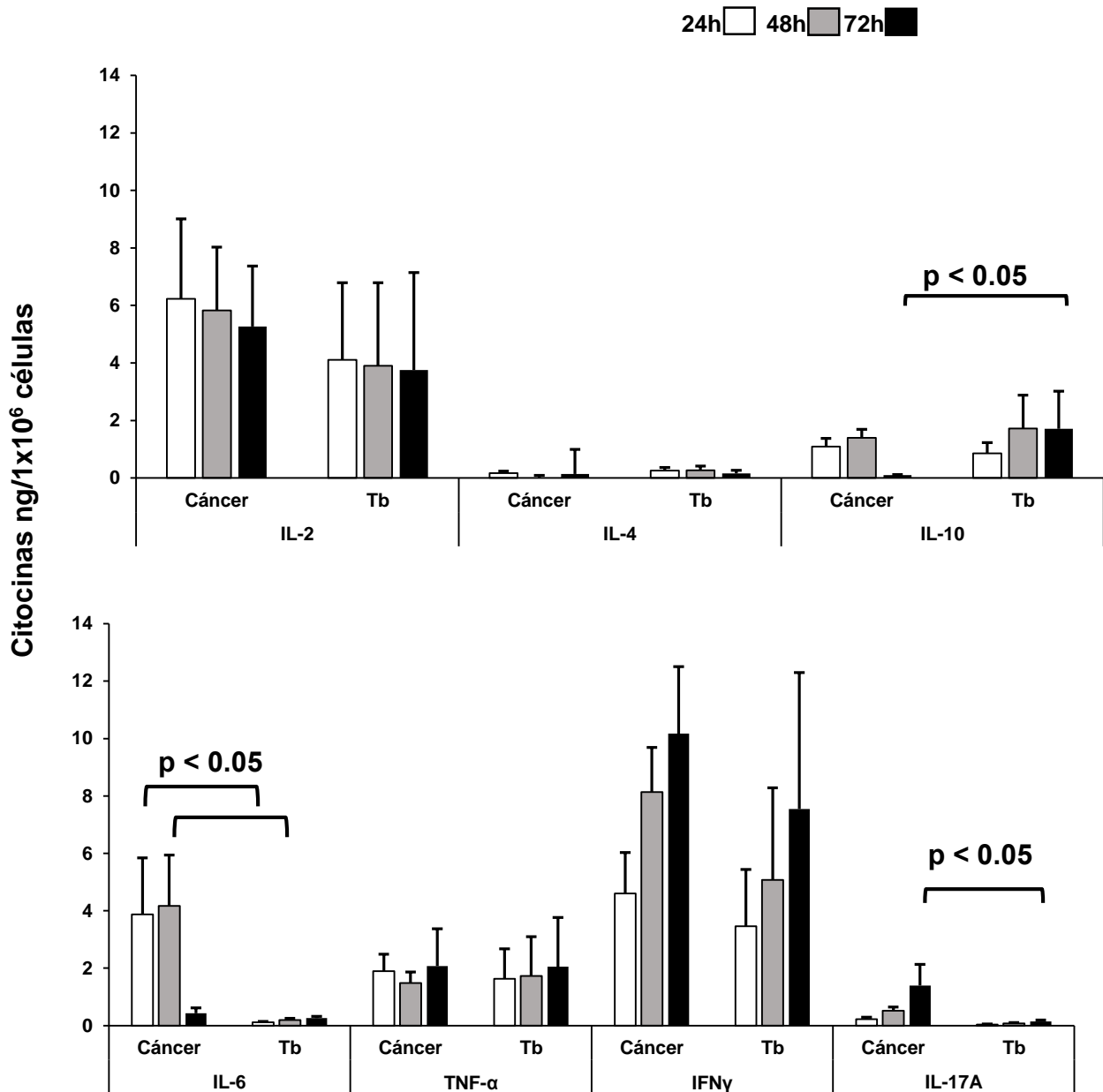


Figura 13. Determinación de las citocinas secretadas por los linfocitos T CD4+ estimulados con perlas de activación. Se graficó la media y el error estándar; la población de pacientes con cáncer pulmonar fue n= 11 y la población de pacientes con tuberculosis fue de n= 5.

