



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE CÉLULAS NK
DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON
CÁNCER DE PULMÓN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ÁNGEL ARTURO GÓMEZ GALLEGOS



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. LOURDES MARÍA BARRERA RAMÍREZ
CIUDAD UNIVERSITARIA, D.F. 2015**



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.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS	5
LISTA DE ABREVIATURAS	6
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	10
I. ANTECEDENTES	12
1.1 <i>Cáncer</i>	12
1.1.1 Epidemiología del cáncer	13
1.2 <i>Cáncer de pulmón</i>	15
1.2.1 Epidemiología del cáncer de pulmón.....	16
1.2.2 Etiología del cáncer de pulmón	18
1.2.3 Clasificación del cáncer de pulmón	20
1.2.3.1 Clasificación histopatológica	20
1.2.3.1.1 Carcinoma pulmonar de células pequeñas (SCLC)	20
1.2.3.1.2 Carcinoma pulmonar de células no-pequeñas (NSCLC).....	21
1.2.3.1.2.1 Adenocarcinoma pulmonar	21
1.3 <i>Sistema inmune y cáncer</i>	23
1.4 <i>Células Natural Killer (NK)</i>	25
1.4.1 Receptor tipo inmunoglobulina killer	28
1.4.2 Receptores tipo lectina-C (CD94/NKG2)	29
1.4.3 Complejo de receptores de citotoxicidad natural	30
1.4.5 Citotoxicidad de las células NK.....	30
1.4.6 Receptores asociados a ITAM.....	31
1.4.6.1 CD16 (FcγRIII).....	31
1.5 <i>Poblaciones inmunosupresoras</i>	31
1.6 <i>Muerte celular inducida</i>	32
1.6.1 Receptores de muerte celular.....	33
1.6.2 Vía intrínseca de la apoptosis.....	34

1.6.3 Vía extrínseca de la apoptosis.....	34
1.6.3.1 Vía Fas/FasL	37
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	39
III. OBJETIVOS	40
IV. HIPÓTESIS	41
V. METODOLOGÍA.....	42
5.1 Población de estudio.....	42
5.2 Pacientes.....	42
5.2.1 Criterios de inclusión	42
5.2.2 Criterios de exclusión	42
5.3 Sujetos sanos	43
5.3.1 Criterios de inclusión	43
5.3.2 Criterio de eliminación	43
5.4 Toma de la muestra y tratamiento.....	43
5.5 Caracterización fenotípica de células NK por citometría de flujo	44
5.6 Expresión intracelular de IFN- γ	44
5.7 Cuantificación de Fas-L por ELISA	44
5.8 Análisis estadístico	44
5.9 Consideraciones éticas.....	45
VI. RESULTADOS.....	46
<i>Características socio-demográficas y clínicas de los pacientes y controles</i>	<i>46</i>
<i>Frecuencia de células NK.....</i>	<i>47</i>
<i>Frecuencia de la expresión del receptor CD95 en células NK.....</i>	<i>48</i>
<i>Frecuencia de la expresión del receptor tipo inmunoglobulina killer CD158b en células NK</i>	<i>50</i>
<i>Evaluación de la expresión de IFN-γ en células NK.....</i>	<i>52</i>
<i>Cuantificación del receptor soluble CD178 en plasma</i>	<i>54</i>
VII. DISCUSIÓN.....	56
VIII. CONCLUSIÓN	63
IX. BIBLIOGRAFÍA	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia y mortalidad por cáncer en el mundo.	14
Figura 2. Incidencia y mortalidad por cáncer en México.	15
Figura 3. Mortalidad por cáncer.	17
Figura 4. Epidemiología del cáncer pulmonar en México.	18
Figura 5. Proceso de carcinogénesis pulmonar.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 6. Subtipos de células NK humanas.	26
Figura 7. Regulación de la respuesta de células NK a través de receptores de inhibición y activación.	27
Figura 8. Receptores de la familia tipo inmunoglobulina killer.	28
Figura 9. Representación esquemática de los receptores tipo lectina-C.	29
Figura 10. Estructura de los NCRs.	30
Figura 11. Vía extrínseca de la apoptosis.	36
Figura 12. Ejemplo comparativo del porcentaje de células NK entre un paciente con adenocarcinoma de pulmón y un sujeto control.	47
Figura 13. Porcentaje de células NK CD3 ⁻ CD56 ⁺ en pacientes con adenocarcinoma de pulmón y sujetos control.	48
Figura 14. Estrategia de análisis para la expresión del receptor CD95 y CD178 en células CD3 ⁻ CD16 ⁺ en pacientes con adenocarcinoma de pulmón y sujetos control.	49
Figura 15. A) Incremento en el porcentaje de expresión del receptor CD95 en células NK de pacientes con adenocarcinoma (n=10) en comparación con controles (n=5).	50
Figura 16. Estrategia de análisis para la expresión de los receptores CD158b y CD158e en pacientes con adenocarcinoma de pulmón y en sujetos control.	51
Figura 17. A) Incremento en el porcentaje de expresión del receptor CD158b en células NK de pacientes con adenocarcinoma (n=10) en comparación con controles (n=5).	52
Figura 18. Estrategia de análisis para la expresión intracelular de INF- γ en células CD3 ⁻ CD56 ⁺ de pacientes con adenocarcinoma y sujetos control.	53
Figura 19. Porcentaje de expresión intracelular de IFN- γ en células NK de pacientes con adenocarcinoma y sujetos control.	54
Figura 20. Concentración plasmática de Fas-L en 44 pacientes antes y después del tratamiento con quimioterapia.	¡Error! Marcador no definido.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características socio-demográficas.....	46
Tabla 2. Características clínicas de los pacientes	46

LISTA DE ABREVIATURAS

CCDA	Citotoxicidad dependiente de anticuerpos
NK	Célula Asesina Natural
IgG	Inmunoglobulina G
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
IFN- γ	Interferón γ
PMA	Acetato de Forbolmiristato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
OMS	Organización Mundial de Salud
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
SCLC	Cáncer de pulmón de células pequeñas
NSCLC	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
TTF-1	Transcriptor tiroideo 1
IASLC	Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alpha
GM-CFS	Factor estimulante de colonia macrófago-granulocito
IL-10	Interleucina 10
IL13	Interleucina 13
LFA-1	Antígeno de función linfocitaria
KIR	Receptor tipo inmunoglobulina killer
ITIM's	Inmunoreceptores de inhibición basados en tirosina
ITAM's	Inmunoreceptores de activación basados en tirosina
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa

ICAD	Inhibidor de caspasaDNAsa activada
IAP's	Proteínas inhibidoras de apoptosis
FADD	Proteína de dominio de muerte asociado a Fas
TRADD	Proteína de dominio de muerte asociado a TNFRS1
DISC	Complejo de inducción de señales de muerte
DED's	Dominios de muerte complementarios
NF- κ B	Factor nuclear κ B
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
APAF-1	Factor de activación de proteasas y apoptosis
PLADS	Dominio de unión de ensamblaje a preligandos extracelulares
ECOG	Grupo oncológico cooperativo del este
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
PBS	Buffer fosfato salino
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

RESUMEN

Cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo y que de manera genérica se caracteriza por la proliferación anormal y desordenada de un grupo de células. Se estima que una de cada cuatro muertes está relacionada con el cáncer.

El cáncer pulmonar es uno de los tumores malignos más frecuentes a nivel mundial. En México el cáncer de pulmón se encuentra entre las tres principales causas de muerte por tumores malignos en adultos mayores de 35 de años.

El desarrollo del cáncer depende en gran medida, de la capacidad de las células tumorales de aprovechar los procesos fisiológicos normales para su beneficio. Uno de estos procesos es la regulación del sistema inmune. La activación de las células del sistema inmune promueve la erradicación del tumor, mientras que su activación crónica beneficia el desarrollo tumoral.

Las células Natural Killer (NK) son linfocitos granulares grandes que cumplen funciones efectoras del sistema inmune innato, como la defensa contra patógenos. Estas células tienen la habilidad de matar directamente células blanco y mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos a través de los receptores de membrana de la porción Fc de la IgG (FcγRIII (CD16)). Estas células son capaces de eliminar células anormales a través de la vía Fas-Fas-L. Esta vía está dirigida específicamente a células blanco que expresen el receptor Fas en su superficie. Una vez que el receptor Fas se une a su ligando Fas-L, se inicia una cascada de señalización que da como resultado la activación de la vía de las caspasas, induciendo apoptosis en la célula blanco.

Diversos estudios demuestran que la expresión de Fas en linfocitos de sangre periférica de pacientes de diversos carcinomas presenta un incremento con respecto a sujetos sanos.

La función de las células NK está determinada por la integración de señales derivadas de la participación de diferentes receptores con ligandos específicos en la célula blanco. Los receptores de las células NK pueden dividirse en receptores de activación e inhibición. Los receptores de inhibición ayudan a discriminar a células sanas de aquellas que sufren

un proceso de transformación a través del reconocimiento de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) clase I.

En el presente trabajo se evaluó la expresión de los marcadores de CD95, CD178, CD158b, CD158e, CD56 al igual que la expresión intracelular de Interferón- γ en muestras sanguíneas provenientes de pacientes con adenocarcinoma pulmonar estadio IV libres de tratamiento.

Al analizar los porcentajes de células NK en pacientes con cáncer de pulmón encontramos una disminución en la frecuencia de estas células en los pacientes. Además, nuestros resultados indican un incremento en la expresión de Fas, pero no así de FasL, en pacientes con adenocarcinoma comparados con controles sanos. Simultáneamente se demostró un incremento en la expresión del receptor CD158b, pero no así en el receptor CD158e, en pacientes con cáncer de pulmón.

A pesar de que las células NK fueron estimuladas con PMA e ionomicina, estas fueron incapaces de producir IFN- γ , lo que podría interferir en la transcripción de señales inmunomoduladoras y antiproliferativas que benefician al desarrollo del tumor.