Los resultados mostraron que la IL-2 fue secretada por los linfocitos T CD4+ provenientes de ambas enfermedades y su concentración disminuyó con respecto al tiempo de estimulación. Por otro lado se observó que es mínima la secreción de IL-4 en ambos grupos de estudio. Con respecto a la IL-10, en el grupo de cáncer se observó que a las 72h de estimulación, la concentración de esta citocina disminuyó significativamente, en contraste con el grupo de tuberculosis, en donde la secreción de la IL-10 fue constante a las 48 y 72h de estimulación. De igual manera se observó que en el grupo de cáncer, la secreción de la IL-6 por los linfocitos T CD4+, alcanza su pico máximo de concentración a las 48h de estimulación, observándose que a las 72h estos linfocitos disminuyen la producción de esta citocina. En contraste con el grupo de tuberculosis donde se observó diferencia significativa en la concentración de la IL-6 a las 48 y 72h de estimulación. Con respecto al TNF- α se encontró que es secretado por los linfocitos T CD4+ provenientes de ambas enfermedades. Por otro lado, se observó que la concentración del IFN γ aumenta con respecto al tiempo de estimulación; sin embargo, se observó que en el grupo de cáncer la concentración de esta citocina tendió a aumentar con respecto al grupo de tuberculosis. Finalmente, se encontró que a las 72h de estimulación los linfocitos T CD4+ provenientes del grupo de cáncer, aumentaron significativamente la secreción de la IL-17 A con respecto al grupo de tuberculosis donde la secreción de esta citocina fue mínima.

DISCUSIÓN

Se ha reportado que una de las poblaciones celulares predominantes en los derrames pleurales malignos son los linfocitos T CD4+.^(3, 57) Anteriormente se había considerado que dentro de esta población de linfocitos se encontraban predominantemente a los linfocitos Th1 y Th2.⁽⁵⁷⁾ Sin embargo, se ha encontrado que el 45% corresponden a linfocitos Th1 y el 1% corresponden a linfocitos Th2.⁽⁴²⁾ El porcentaje restante se ha atribuido a otras subpoblaciones de linfocitos T CD4+. Por otro lado, se ha reportado que los linfocitos Tregs y Th17, también llevan a cabo una función crítica frente al cáncer.^(52, 57, 58) Por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de los linfocitos Tregs y Th17 en los derrames pleurales de origen maligno.

En estudios recientes se ha observado que los linfocitos Tregs no solo desempeñan una función crítica en el control de las enfermedades autoinmunes, sino que también desempeñan un papel clave en el desarrollo y la progresión de las células tumorales.⁽⁵²⁾ Dos pruebas que sustentan esta aseveración son, en primer lugar, que se ha encontrado que el porcentaje de los linfocitos Tregs, provenientes de sangre periférica de pacientes diagnosticados con algún tipo de cáncer se encuentra incrementado con respecto al porcentaje de linfocitos Tregs provenientes de sujetos sanos,^(2, 61) y en segundo lugar, se ha asociado que la presencia de los linfocitos Tregs en estadios tempranos son de mal pronóstico.^(2, 27) Por lo que en los derrames pleurales de los pacientes con cáncer de pulmón se había propuesto que el ambiente era predominantemente supresor.^(36, 54)

DeLong y cols.⁽¹⁴⁾ reportaron un aumento en la población de linfocitos Tregs provenientes de los derrames pleurales de pacientes con cáncer pulmonar con respecto a derrames pleurales originados por cáncer de mama y mesotelioma. Sin embargo, en dicho estudio se fenotipificó a las células reguladoras como linfocitos T CD4+CD25+. Chen y cols.⁽¹²⁾ también observó un fenómeno similar en derrames pleurales de pacientes con cáncer pulmonar, donde reportaron que los linfocitos Tregs se presentaban alrededor del 20% de la población linfocitaria, y se analizó la expresión para el transcritto de Foxp3. Nuestros datos contrastan con lo previamente reportado

puesto que la molécula CD25 no solo se expresa en los linfocitos Tregs sino que también en linfocitos T activados. Por lo que en el presente estudio excluimos dicha posibilidad utilizando una combinación de marcadores más estricta.

No existen a la fecha estudios previos que comparen la presencia de linfocitos Tregs en derrames pleurales causados por cáncer pulmonar con respecto a tuberculosis. En ambas patologías se observó una baja proporción de linfocitos Tregs, lo que sugiere que en el compartimiento pleural el proceso inflamatorio se está viendo favorecido.

Por otro lado, los linfocitos Th17 son una subpoblación de linfocitos T CD4+ que se caracterizan por sintetizar y liberar IL-17.^(31, 58) En los últimos años se ha reportado la presencia de los linfocitos Th17 en diversos tipos de cáncer.^(17, 46, 48, 56) La función que llevan a cabo estos linfocitos aun es controversial, ya que su presencia se ha asociado a procesos pro y anti-tumorales.⁽⁵⁸⁾ Por lo que es necesario estudiar a esta población de linfocitos en el microambiente tumoral.

La determinación de los linfocitos Th17, presentes en los derrames pleurales de pacientes diagnosticados con cáncer pulmonar, se llevó a cabo por medio de la identificación de su factor de transcripción ROR γ t, debido a que su activación permite la diferenciación de los linfocitos T naïve hacia los linfocitos Th17.⁽³¹⁾ Zhi-Jiang y cols previamente reportaron que los linfocitos CD4+IL17+ se encuentran incrementados en los derrames pleurales malignos con respecto a los linfocitos encontrados en la sangre periférica de los mismos pacientes. Los autores atribuyen dicho fenómeno a que el tumor favorece la diferenciación de las células Th17 en el compartimiento pleural, así como la presencia de las quimiocinas CCL20 y CCL22 que reclutan a dicha subpoblación.⁽³⁴⁾ Sin embargo, nuestros resultados sugieren que la presencia de los linfocitos Th17 se debe al proceso inflamatorio más que a la presencia del tumor, dado que encontramos porcentajes similares de células Th17 en el compartimiento pleural de los pacientes con cáncer pulmonar con respecto a los pacientes con tuberculosis. Se ha reportado una relación antagónica entre los linfocitos Th17 y los linfocitos Tregs.^(57, 60) En un microambiente en donde se ve favorecido la presencia de los linfocitos Th17, la población de linfocitos Tregs se ve disminuida. Nuestros resultados sugieren que en el compartimiento pleural predomina un ambiente pro-inflamatorio mediado por linfocitos Th17.

El fenotipo que los linfocitos Th17 presentan en los derrames pleurales causados por cáncer, es predominantemente de memoria (CD45RA⁻). Además, se encontró una subpoblación de linfocitos Th17 que expresaban el fenotipo CCR6⁺CD127⁺. Estos linfocitos podrían corresponder a linfocitos Th17 de memoria que fueron reclutados al compartimento pleural, este fenómeno podría deberse a que se ha reportado una concentración elevada de CCL20, en las enfermedades que cursan por un proceso inflamatorio.^(21, 37, 59) Este fenómeno también se observó en los linfocitos Th17 provenientes de pacientes con tuberculosis. Por otro lado, en los derrames pleurales de pacientes con cáncer se observó la presencia de los linfocitos Th17 con los fenotipos CCR6⁻CD127⁺ y CCR6⁻CD127⁻, los cuales podrían corresponder a linfocitos de memoria diferenciados in situ, debido a que no expresaron el receptor CCR6. Nuestros datos sugieren que los linfocitos Th17 presentes en los derrames pleurales de los pacientes con cáncer se están diferenciando en el compartimento pleural, mientras que los linfocitos Th17 provenientes de los derrames pleurales de tuberculosis se están reclutando al compartimento pleural.

Posteriormente, evaluamos la funcionalidad de los linfocitos T CD4⁺ provenientes de ambos grupos de estudio, por medio del análisis de la concentración de citocinas secretadas. Nuestros resultados indican que los linfocitos T CD4⁺ provenientes de los pacientes con cáncer pulmonar presentan un perfil pro-inflamatorio en contraste con los linfocitos T CD4⁺ provenientes de los pacientes con tuberculosis.