La suma de estos factores puede potencialmente afectar la actividad y expansión de células NK, lo que beneficiaría el desarrollo tumoral.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón es el tipo de cáncer más extendido en ambos sexos a nivel mundial(1). En México representa la segunda causa de muerte por cáncer y a pesar de los esfuerzos por detectarlo tempranamente, generalmente éste se diagnostica en estadios avanzados con un pronóstico pobre para los pacientes(2). El cáncer de pulmón es la manifestación fenotípica de la acumulación de cambios genéticos que conducen a la activación de protooncogenes e inactivación de genes supresores de tumores que dan como resultado del crecimiento anormal de células en el tejido pulmonar(1).Este crecimiento maligno puede derivar en metástasis e infiltrar a otros tejidos del cuerpo, teniendo por encima de otros tipos de cáncer, un alto grado de malignidad(3).

El sistema inmune es una red interactiva de órganos linfoides, células, factores humorales y citocinas, que tienen la función de defender al organismo de alteraciones que causan un desequilibrio en la homeóstasis(4). La respuesta inmune se divide en dos grupos, la respuesta innata y la respuesta adquirida. La respuesta innata es la primera línea de defensa a través de mecanismos de defensas celulares y moleculares. Uno de los principales componentes de la inmunidad innata son las células NK.

Las células NK son linfocitos que eliminan de forma espontánea células tumorales o células infectadas. Estas células constituyen alrededor del 15% de la población linfoide, son distintas de los linfocitos T y B por lo que no muestran un re-arreglo del receptor de la línea germinal, sus funciones efectoras se rigen por combinaciones de receptores activadores e inhibidores (5).Las células NK son efectoras de la inmunidad innata y adaptativa, participan en la regulación de la respuesta inmune a través de la producción de varias citocinas y quimiocinas (6).

Las células tumorales que expresan moléculas asociadas al estrés celular o con deficiencias en las moléculas de MHC clase I son reconocidas por las células NK y son eliminadas por apoptosis a través de citotoxicidad limitada o por la producción de algunas citocinas que bloquean la formación de nuevos vasos sanguíneos dentro del tumor e inducen la muerte en células tumorales (7).

La habilidad de las células tumorales para sobrevivir es determinada no solo por la velocidad de proliferación celular, también por la tasa de eliminación celular. Esta

resistencia a la muerte celular es adquirida por las células tumorales a través de mutaciones en genes de regulación pro-apoptótica.

La apoptosis es un proceso regulado que involucra la activación de una cascada de eventos moleculares que derivan en la muerte celular. El proceso apoptótico se caracteriza por cambios morfológicos, las células se encogen y se vuelven circulares, la cromatina y proteínas asociadas se condensan en el núcleo y se degradan.

Durante el proceso carcinogénico las células tumorales adquieren resistencia a las señales de inducción de apoptosis. Uno de los mecanismos de evasión de muerte es la expresión y secreción de moléculas tipo Fas, estas moléculas provocan que las células tumorales sean capaces de contraatacar a los linfocitos citotóxicos conduciéndolos a apoptosis(8).

El objetivo de este trabajo fue la evaluación de la expresión de Fas (CD95) y FasL (CD178) en células natural killer de pacientes con carcinoma pulmonar. De igual forma evaluamos la expresión del receptor CD56, CD158b y CD158e, al igual que la expresión de IFN- γ .

I. ANTECEDENTES

1.1 Cáncer

Cáncer es un término genérico que se designa a un amplio grupo de enfermedades que afectan cualquier parte del organismo, se caracteriza por la rápida multiplicación de células que se extienden más allá de sus límites habituales y puede invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos en un proceso conocido como metástasis (OMS).

El cáncer es una enfermedad genética, que implica la alteración de genes que suprimen o estimulan el ciclo celular; donde la mutación, pérdida o inactivación de ciertos genes genera una división celular descontrolada (9).

Se considera que el cáncer es la proliferación anormal de una sola célula que crece por miles, luego por millones y billones, conformando una masa tumoral o neoformación conocida como neoplasia, que tiene la capacidad de invadir los tejidos vecinos, irrumpir en el torrente circulatorio y recorrer el organismo hasta llegar a diversos sitios(10). La capacidad de invasión y metástasis permite a las células tumorales liberarse del tumor primario y colonizar nuevos sitios en el organismo donde no exista limitación de nutrientes.

Las alteraciones celulares en el cáncer son el resultado de interacciones entre factores genéticos, como las lesiones en el DNA durante la replicación o el ataque de especies reactivas de oxígeno, y los agentes externos como los carcinógenos físicos y biológicos (11).

Las principales alteraciones del DNA son en tres tipos de genes: los protooncogenes, los genes supresores de tumores y los genes de estabilidad (12).

Los protooncogenes son genes que codifican para proteínas involucradas en la progresión del ciclo celular, cuando ocurre una mutación en alguno de estos genes, se desencadena un estado de activación permanente que aumenta el potencial oncogénico y se denominan entonces como oncogenes. La inactivación de genes supresores de tumores y de genes de estabilidad, genera inestabilidad y variabilidad genómica que

resulta en células mutantes con ventajas selectivas. La suma de estas modificaciones genéticas produce una proliferación tumoral descontrolada y la extensión de clonas de células transformadas capaces de generar tumores malignos(10).

1.1.1 Epidemiología del cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo; en el 2008, causó 7.6 millones de defunciones (aproximadamente 13% del total) y se prevé que las muertes por cáncer aumenten en todo el mundo hasta alcanzar la cifra de 13.1 millones de defunciones por esta enfermedad en el 2030 (13).

Esta enfermedad es la segunda causa de muerte a nivel global, tan solo detrás de las enfermedades cardiovasculares. Los tumores malignos representan aproximadamente el 15% de las defunciones mundiales, correspondiendo a cerca de 8 millones de muertes por año, de las cuales más del 70% se registran en países en vías de desarrollo (Figura1)(14).

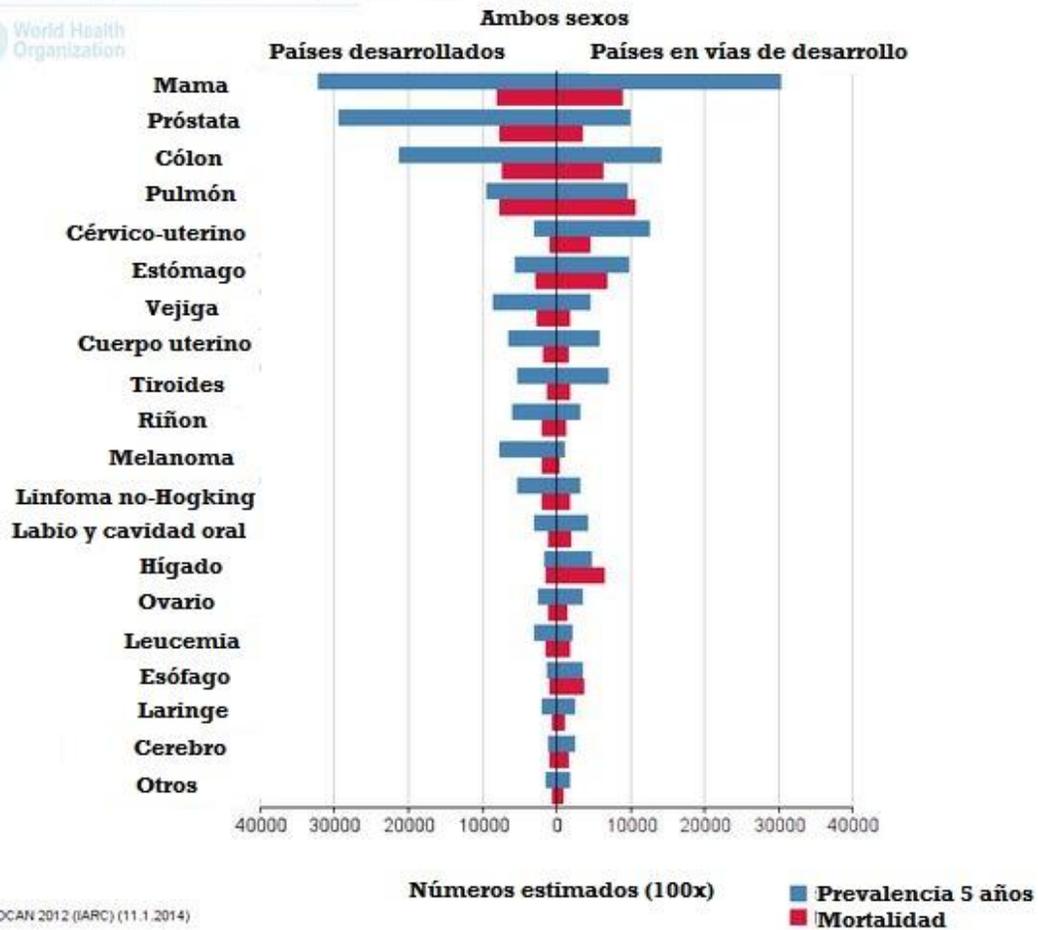


Figura 1. Incidencia y mortalidad por cáncer en el mundo. Casos estimados de incidencia de cáncer y muerte por cáncer (miles) en hombres y mujeres de países desarrollados y en vías de desarrollo en 2012. (Editada de GLOBOCAN 2012.)

En México, cada año se diagnostican en el país cerca de 100 mil nuevos casos, de los cuales aproximadamente dos tercios fallecen por detección tardía o fracaso en el tratamiento(2). Las cifras convierten a este padecimiento en una de las principales causas de muerte en la población mexicana. La tendencia actual indica que esta enfermedad incide aproximadamente en un 55% de mujeres, mientras que un 45% hombres(15). Además en nuestro país, la tasa de defunción por tumores tiende a aumentar. De 1998 a 2008, la tasa de mortalidad por cáncer se incrementó, pasando de 57.7 a 66.6 por cada 100 mil habitantes; entre las mujeres, el crecimiento fue de 59.6 a 66.7 por cada 100 mil habitantes, mientras que entre los hombres, de 55.6 a 66.5 cada 100 mil habitantes. En 2008, el cáncer de tráquea, bronquios y pulmón presentó la tasa más alta para tumores malignos en población de 60 años o más (60.19 por cada 100 mil habitantes) (2).

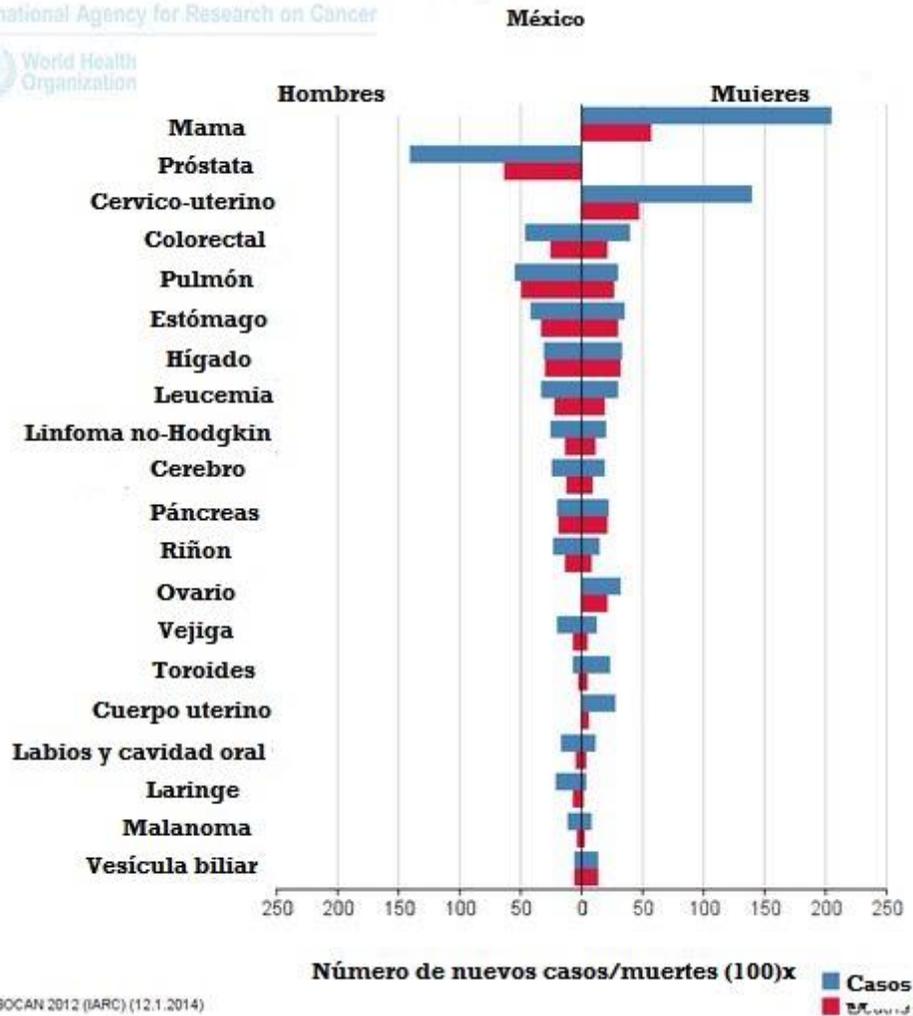


Figura 2. Incidencia y mortalidad por cáncer en México. Casos estimados de incidencia de cáncer y muerte por cáncer (miles) en México en 2012. (Editada de GLOBOCAN 2012.)

1.2 Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es uno de los tipos de cáncer más extendido entre ambos sexos en países desarrollados y en vías de desarrollo. Para el caso del sector femenino también sobresalen el cáncer de mama y cérvico-uterino. Mientras que en los hombres sobresalen los de próstata y colon (Figura 2). La OMS estima que el cáncer podría cobrar la vida de 10.3 millones de personas en el mundo para 2020, afectando a 6.7 millones de personas cada año (14).

El cáncer de pulmón es el tumor maligno más frecuente en el mundo. En México, al igual que en los países desarrollados, la evolución y pronóstico de la enfermedad es más grave cuando se torna metastásico. Antes del siglo XX, el cáncer pulmonar era una entidad patológica muy rara. A partir de 1930, su frecuencia aumentó y se estima que para el año 2025 se incrementará el número de muertes en más de 80%, es decir, a tres y medio millones de defunciones en países en vías de desarrollo (2).

El cáncer de pulmón es una enfermedad que se genera a partir de alteraciones genéticas en el epitelio pulmonar, generalmente por la acumulación de compuestos químicos, mutagénicos y carcinogénicos (16).

La causa más importante relacionada al cáncer de pulmón es el humo de cigarro. Se han identificado más de 4,000 sustancias químicas en el humo del cigarro, de las cuales 60 son carcinogénicas. Estos compuestos se clasifican de acuerdo a su acción. Los compuestos de acción directa no requieren transformación química para tener efecto carcinogénico. Los compuestos de acción indirecta requieren de ser metabolizados *in vivo* para producir reactivos que inducen cambios genéticos y epigenéticos en células del epitelio pulmonar (16).

En México, como en muchos otros países, el cáncer pulmonar representa un problema de salud pública. La mayoría de los casos se diagnostica en etapas avanzadas para las que no existen tratamientos con fines curativos; y pese a que existen notables avances en el conocimiento de factores de riesgo, fisiopatología, alteraciones genéticas y tratamiento de quimioterapia citotóxica, así como el desarrollo de nuevas terapias blanco, el beneficio alcanzado en términos de supervivencia a largo plazo es poco satisfactorio (3).

1.2.1 Epidemiología del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón constituye la principal causa de muerte por cáncer a nivel mundial. De acuerdo con datos de la OMS, hubo un total de 7.9 millones de defunciones por cáncer en 2007. Para 2011, se esperaron 1, 665, 300 nuevos casos y 1, 378, 400 muertes por cáncer de pulmón a nivel mundial (Figura 3). Desde 1970 se observa un incremento en la incidencia por el aumento en el tabaquismo, en particular entre las mujeres (3)(13).

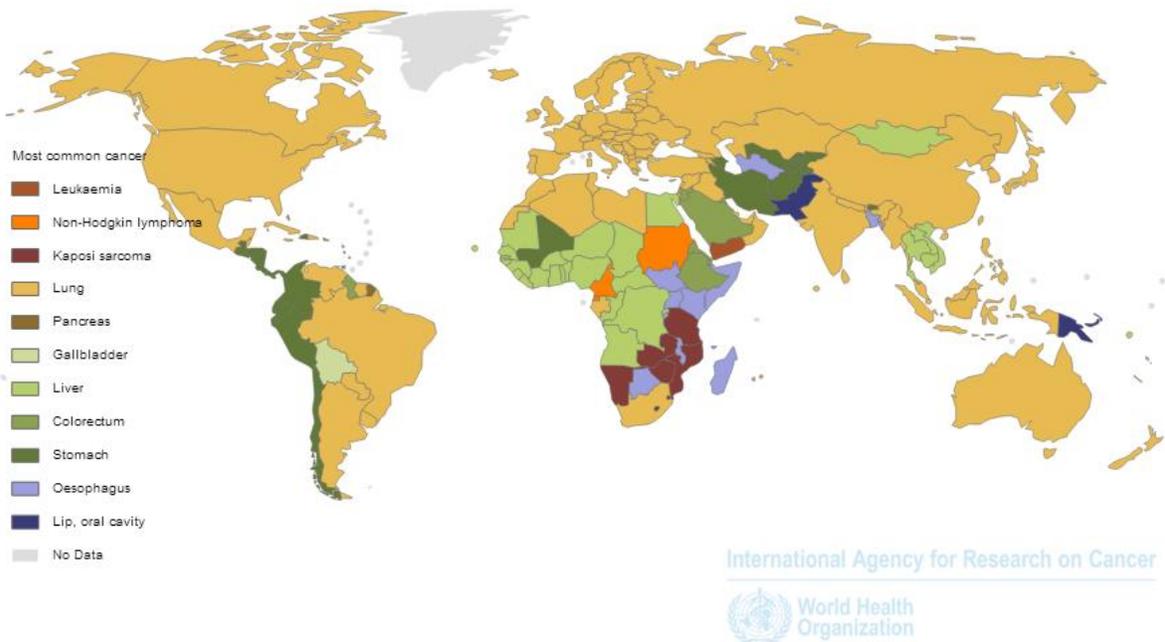


Figura 3. Mortalidad por cáncer. El cáncer pulmonar es la principal causa de muerte por cáncer en el mundo. GLOBOCAN 2012.

De acuerdo al Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) de 1998 a 2004 se registraron 397, 400 muertes por tumores malignos de los cuales, 45, 578 (11.5%) corresponde a cáncer de pulmón, donde las mayores tasas de mortalidad son en el norte de México para ambos sexos y en los estados del centro para las mujeres (Figura 4) (1). A pesar de que el tabaquismo se considera el principal factor de riesgo para desarrollar cáncer de pulmón en Estados Unidos y Europa; en México se le atribuye solo al 66% de los casos (15). Algunos otros factores ambientales que contribuyen al proceso carcinogénico en el pulmón son la exposición al asbesto, la contaminación atmosférica, el radón, compuestos como el arsénico, cromo, radiación ionizante y la exposición crónica al humo de leña (17).



A.



B.