En los derrames pleurales de los pacientes con cáncer pulmonar se observó que el proceso de inflamación persiste. Esto se debió a que los linfocitos T CD4⁺ van secretando, en mayor cantidad las citocinas TNF- α e IFN- γ , con respecto al tiempo de estimulación. Además de que, en el grupo de cáncer, se observó un aumento en la concentración de la IL-6, una de las citocinas indispensables para la diferenciación de los linfocitos Th17 ^(38, 51, 59). Por lo que el incremento de esta citocina en el ambiente tumoral se podría asociar con el porcentaje elevado de los linfocitos Th17 en el grupo de cáncer. Aun cuando se observó la disminución de los niveles de IL-6 a las 72h, este resultado se podría asociar a que esta citocina está siendo utilizada por los linfocitos Th17 presentes en el cultivo, los cuales secretaron IL-17 después de las 72h de estimulación. Dicho fenómeno no se observó en los linfocitos T CD4⁺ provenientes de

los derrames pleurales de los pacientes con tuberculosis. Por lo tanto la presencia de IL-17, es un indicador más de que los linfocitos Th17 se encuentran en el sitio del tumor, y que se está viendo favorecido el proceso de inflamación.

Con respecto al grupo de tuberculosis, los linfocitos T CD4+ secretan en una cantidad mínima IL-6 e IL-17 A. Lo que podría explicar que en el grupo de tuberculosis, el porcentaje de linfocitos Th17 es menor con respecto al grupo de cáncer. Con lo que respecta a la IL-10 se puede observar que los linfocitos T CD4+, provenientes de ambos grupos de estudio, secretan esta citocina. Sin embargo, en el grupo de tuberculosis la secreción de la IL-10 es constante a las 48 y 72h de estimulación, en contraste con el grupo de cáncer en la cual la secreción de la IL-10 disminuye a las 72h de estimulación, lo cual sugiere que los linfocitos Th17 están inhibiendo a las células productoras de IL-10. Dado que hay un reducido porcentaje de células Tregs en ambos grupos de estudio, la secreción de IL-10 podría deberse a la presencia de linfocitos Th3.

En resumen, aun cuando por fenotipificación el porcentaje de linfocitos Th17 y Tregs es semejante en ambas enfermedades, al analizar el perfil de citocinas secretadas por los linfocitos T CD4+ nuestros datos sugieren que en cáncer, el tumor favorece un ambiente pro-inflamatorio. La presencia de las quimiocinas (CCL20 y CCL22) y las citocinas (IL-1, IL-6, TGF- β) en el ambiente tumoral, podrían reclutar y diferenciar a más linfocitos Th17 al sitio tumoral. Lo que sugiere que las células tumorales utilizan a estos linfocitos para favorecer su crecimiento. Sin embargo, se necesita realizar estudios complementarios para determinar la relación de los linfocitos Tregs y Th17 en estadios tempranos del cáncer pulmonar. En ese sentido se esperaría observar y entender cuál es la relación de estos linfocitos en etapas tempranas y como se van desarrollando conforme a la evolución de la enfermedad. Esto podría permitir la utilización de nuevas terapias bloqueando la presencia de los linfocitos Th17.

CONCLUSIONES

- En los derrames pleurales, tanto de cáncer pulmonar como de tuberculosis, se observó un aumento en el porcentaje de linfocitos Th17 con respecto al porcentaje de linfocitos Tregs.
- El fenotipo que predominó en los linfocitos Th17 fue de memoria; sin embargo, se observó una pequeña población de linfocitos Th17 con fenotipo efector.
- En cáncer pulmonar los linfocitos T CD4+ favorecieron el proceso de inflamación debido a la secreción de la IL-6, IFN- γ , TNF- α y la IL-17A.
- Estos resultados sugieren que en estadios avanzados del cáncer pulmonar, el proceso de inflamación crónica favoreció la presencia de los linfocitos Th17 los cuales podrían llevar a cabo una función pro-tumoral.

REFERENCIAS

1. **Abbas A.K, L. A. H., Pillai S.** Cellular and molecular immunology, Séptima Edición.
2. **Abo-Elenein, A., S. E. Elgohary, A. Hashish, and E. El-Halaby.** 2008. Significance of immunoregulatory T cells in different stages of breast cancer patients. *Egypt J Immunol* **15**:145-52.
3. **Aguiar, L. M., L. Antonangelo, F. S. Vargas, M. C. Zerbini, M. M. Sales, D. E. Uip, and P. H. Saldiva.** 2008. Malignant and tuberculous pleural effusions: immunophenotypic cellular characterization. *Clinics (Sao Paulo)* **63**:637-44.
4. **Argente H, Á. M.** 2008. *Semiología Médica. Fisiopatología, Semiotecnia y Propedéutica. Enseñanza basada en el paciente.*, 1ra edición. ed.
5. **Aris, M., M. M. Barrio, and J. Mordoh.** 2012. Lessons from cancer immunoediting in cutaneous melanoma. *Clin Dev Immunol* **2012**:192719.
6. **Bertram, J. S.** 2000. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med* **21**:167-223.
7. **Beyer, M., and J. L. Schultze.** 2006. Regulatory T cells in cancer. *Blood* **108**:804-11.
8. **Bilate, A. M., and J. J. Lafaille.** 2012. Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance. *Annu Rev Immunol* **30**:733-58.
9. **Blanpain, C.** 2013. Tracing the cellular origin of cancer. *Nat Cell Biol* **15**:126-34.
10. **Brambilla, E., W. D. Travis, T. V. Colby, B. Corrin, and Y. Shimosato.** 2001. The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J* **18**:1059-68.
11. **Conrad, C., J. Gregorio, Y. H. Wang, T. Ito, S. Meller, S. Hanabuchi, S. Anderson, N. Atkinson, P. T. Ramirez, Y. J. Liu, R. Freedman, and M. Gilliet.** 2012. Plasmacytoid dendritic cells promote immunosuppression in ovarian cancer via ICOS costimulation of Foxp3(+) T-regulatory cells. *Cancer Res* **72**:5240-9.
12. **Chen, Y. Q., H. Z. Shi, X. J. Qin, W. N. Mo, X. D. Liang, Z. X. Huang, H. B. Yang, and C. Wu.** 2005. CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in malignant pleural effusion. *Am J Respir Crit Care Med* **172**:1434-9.
13. **De Monte, L., M. Reni, E. Tassi, D. Clavenna, I. Papa, H. Recalde, M. Braga, V. Di Carlo, C. Doglioni, and M. P. Protti.** 2011. Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *J Exp Med* **208**:469-78.
14. **DeLong, P., R. G. Carroll, A. C. Henry, T. Tanaka, S. Ahmad, M. S. Leibowitz, D. H. Serman, C. H. June, S. M. Albelda, and R. H. Vonderheide.** 2005. Regulatory T cells and cytokines in malignant pleural effusions secondary to mesothelioma and carcinoma. *Cancer Biol Ther* **4**:342-6.
15. **Dunn, G. P., A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old, and R. D. Schreiber.** 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* **3**:991-8.
16. **Globocan** 2008, posting date. <http://www.globocan.iarc.fr/>. [Online.]
17. **Gnerlich, J. L., J. B. Mitchem, J. S. Weir, N. V. Sankpal, H. Kashiwagi, B. A. Belt, M. R. Porembka, J. M. Herndon, T. J. Eberlein, P. Goedegebuure, and D. C. Linehan.** 2010. Induction of Th17 cells in the tumor microenvironment improves survival in a murine model of pancreatic cancer. *J Immunol* **185**:4063-71.
18. **González Parias J.L, D. V. E.** 2012. Foxp3:Master gene controlling the development and function of regulatory cells. *Immunology* **29**:74-84.
19. **Grivennikov, S. I., F. R. Greten, and M. Karin.** 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**:883-99.
20. **Hamai, A., P. Pignon, I. Raimbaud, K. Duperrier-Amouriaux, H. Senellart, S. Huret, J. Y. Douillard, J. Bennouna, M. Ayyoub, and D. Valmori.** 2012. Human T(H)17 immune cells specific for the tumor antigen MAGE-A3 convert to IFN-gamma-secreting cells as they differentiate into effector T cells in vivo. *Cancer Res* **72**:1059-63.
21. **Hirota, K., H. Yoshitomi, M. Hashimoto, S. Maeda, S. Teradaira, N. Sugimoto, T. Yamaguchi, T. Nomura, H. Ito, T. Nakamura, N. Sakaguchi, and S. Sakaguchi.** 2007. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J Exp Med* **204**:2803-12.
22. **Huang, C., and Z. X. Fu.** 2011. Localization of IL-17+Foxp3+ T cells in esophageal cancer. *Immunol Invest* **40**:400-12.