Figura 4. Epidemiología del cáncer pulmonar en México. A) Mujeres. B) Hombres. (Modificado de Ruiz-Godoy L, Rizo-Ríos P, Sánchez-Cervantes F, Osornio- Vargas A, García-Cuellar C, Meneses-García A. Mortality due to lung cancer in Mexico. *Lung Cancer* 2007; 58: 184-90.)

1.2.2 Etiología del cáncer de pulmón

Los principales factores de riesgo, por orden de importancia, son el tabaquismo activo o pasivo, y la exposición al humo de leña. En México, 16% de las personas mayores de 15 años son fumadoras, y 16.4 millones de habitantes están expuestos a humo de leña (censo 2010). La exposición al humo de leña por más de 50 años se ha relacionado con cáncer de pulmón en mujeres mexicanas no fumadoras. Otros factores de riesgo son la exposición a elementos como arsénico, sílice, asbesto, ácido crómico, éter, clorometilo, níquel e hidrocarburos policíclicos aromáticos; así como factores genéticos y la

contaminación ambiental. Una causa poco conocida es la tuberculosis pulmonar, que aumenta el riesgo de padecer cáncer de pulmón hasta 11 veces, en particular la del tipo histológico adenocarcinoma (3).

En las personas no expuestas al humo del tabaco, la aparición del cáncer de pulmón es el resultado de una combinación de factores genéticos y la exposición a carcinógenos. El grupo de agentes carcinógenos que se asocian a la generación de células cancerígenas en el pulmón son de diversa naturaleza. El riesgo de padecer cáncer se incrementa en medida de los años de exposición a éstos agentes, y de manera especial cuando coexiste el tabaquismo (18).

El radón, asbesto y arsénico, son tres carcinógenos relacionados al desarrollo de neoplasias pulmonares. El primero es un gas radioactivo liberado por la descomposición normal del uranio en las rocas y se encuentra en subterráneos y minas. Es invisible e inodoro, se filtra a través del suelo y se difunde en el aire. Puede contaminar el agua, principalmente en las norias, y liberarse mediante evaporación (19)(20). En relación con el asbesto, se trata del carcinogénico ocupacional más estudiado y al que los albañiles, trabajadores de astilleros de barcos, los obreros de la industria de fabricación de filtros y aislamientos (que utilizan el amianto en tuberías y calderas) y los empleados en cartonaje, textiles, reparación de frenos y tintorería industrial están más expuestos (21). El arsénico es un metaloide que está presente en forma sólida, líquida y gaseosa. Se utiliza en la fabricación de vidrio, pigmento y juegos pirotécnicos. La exposición más prolongada resulta por el consumo de agua contaminada (3).

Hasta el momento no existe un cuadro clínico específico para el diagnóstico de cáncer pulmonar; sin embargo, síntomas como tos (presente en más de 65% de los pacientes al momento del diagnóstico), hemoptisis, disnea, dolor torácico, pérdida de peso, y fatiga son síntomas y signos que al persistir por más de tres semanas se debe evaluar con radiografía de tórax (3).

La mayoría de los pacientes con cáncer pulmonar son diagnosticados en una etapa muy avanzada. El realizar una tomografía axial computarizada tóraco-abdominal es fundamental para una correcta estadificación tumoral. El 87% de los pacientes con cáncer pulmonar son diagnosticados en etapas avanzadas, en esta etapa la tasa de

supervivencia a 5 años es del 4%. Los lugares más frecuentes de diseminación son el hígado, el hueso, las glándulas suprarrenales y el cerebro(17).

1.2.3 Clasificación del cáncer de pulmón

Según la localización, el cáncer de pulmón puede dividirse en Cáncer de pulmón central para aquellos tumores que aparece a nivel de bronquios principales, lobares y segmentarios correspondiendo a la primera, segunda y tercera generación respectivamente, hasta los de cuarta generación, es decir, preferentemente en y alrededor del hilio pulmonar(3). El origen traqueal es raro y prácticamente no presenta sintomatología bronquial y son accesibles con el broncoscopio. Cerca del 75% de los casos en este tipo de cáncer incluye a los subtipos epidermoide y carcinoma indiferenciado de células pequeñas.

El cáncer de pulmón periférico, es aquel que aparece a partir de los bronquios de quinta generación, los cuales no son accesibles con el broncoscopio y principalmente se presentan en forma de adenocarcinoma. Este tipo de cáncer pulmonar rara vez llega a localizarse en áreas muy alejadas, junto a la pleura.

1.2.3.1 Clasificación histopatológica

La clasificación propuesta por la OMS divide al cáncer de pulmón en dos grandes categorías por sus características histopatológicas. El carcinoma pulmonar de células pequeñas (SCLC, por sus siglas en inglés) que comprende alrededor del 20% de los carcinomas pulmonares y el carcinoma pulmonar de células no-pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés) que comprende alrededor del 80%. Existe un tercer tipo de cáncer de pulmón de gran incidencia, el mesoteloma, que surge principalmente de la pleura y es responsable del 3 a 4% de los cánceres de pulmón(22).

1.2.3.1.1 Carcinoma pulmonar de células pequeñas (SCLC)

El SCLC comprende aproximadamente del 10 al 25% de todos los casos de cáncer pulmonar a nivel mundial. El SCLC se desarrolla usualmente en las células neuroendocrinas que recubren los bronquios, por lo que ésta región es donde usualmente inicia el desarrollo de este tipo de tumor. El SCLC es la forma más agresiva de carcinoma pulmonar, este tipo de tumor se desarrolla rápidamente y forma grandes tumores. Las células drenan a los nódulos del pulmón, para hacer metástasis rápidamente. Por su gran

capacidad metastásica temprana, los SCLC tienen mal pronóstico. Estas células cancerosas producen hormonas, que causan síndromes paraneoplásicos(22).

1.2.3.1.2 Carcinoma pulmonar de células no-pequeñas (NSCLC)

El NSCLC comprende un grupo heterogéneo de diversos tipos histológicos de cáncer pulmonar, los tipos más frecuentes son adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células grandes. Todos comparten enfoques similares de tratamiento y pronóstico, pero tienen distintas características histológicas y clínicas(22).

1.2.3.1.2.1 Adenocarcinoma pulmonar

El adenocarcinoma pulmonar deriva del epitelio de los alveolos y de las glándulas mucosas bronquiales. Tienen una incidencia de alrededor del 40% de todos los casos de cáncer pulmonar. De acuerdo a la OMS, los adenocarcinomas pueden ser subclasificados como papilar, acinar, bronquialveolar, adenocarcinoma mixto y adenocarcinoma sólido con formación de mucina. Los adenocarcinomas pulmonares son frecuentemente heterogéneos y consisten en una mezcla de subtipos histológicos; sin embargo, la producción de mucina y la formación de glándulas son características que distinguen a los adenocarcinomas de los demás carcinomas pulmonares. Los subtipos acinares (glandular) y papilar son reconocibles por el patrón de crecimiento celular e invasión. Este tumor es de localización periférica, afectando incluso a la pleura o pared torácica. Es de lento crecimiento y puede tomar años en desarrollarse de un cáncer confinado a un cáncer metastásico(22).

Las células cancerosas de adenocarcinoma son largas cilíndricas y forman patrones glandulares reconocibles. Por inmunohistoquímica, el diagnóstico de adenocarcinoma se obtiene mediante el resultado positivo a los marcadores de transcripción tiroideo (TTF-1, por sus siglas en inglés) y citoqueratina 7 (CK-7) (22).

1.2.3.1.2.2 Carcinoma epidermoide o de células escamosas

El carcinoma epidermoide o de células escamosas representa aproximadamente el 38% de todos los casos de cánceres pulmonares diagnosticados. Histológicamente se caracteriza por presentar queratinización de células tumorales con formación de perlas de queratina y puentes intercelulares. Las células tumorales son delgadas y planas. Por lo

general se desarrollan en los grandes tubos bronquiales del centro de los pulmones, su desarrollo es más lento en comparación con otros subtipos de cánceres de pulmón(22).

1.2.3.1.2.3 Carcinoma de células grandes

El carcinoma de células grandes comprende alrededor del 9% de todos los cánceres pulmonares. Tiene un gran espectro de morfología, la mayoría consiste en células con abundante citoplasma y un gran nucléolo. Estos carcinomas también incluyen variantes específicas, incluyendo el carcinoma neuroendocrino de células grandes(22).

1.2.3.1.3 Mesotelioma

El mesotelioma maligno es otro tipo de cáncer pulmonar, las células cancerosas se originan a partir de la transformación tumoral de las células mesoteliales de la pleura (la capa delgada de tejido que reviste la cavidad torácica y los pulmones).

Mientras que el hábito tabáquico es considerado como la causa primordial de los carcinomas pulmonares, el asbesto es la causa primordial del mesotelioma maligno; aunque el hábito tabáquico y el asbesto tienen un efecto sinérgico en la patogénesis del cáncer pulmonar. Aproximadamente el 80% de los casos de mesotelioma maligno está asociado con exposición a asbestos y se estima que cerca del 5% de los trabajadores de la industria del asbesto desarrollan mesotelioma (23)(24).

La patogénesis del mesotelioma ocurre cuando las fibras de asbesto alcanzan la región alveolar, la respuesta inicial del cuerpo es fagocitar y remover dichas fibras del pulmón, aunque, si dichas fibras son demasiado largas no se remueven. Las fibras de asbesto alcanzan la pleura a través de los bazo linfáticos o por penetración directa y causa fibrosis, placas pleurales y genera un mesotelioma. Una vez que las fibras alcanzan la pleura, causan cambios mutagénicos a través de una interacción física directa o indirectamente por la producción de especies reactivas de oxígeno, tales como los radicales hidroxilo y aniones superóxido, dando lugar a rupturas de la cadena de DNA y a deleciones en el material genético. Las partículas de asbesto afectan la función de los genes que regulan el ciclo celular y que están alterados en varios tipos de cáncer humano, como los genes supresores de tumores TP53 y Rb(25).

El mesiotelioma maligno es una enfermedad localizada regional y agresiva, con una supervivencia medio de 9 a 17 meses. Sin embargo, el pronóstico depende de la etapa en que se diagnóstica el tumor, la edad del paciente y si la cirugía es o no una opción para el paciente(25).

El desarrollo del cáncer depende en gran medida, de la capacidad de las células tumorales de aprovechar los procesos fisiológicos normales para su beneficio (26). Uno de estos procesos es la regulación del sistema inmune. La activación de las células de este sistema promueve la erradicación del tumor, mientras que su activación crónica benefician el desarrollo tumoral (26).

1.3 Sistema inmune y cáncer.

A pesar de que los tumores provienen de células propias, expresan antígenos tumorales que pueden ser reconocidos por células del sistema inmune. El reconocimiento de estos antígenos provoca la eliminación de las células tumorales, en la mayoría de los casos antes de que la formación del tumor genere sintomatología en el paciente. La capacidad del sistema inmune de combatir células tumorogénicas originalmente fue propuesta por Paul Ehrlich en 1900. En la década de los 50's, Burnet y Thomas formularon la hipótesis de "La inmunovigilancia del cáncer".

El sistema inmune selecciona, durante la formación del tumor, variantes que están mejor adaptadas para sobrevivir en un ambiente inmunológicamente intacto de una manera muy parecida a lo que hace con virus, bacterias y parásitos. Por ejemplo, los tumores que se forman en hospederos inmunocompetentes son menos inmunogénicos que los tumores que se desarrollan en ausencia de un sistema inmune intacto(27)(28). De esta manera en los tumores que se generan bajo la presión del sistema inmune se seleccionan células más resistentes a los mecanismos efectores citotóxicos y predominan variantes tumorales con inmunogenicidad reducida o que adquirieron otros mecanismos que les permiten evadir o suprimir el ataque inmune, con más probabilidades de sobrevivir en el hospedero inmunocompetente(27).

Robert Schreiber postuló la hipótesis de inmunoedición del cáncer, de acuerdo con esta hipótesis el proceso de inmunoedición del cáncer se divide en tres fases denominadas **eliminación, equilibrio y escape**(28).

En la primera fase de **eliminación**, una vez que los tumores sólidos alcanzan cierto tamaño e invaden zonas adyacentes, requieren de una mayor provisión de sangre. El incremento en el flujo sanguíneo llega como consecuencia de la producción de proteínas del estroma tisular y factores angiogénicos por parte de tumor. Ciertas moléculas en células transformadas son reconocidas por células linfoides, éstas promueven la producción de IFN- γ incrementando la actividad citotóxica que elimina a las células tumorales(4,28–30).

En la fase de **equilibrio**, el sistema inmune y cualquier variante de las células tumorales que haya sobrevivido al proceso de eliminación, entran en un equilibrio dinámico. En esta fase, las células T y el IFN- γ producido por otros tipos celulares ejercen una potente presión de selección sobre las células tumorales, suficiente para contener pero no para eliminar totalmente el nicho tumoral, el cual posee células inestables genéticamente y con alta tasas de mutación.

En la tercera fase, denominada **escape**, las variantes tumorales que sobrevivieron, comienzan a expandirse de forma descontrolada. Esto resulta en una enfermedad maligna observable clínicamente que, si se deja avanzar, resulta en la muerte del hospedero.

Sin embargo, a pesar del rol del sistema inmune como efector de una respuesta inmune antitumoral, los tumores crecen en hospederos inmunocompetentes debido a una gran variedad de mecanismos de escape y contra-ataque tumoral que les permite evadir la respuesta inmune montada por el organismo. Por este motivo, una vez que un tumor está establecido y es clínicamente detectable, la regresión espontánea es un evento infrecuente.

El crecimiento invasivo causa alteraciones menores en el tejido circundante e induce señales inflamatorias que llevan al reclutamiento de células de la inmunidad innata. Las células NK forman parte de las poblaciones linfocitarias efectoras que infiltran tumores y ejercen una respuesta citotóxica anti-tumoral.

1.4 Células Natural Killer (NK)

Las células NK son linfocitos granulares que cumplen importantes funciones efectoras del sistema inmune innato. Constituyen del 10 al 15% de los linfocitos de sangre periférica, las células maduras se caracterizan por expresar en la superficie el marcador CD56 (6). Funcionalmente las células NK son una fuente importante de citocinas inmunoregulatorias que interactúan con otras células del sistema inmune desencadenando respuestas antigénicas específicas. Estas células tienen la habilidad de matar directamente células blanco y mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos a través de los receptores de membrana de la porción Fc de la IgG (FcγRIII (CD16)). Las células NK son capaces de eliminar células tumorales sin necesidad de reconocer antígenos específicos de tumores (6).

Las células NK representan una población heterogénea, donde las células que se encuentran en sangre periférica expresan el receptor de activación CD161 (NKR-P1A). Diversos estudios han identificado dos poblaciones distintas de células NK humanas, basados en la densidad de expresión de CD56. Aproximadamente el 90% de las células NK presentan una baja expresión del marcador CD56 (CD56^{dim}) y altos niveles de expresión del receptor FcγIII (CD16); las células restantes se caracterizan por una alta expresión de CD56 (CD56^{bright}) y baja expresión de CD16 (CD16^{dim/neg}). Hasta el momento, la función biológica de CD56 se desconoce. Las diferencias entre estas poblaciones no se limitan en el perfil de expresión de marcadores de superficie, ya que las dos tienen patrones de secreción de citocinas, potencial citotóxico y propiedades proliferativas diferentes (6)(31).

Las células NK CD56^{bright} se caracterizan por producir citocinas inmunoregulatorias como IFN-γ, Factor de Necrosis Tumoral-α (TNF-α, por sus siglas en inglés) TNF-β, factor estimulante de colonia macrófago granulocito (GM-CSF, por sus siglas en inglés), Interleucina-10 (IL-10) e Interleucina-13 (IL-13), al igual que altos niveles de expresión en superficie del receptor de quimiocinas tipo-7 (CCR7, por sus siglas en inglés) y L-selectina (CD62L). (6)Células NK CD56^{dim} tienen baja expresión de L-selectina y CCR7, pero expresan altos niveles del Antígeno de Función Linfocitaria-1 (LFA-1, por sus siglas en inglés) y PEN5 (Figura 6). Estos patrones sugieren diferencias marcadas en el potencial de migración a diversos sitios (31).

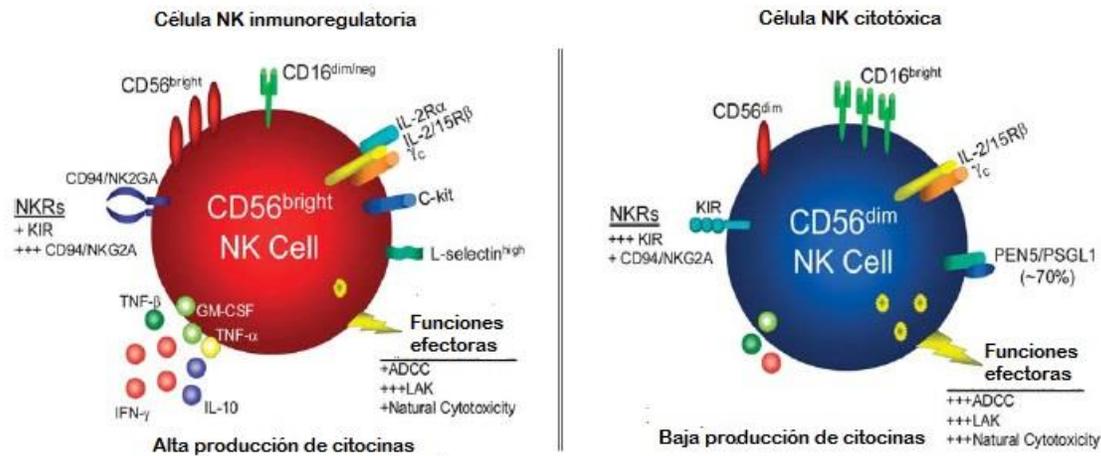


Figura 5. Subtipos de células NK humanas. Las células NK CD56^{bright} son predominantemente inmunoregulatorias, se caracterizan por producir altas concentraciones de citocinas. Generalmente se identifican como CD16^{low}. Las células NK CD56^{dim} son esencialmente células citotóxicas que producen bajos niveles de citocinas. (Adaptado de Cooper MA *et al.* Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56 (bright) subset. *Blood*. 2001; 97:3146-3151)

Las células NK reconocen las dos clases del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) en células blanco a través de los receptores celulares NK (NKR). Las células NK pueden matar selectivamente células autólogas que han perdido la expresión de moléculas MHC clase 1. Los receptores de superficie cumplen funciones de regulación en las células NK, ya que pueden inhibir o activar diversas funciones (Figura 7) (31).