23. **Ikeda, H., L. J. Old, and R. D. Schreiber.** 2002. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev* **13**:95-109.
24. **INC, I. N. d. C.** 2013. Derrame pleural maligno. <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/cuidados-medicos-apoyo/cardiopulmonares/Patient/page3>
25. **INC, I. N. d. C.** 2011. El humo del tabaco en el ambiente y el cáncer. <http://www.cancer.gov/espanol/recursos/hojas-informativas/tabaco/humo-tabaco-ambiente>
26. **INEGI** 2011, posting date. http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2011/cancer1_1.asp?c=2781&ep=51
27. **Jaberipour, M., M. Habibagahi, A. Hosseini, S. R. Habibabad, A. Talei, and A. Ghaderi.** 2010. Increased CTLA-4 and FOXP3 transcripts in peripheral blood mononuclear cells of patients with breast cancer. *Pathol Oncol Res* **16**:547-51.
28. **Jiang, S., and C. Dong.** 2013. A complex issue on CD4(+) T-cell subsets. *Immunol Rev* **252**:5-11.
29. **Kim, R., M. Emi, and K. Tanabe.** 2005. Cancer cell immune escape and tumor progression by exploitation of anti-inflammatory and pro-inflammatory responses. *Cancer Biol Ther* **4**:924-33.
30. **Kolls, J. K.** 2013. CD4(+) T-cell subsets and host defense in the lung. *Immunol Rev* **252**:156-63.
31. **Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, and V. K. Kuchroo.** 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* **27**:485-517.
32. **Kryczek, I., S. Wei, W. Szeliga, L. Vatan, and W. Zou.** 2009. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood* **114**:357-9.
33. **Kryczek, I., K. Wu, E. Zhao, S. Wei, L. Vatan, W. Szeliga, E. Huang, J. Greenson, A. Chang, J. Rolinski, P. Radwan, J. Fang, G. Wang, and W. Zou.** 2011. IL-17+ regulatory T cells in the microenvironments of chronic inflammation and cancer. *J Immunol* **186**:4388-95.
34. **Lara, P. C., Navarro, D., Sáez M.** 2004. *Génética del Cáncer*. <http://www.biocancer.com/journal/224/genetica-del-cancer>
35. **Latarjet M, R. L. A.** 2008. *Anatomía humana, 4ta edición ed.*
36. **Li, H., H. Zhao, J. Yu, Y. Su, S. Cao, X. An, and X. Ren.** 2011. Increased prevalence of regulatory T cells in the lung cancer microenvironment: a role of thymic stromal lymphopietin. *Cancer Immunol Immunother* **60**:1587-96.
37. **Martin-Orozco, N., P. Muranski, Y. Chung, X. O. Yang, T. Yamazaki, S. Lu, P. Hwu, N. P. Restifo, W. W. Overwijk, and C. Dong.** 2009. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity* **31**:787-98.
38. **Miyahara, Y., K. Odunsi, W. Chen, G. Peng, J. Matsuzaki, and R. F. Wang.** 2008. Generation and regulation of human CD4+ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:15505-10.
39. **Mougiakakos, D., Choudhury A., Lladser, A.** 2010. Regulatory T Cells in Cancer. *Advances in cancer research*, 107, 57-117.
40. **Numasaki, M., M. Watanabe, T. Suzuki, H. Takahashi, A. Nakamura, F. McAllister, T. Hishinuma, J. Goto, M. T. Lotze, J. K. Kolls, and H. Sasaki.** 2005. IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. *J Immunol* **175**:6177-89.
41. **OMS,** 2014. <http://www.who.int/cancer/es/>.
42. **Prado-Garcia, H., S. Romero-Garcia, D. Aguilar-Cazares, M. Meneses-Flores, and J. S. Lopez-Gonzalez.** 2012. Tumor-induced CD8+ T-cell dysfunction in lung cancer patients. *Journal of Immunology Research*, 2012.
43. **Qin, X. J., H. Z. Shi, J. M. Deng, Q. L. Liang, J. Jiang, and Z. J. Ye.** 2009. CCL22 recruits CD4-positive CD25-positive regulatory T cells into malignant pleural effusion. *Clin Cancer Res* **15**:2231-7.
44. **Rabinovich, G. A., D. Gabrilovich, and E. M. Sotomayor.** 2007. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* **25**:267-96.
45. **Sharma, D., M. R. Eichelberg, J. D. Haag, A. L. Meilahn, M. J. Muelbi, K. Schell, B. M. Smits, and M. N. Gould.** 2012. Effective flow cytometric phenotyping of cells using minimal amounts of antibody. *Biotechniques* **53**:57-60.