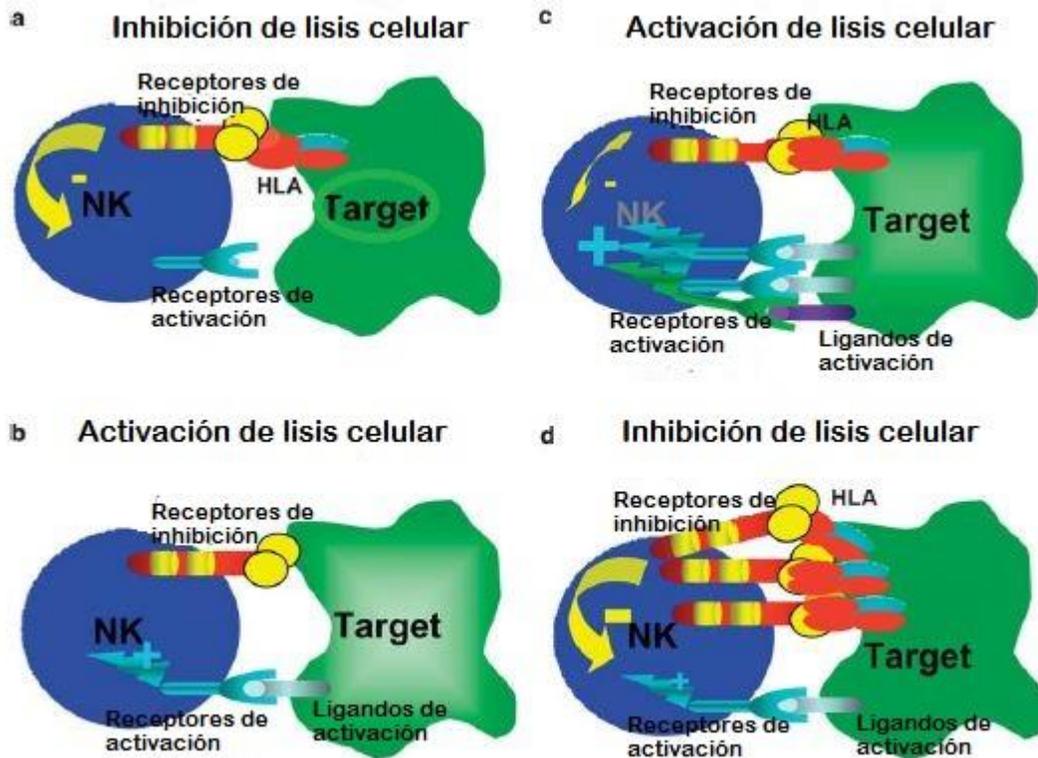


Figura 6. Regulación de la respuesta de células NK a través de receptores de inhibición y activación. La respuesta de células NK está regulada por un balance en las señales de activación e inhibición (a) en ausencia de receptores de activación, la lisis celular se inhibe por receptores de inhibición (receptores tipo KIR) que reconocen moléculas de HLA clase I. (b) La lisis ocurre cuando receptores de activación se encuentran con sus ligandos en la célula blanco, al igual que por la ausencia de receptores de inhibición. (c) Las interacciones entre los receptores de activación y sus ligandos son mucho más fuertes que las interacciones de receptores de inhibición y sus ligandos, lo que resulta en la activación de células NK y lisis de las células blanco. (d) En el caso de que haya un mayor número de interacciones de inhibición resultará en una señal negativa que no permitirá la lisis celular. (Modificado de Farag SS *et al.*, Natural killer cell receptors: a new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood*. 2002; 100:1935-1947)

Existen 3 superfamilias de receptores celulares descritas en células NK. Los receptores tipo inmunoglobulina killer (KIR, por sus siglas en ingles), que reconocen moléculas MHC clase I; la superfamilia de receptores tipo lectina-c que reconocen moléculas no clásicas MHC clase 1 y 2; y por último los receptores citotóxicos naturales de los cuales poco se sabe de sus ligandos (6).

1.4.1 Receptor tipo inmunoglobulina killer

Los receptores tipo inmunoglobulina killer son la superfamilia mejor conocida de receptores de células NK. Llevan a cabo funciones que podrían tener aplicaciones en la inmunoterapia contra el cáncer. Este conjunto de receptores de activación e inhibición se caracterizan por tener uno de los dos dominios extracelulares KIR2D ó KIR3D, que reconocen específicamente moléculas HLA clase 1 (HLA-A, HLA-B, HLA-C)(32). Estos receptores se clasifican de acuerdo al tamaño de las regiones citoplasmáticas; tipo *long* (KIR2DL y KIR3DL) y tipo *short* (KIR2DS y KIR3DS), estas colas citoplasmáticas determinan las propiedades funcionales del receptor. El receptor tipo *long* regula señales inhibitorias en presencia de ITIM's (abreviado del inglés, immuno receptor tyrosine-based inhibition motif). Existendos representantes de este grupo de inmunoreceptores de inhibición, CD158b y CD158e. Los receptores tipo *short* está asociado con señales de activación por la asociación con ITAM's (abreviado del inglés, Immuno receptor Tyrosine-based Activation Motif)(Figura 8)(6).

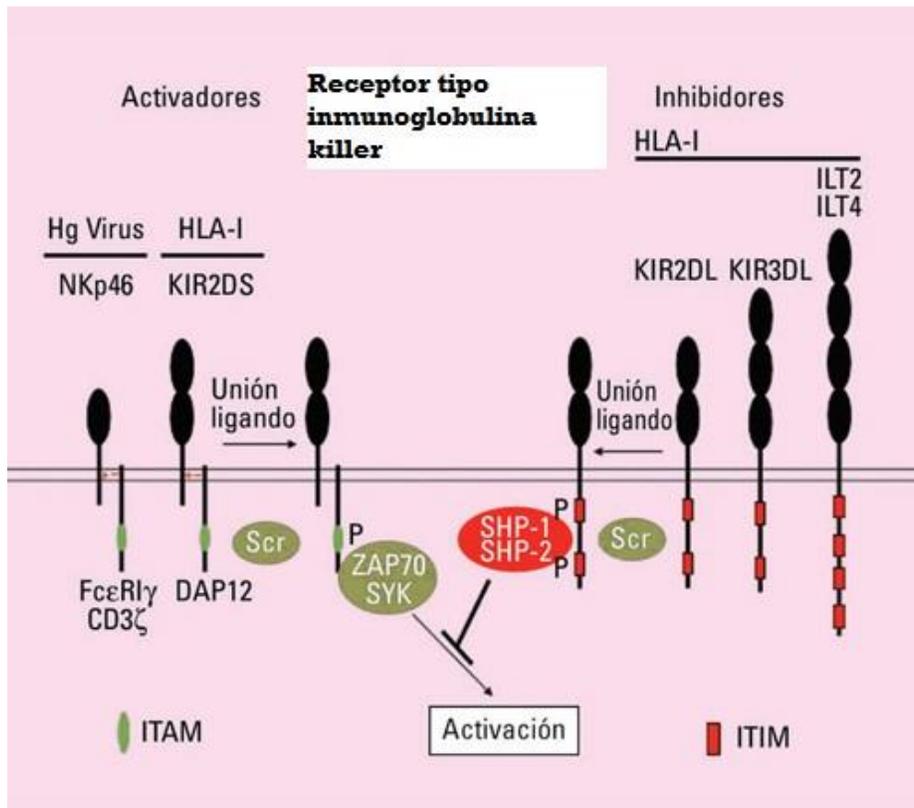


Figura 7. Receptores de la familia tipo inmunoglobulina killer. En la figura se muestran algunos de los receptores de activación e inhibición. De color verde se muestra el ligando para el que son

específicos. De forma genérica se muestra el mecanismo de señalización tras la unión específica del ligando (Modificado de P Roda-Navarro. E Fernández-Ruiz Extracto de Medicine. 2005;09:2174-80).

1.4.2 Receptores tipo lectina-C (CD94/NKG2)

Los receptores tipo lectina-C están conformados por la subunidad CD94 unido a una cadena NKG2, este receptor está codificado por un gen de la familia de lectinas de tipo-C. El receptor CD94 carece de un dominio citoplasmático para la transducción de señales intrínsecas, la especificidad funcional del receptor se determina por los dominios extracelulares y citoplásmicos de las moléculas de NKG2 (33). La familia de receptores NKG2 incluye a NKG2A; único receptor de inhibición; NKG2C, NKG2E y NKG2F (figura 9); como receptores de activación. Su principal función es el controlar la internalización de microorganismos que expresen los ligandos y promover la secreción de citocinas (6).

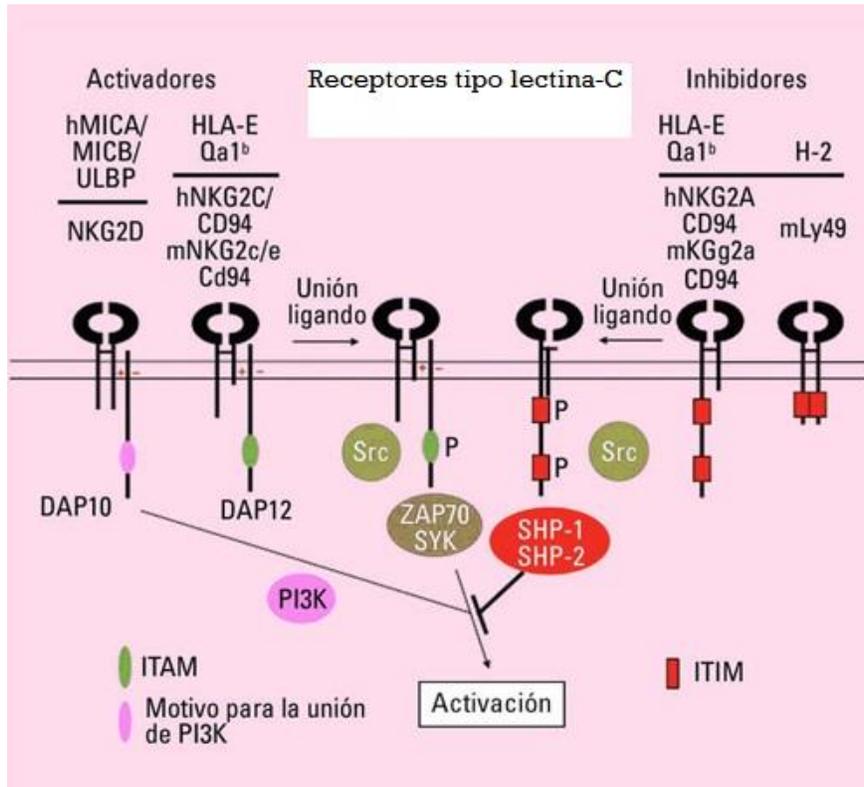


Figura 8. Representación esquemática de los receptores tipo lectina-C. Representación esquemática del mecanismo de señalización tras la unión específica del ligando. Las iniciales m y h indican ratón y humano respectivamente. PI3K indica fosfatidilinositol 3 cinasa. Para la unión de PI3K es necesario que el motivo se fosforile tras la unión específica del ligando (Modificado de Extracto de Medicine. 2005;09:2174-80. P Roda-Navarro. E Fernández-Ruiz.).