46. **Shen, C. J., Z. H. Yuan, Y. X. Liu, and G. Y. Hu.** 2012. Increased numbers of T helper 17 cells and the correlation with clinicopathological characteristics in multiple myeloma. *J Int Med Res* **40**:556-64.
47. **Stewart, T. J., and M. J. Smyth.** 2011. Improving cancer immunotherapy by targeting tumor-induced immune suppression. *Cancer Metastasis Rev* **30**:125-40.
48. **Su, X., J. Ye, E. C. Hsueh, Y. Zhang, D. F. Hoft, and G. Peng.** 2010. Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells. *J Immunol* **184**:1630-41.
49. **Travis, W. D., E. Brambilla, and G. J. Riely.** 2013. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol* **31**:992-1001.
50. **Vom Berg, J., M. Vrohligs, S. Haller, A. Haimovici, P. Kulig, A. Sledzinska, M. Weller, and B. Becher.** 2013. Intratumoral IL-12 combined with CTLA-4 blockade elicits T cell-mediated glioma rejection. *J Exp Med.* 210: 2803-11
51. **Wang, L., T. Yi, M. Kortylewski, D. M. Pardoll, D. Zeng, and H. Yu.** 2009. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *J Exp Med* **206**:1457-64.
52. **Whiteside, T. L.** 2012. What are regulatory T cells (Treg) regulating in cancer and why?. *Semin Cancer Biol* **22**:327-34.
53. **Whiteside, T. L., and E. K. Jackson.** 2013. Adenosine and prostaglandin e2 production by human inducible regulatory T cells in health and disease. *Front Immunol* **4**:212.
54. **Woo, E. Y., H. Yeh, C. S. Chu, K. Schlienger, R. G. Carroll, J. L. Riley, L. R. Kaiser, and C. H. June.** 2002. Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol* **168**:4272-6.
55. **Yamane, H., and W. E. Paul.** 2013. Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4(+) T cells toward distinct T-helper cell subsets. *Immunol Rev* **252**:12-23.
56. **Yang, L., Y. Qi, J. Hu, L. Tang, S. Zhao, and B. Shan.** 2012. Expression of Th17 cells in breast cancer tissue and its association with clinical parameters. *Cell Biochem Biophys* **62**:153-9.
57. **Yang, W. B., Z. J. Ye, F. Xiang, J. C. Zhang, and Q. Zhou.** 2013. Th17/Treg imbalance in malignant pleural effusion. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* **33**:27-32.
58. **Ye, J., R. S. Livergood, and G. Peng.** 2013. The role and regulation of human Th17 cells in tumor immunity. *Am J Pathol* **182**:10-20.
59. **Ye, Z. J., Q. Zhou, Y. Y. Gu, S. M. Qin, W. L. Ma, J. B. Xin, X. N. Tao, and H. Z. Shi.** 2010. Generation and differentiation of IL-17-producing CD4+ T cells in malignant pleural effusion. *J Immunol* **185**:6348-54.
60. **Ye, Z. J., Q. Zhou, J. C. Zhang, X. Li, C. Wu, S. M. Qin, J. B. Xin, and H. Z. Shi.** 2011. CD39+ regulatory T cells suppress generation and differentiation of Th17 cells in human malignant pleural effusion via a LAP-dependent mechanism. *Respir Res* **12**:77.
61. **Yuan, X. L., L. Chen, T. T. Zhang, Y. H. Ma, Y. L. Zhou, Y. Zhao, W. W. Wang, P. Dong, L. Yu, Y. Y. Zhang, and L. S. Shen.** 2011. Gastric cancer cells induce human CD4+Foxp3+ regulatory T cells through the production of TGF-beta1. *World J Gastroenterol* **17**:2019-27.
62. **Zhang, B., G. Rong, H. Wei, M. Zhang, J. Bi, L. Ma, X. Xue, G. Wei, X. Liu, and G. Fang.** 2008. The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **374**:533-7.