1.4.3 Complejo de receptores de citotoxicidad natural

Los receptores citotóxicos naturales (NCR, por sus siglas en inglés) son receptores de activación que participan en el reconocimiento y lisis de células tumorales. Se han descrito tres NCR, de los cuales dos (NKp46 y NKp30) (Figura 10) se expresan constitutivamente en todas las células NK de sangre periférica. El receptor (NKp44) se expresa solo en células NK activadas por IL-2. Los ligandos para estos receptores son desconocidos (6).

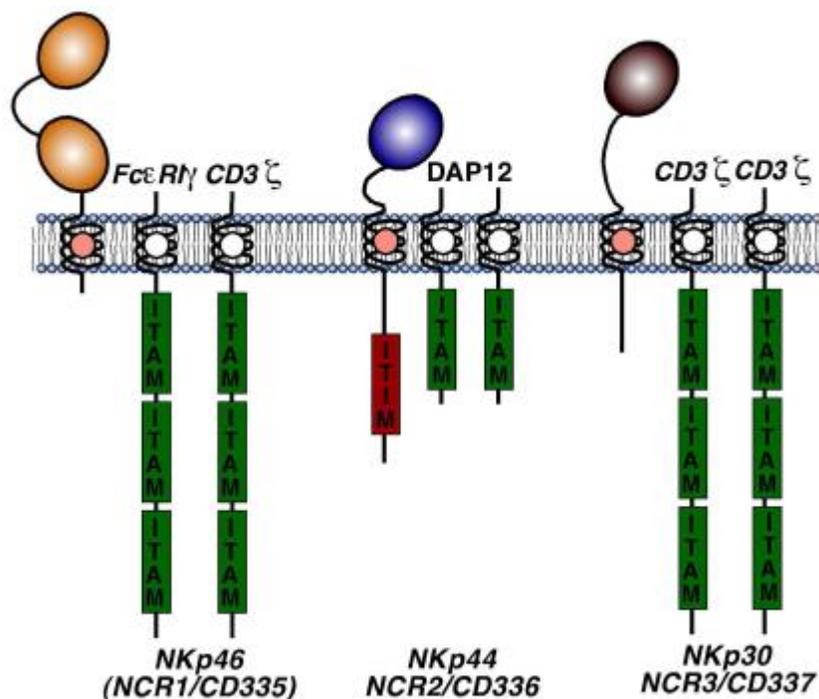


Figura 9. Estructura de los NCRs. Estructura molecular de NKp46, NKp30 y NKp44. Se observa la presencia y número de dominios extracelulares y el tipo de molécula adaptadora (Modificado de Hudspeth K, Silva-Santos B and Mavilio D (2013) Natural cytotoxicity receptors: broader expression patterns and functions in innate and adaptive immune cells. Front. Immunol. 4:69. doi: 10.3389/fimmu.2013.00069).

1.4.5 Citotoxicidad de las células NK

Las células NK son capaces de eliminar células tumorales a través de la secreción de moléculas formadoras de poros transmembranales en células blanco. Las serin proteasas granzima A y granzima B, al igual que la perforina, son los componentes más importantes de estos gránulos citotóxicos (34).

La granzima B es capaz de escindir proteínas que contengan residuos de aspartato y activar a la procaspasa-10 y liberarla de factores como el Inhibidor de caspasaDNAsa activada (ICAD, por sus siglas en ingles). Esta granzima utiliza la vía mitocondrial para amplificar las señales de muerte celular a través de escisiones específicas y la inducción y liberación de Citocromo C. De igual forma la granzima B activa directamente a la caspasa-3(34).

La granzima A es un importante inductor de apoptosis a través de la activación de vías independientes de caspasa. Una vez dentro de la célula la granzima A activa DNAsas como NM23-H1, degradando el DNA. Normalmente el ensamblaje del nucleosoma SET inhibe la actividad de la molécula NM23-H1, pero la granzima es capaz de escindir al nucleosoma permitiendo la degradación del DNA por acción de NM23-H1.

1.4.6 Receptores asociados a ITAM

1.4.6.1 CD16 (FcγRIII)

El receptor CD16 es una molécula miembro de la superfamilia de las Inmunoglobulinas. Es el receptor de membrana mejor caracterizado, responsable de mediar la lisis en células blanco. CD16 es un receptor que se une a las porciones Fc de la IgG. Mediante la unión con la inmunoglobulina dirige la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) en células infectadas. Señaliza a través de las cadenas CD3ζ y FcγRIγ. Si bien CD16 es uno de los principales receptores de activación (35), para ejercer su acción requiere de anticuerpos específicos (IgG) contra antígenos de superficie de las células tumorales o infectadas.

1.5 Poblaciones inmunosupresoras

Las células neoplásicas y las células del estroma asociadas al tumor liberan múltiples factores solubles que perturban a distintas poblaciones, entre ellas poblaciones de células mieloides. Diversas citocinas como el factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés), Factor de células madre (SCF, por sus siglas en inglés), el VEGF y la IL-13 promueven la mielopoyesis y contribuyen a un bloqueo en la maduración de estas células. Las células mieloides tienen

un papel crucial en la promoción, angiogénesis tumoral, metástasis, invasión celular y alteración de la respuesta inmune en la patogénesis del cáncer (36).

Las células supresoras de origen mieloide constituyen una población mieloide heterogénea (granulocitos, células dendríticas y macrófagos) en un estado inmaduro con capacidad de suprimir la respuesta inmune del huésped. Durante estados patológicos, traumas, inflamación, trasplantes y otras condiciones de estrés, estas células supresoras se expanden en médula ósea y viajan al torrente sin haber madurado correctamente, acumulándose en órganos linfoides periféricos, donde se expanden y migran a sitios blancos (37).

Las MDSC expresan factores supresores como la arginasa-1, especies reactivas de oxígeno y la enzima óxido nítrico sintasa, estas moléculas tienen la capacidad de inhibir la proliferación, citotoxicidad y activación de poblaciones linfocitarias como las células NK y células T (38)(39).

Mientras que en individuos sanos los niveles de MDSCs permanecen en niveles casi imperceptibles, durante el desarrollo del cáncer estas y otras poblaciones supresoras aumentan en número y se acumulan para establecer una plataforma que permite al tumor evadir la respuesta inmune. De esta forma, ya sea por supresión directa, contacto célula-célula y la producción de factores solubles pueden inhibir la función y disminuir el número de poblaciones linfocitarias como las células NK a través de la inducción de la apoptosis. (40)

1.6 Muerte celular inducida

Las células tumorales deben superar barreras intrínsecas y extrínsecas para llevar a cabo la progresión tumoral. Durante este proceso las células tumorales adquieren diferentes características denominadas mecanismos de evasión tumoral (30).

Algunos de los mecanismos moleculares que permiten a las células cancerosas evadir el sistema inmune son: pérdida o disminución en la expresión de las moléculas MHC de clase I, alteraciones en la vía de procesamiento de antígenos, secreción de citocinas inmunosupresoras y la señalización defectuosa en la apoptosis (30).

La apoptosis se define como un tipo de muerte celular programada, que involucra la eliminación de una célula genéticamente determinada. El término apoptosis se usó por primera vez en 1972 para describir una forma de muerte celular morfológicamente distinta a las ya conocidas (8).

En sus primeras fases, las células apoptóticas pierden el contacto con las células adyacentes generando condensación del citoplasma y alteración en la membrana plasmática debido a la translocación de la fosfatidilserina. Una vez que las células comienzan el proceso de apoptosis la cromatina nuclear se condensa y fragmenta y se inicia la formación de protuberancias en la superficie celular que dan origen a los cuerpos apoptóticos, que serán fagocitados por células del sistema inmune (8).

La muerte celular programada es una parte esencial de la vida para cualquier organismo multicelular. En vertebrados, la apoptosis se requiere para el remodelamiento de tejidos, la reparación de lesiones y el combate contra infecciones. Por otro lado, las células están expuestas a adquirir mutaciones que generan defectos en la regulación de los programas de muerte celular. Estos defectos son la base de la tumorigénesis, la invasión de células tumorales y de la metástasis. Sin embargo, las células son capaces de utilizar la muerte celular como mecanismo de defensa contra las células neoplásicas. Una forma de lograrlo es a través del acoplamiento de vías de proliferación celular y apoptosis (41).

La muerte celular es el estado por defecto de todas las células de los metazoos, este estado debe ser continuamente impedido por señales de supervivencia como citocinas, hormonas solubles, conexiones sinápticas y la adhesión directa a la matriz extracelular. Las células requieren de diferentes combinaciones de señales de supervivencia, presentes solo en el sitio donde éstas se desarrollan, de esta forma la supervivencia de las células depende completamente de su microambiente (41).

1.6.1 Receptores de muerte celular

Los receptores de muerte celular son miembros de la superfamilia de receptores tipo TNF, comprenden alrededor de 20 proteínas que tienen diversas funciones biológicas incluyendo la regulación de la supervivencia y muerte celular, la diferenciación celular y la regulación del sistema inmune. Los miembros de la familia de TNF comparten dominios

extracelulares ricos en cisteína, estos receptores están definidos por dominios citoplasmáticos de aproximadamente 80 aminoácidos llamados “dominios de muerte” (42). Los receptores de muerte mejor caracterizados son CD95 (APO-1/Fas), receptor TNF-1 (TNFR1), TRAIL-R1 y TRAIL-R2 (42).

1.6.2 Vía intrínseca de la apoptosis

La vía intrínseca de la apoptosis implica estímulos que producen señales intracelulares que actúan directamente dentro de la célula y son dependientes de eventos que ocurren en la mitocondria. Los estímulos que inician la vía intrínseca producen señales intracelulares positivas o negativas. Las señales negativas implican la ausencia de factores de crecimiento, hormonas y citocinas esto activa los programas de muerte, iniciando así la apoptosis. Los estímulos que actúan de una manera positiva son la radiación, toxinas, hipoxia, hipertermia, infecciones virales y radicales libres. Todos estos estímulos provocan cambios en la membrana mitocondrial interna que provoca una apertura del poro de la membrana, esto permite la permeabilidad mitocondrial, la pérdida del potencial de transmembranal mitocondrial y la liberación de las proteínas pro-apoptóticas, Smac/DIABLO y la serina proteasa HtrA2/Omi, al citosol. Estas proteínas activan la vía mitocondrial dependiente de caspasas. Además, existe un cofactor pro-apoptótico llamado citocromo C, el cual se une y activa Apaf-1, así como la procaspasa-9, formando un complejo conocido como apoptosoma. La agrupación de procaspasa-9 activa a la caspasa-9. Smac/DIABLO y HtrA2/Omi inhiben a las moléculas IAP's (proteínas inhibidoras de apoptosis), y comienza el proceso apoptótico. Las proteínas pro-apoptóticas, tales como Bax, Bad, Bak, Bim y Bik, se traslocan del citosol a la membrana mitocondrial, provocando la formación de poros en la membrana, permitiendo la salida de factores pro-apoptóticos y con ello la activación de las caspasas efectoras. De esta manera se fragmenta el DNA y se condensa la cromatina nuclear periférica(8,43)

Los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 controlan y regulan la apoptosis mitocondrial. Esta familia de proteínas incluye a Bcl-2, Bcl-x, Bcl-x_l, Bcl-x_o,, los cuales pueden ser pro-apoptóticos o anti-apoptóticos ya que regulan la permeabilidad de la membrana mitocondrial (44).

1.6.3 Vía extrínseca de la apoptosis

La vía extrínseca de la apoptosis se desencadena a través de la interacción de receptores y ligandos transmembranales. Esta vía involucra a los receptores de muerte miembros de la superfamilia de receptores del TNF (34).

La secuencia de eventos que definen la fase extrínseca de la apoptosis están mejor caracterizadas en los modelos de FasL/Fas y TNF- α /TNFR1. En estos modelos se caracterizan por la agrupación de los receptores y la unión con ligandos homólogos trimétricos. La unión de Fas ligando con el receptor Fas genera el acoplamiento de la proteína de dominio de muerte asociado a Fas (FADD, por sus siglas en inglés) y la unión del ligando TNF con el receptor de TNF resulta en el ensamblaje de la proteína adaptadora TRADD. Una vez ensambladas estas proteínas se forma un complejo de inducción de señales de muerte (DISC, por sus siglas en inglés), que promueve la activación catalítica de la procaspasa-8 (34). Cuando la caspasa-8 se activa, inicia el proceso de apoptosis.

La apoptosis mediada por receptores de muerte se puede inhibir por diversas proteínas como c-FLIP, la cual es capaz de unirse a FADD y a la caspasa-8 inactivando sus funciones. Otra proteína involucrada en la regulación de la muerte celular es la molécula Toso, esta molécula es capaz de bloquear la inducción de apoptosis por la vía Fas en linfocitos T a través de la inhibición de la caspasa-8 (34).

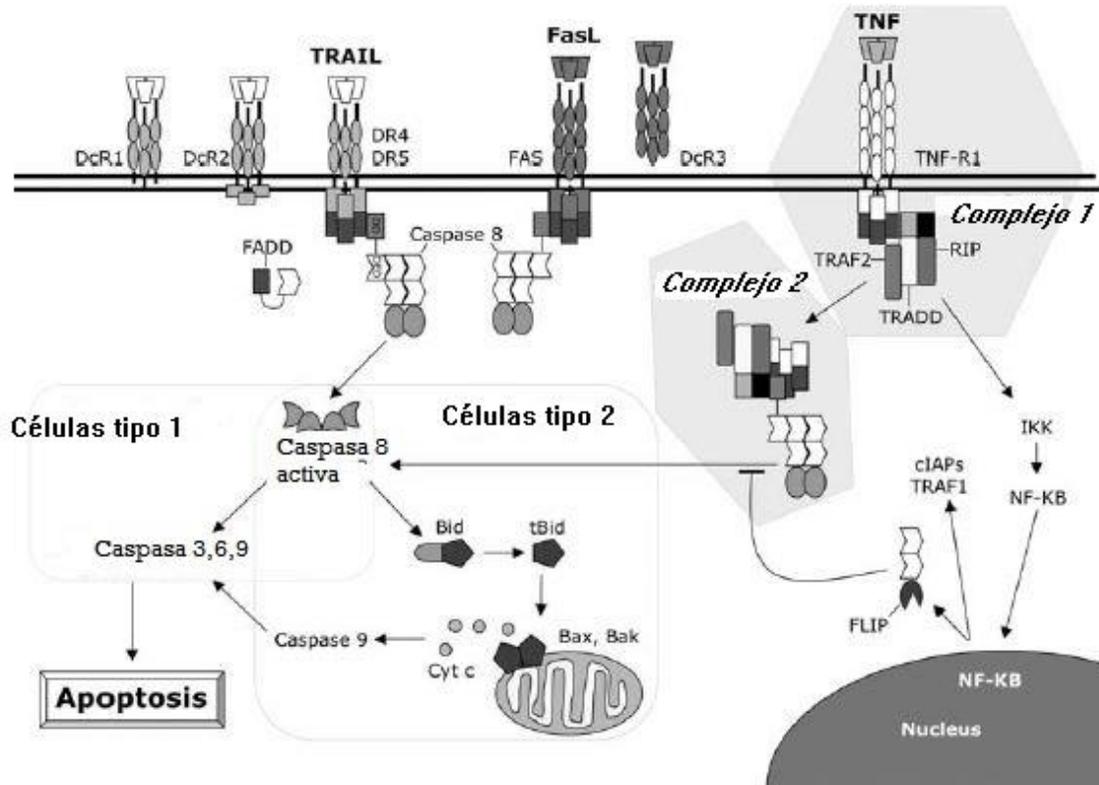


Figura 10. Vía extrínseca de la apoptosis. 1) FasL y TRAIL: después de la unión del ligando, DR4, DR5 y Fas se someten a cambios conformacionales que resultan en el ensamblaje del complejo de señalización de muerte inducida (DISC). Los receptores DcR1, DcR2 y DcR3 se unen al ligando con gran afinidad pero no inducen muerte celular. DR4, DR5 y Fas reclutan al dominio de muerte asociado a Fas (FADD) a través de dominios de muerte complementarios. FADD puede reclutar a caspasa 8 a través de sus dominios de muerte complementarios (DED's, por sus siglas en inglés). El reclutamiento de caspasa 8 al DISC conduce a una escisión autoproteolítica, liberando dos subunidades que forman la enzima activa. En las células tipo 1 la caspasa 8 escinde y activa a las caspasas efectoras 3, 6 y 7 para que se acoplen a la respuesta apoptótica. En las células tipo 2 la caspasa 8 escinde a Bid que a su vez estimula Bax y Bak que liberan factores de la mitocondria incluyendo citocromo C, activando así la vía intrínseca de la apoptosis y los niveles de caspasa 8. 2) TNF: TNF se une a TNF-R1 reclutando a TNFR-DD a través de sus dominios de muerte y un complejo de proteínas que contienen a la proteína del receptor de interacción (RIP, por sus siglas en inglés) y al Factor asociado a TNFR 2 (Complejo 1). El complejo 1 puede activar inhibidores del complejo Factor nuclear (NF)-K β . Liberando de esta forma a (NF)-K β para que entre al núcleo y comience la transcripción de genes anti.apoptóticos, incluyendo a la proteína inhibidora FLICE (FLIP) y ciAP1/2. El complejo 1 se disocia de TNF-R1 donde se une a FADD y a la caspasa 8 (Complejo 2). Si es abundante FLIP puede bloquear a la caspasa 8 del complejo 2 para evitar la autoactivación.

1.6.3.1 Vía Fas/FasL

El receptor CD95 y su ligando (CD95L) están involucrados en una ruta de señalización que regula la muerte celular en diversos tipos celulares. CD95 es un receptor transmembranal que se expresan en linfocitos activados, en tejidos de origen linfoide y en gran número de células tumorales. La expresión de CD95L se relaciona con la evasión de la respuesta inmune por parte de las células tumorales, los tumores son capaces de activar mecanismos que les permiten eliminar a linfocitos citotóxicos a través de la inducción de apoptosis vía CD95/CD95L (42).

Fas fue identificado hace más de dos décadas usando anticuerpos que inducen apoptosis en células tumorales. La activación de Fas induce cambios en la membrana plasmática, condensación nuclear y la activación de la vía de las caspasas, que es común encontrar en células sometidas a apoptosis después de la inducción con agentes quimioterapéuticos, glucocorticoides o radiación y (8).

La molécula Fas es una glicoproteína transmembranal de 399 aminoácidos, se caracteriza por tener tres regiones extracelulares con dominios de cisteína y una región de 80 aminoácidos en el dominio intracelular, este llamado "death-domain" es crítico para la señalización de la apoptosis. La expresión de Fas se incrementa en presencia de interferón- γ , TNF- α y linfocitos activados (32)(33).

La apoptosis mediada por Fas se desencadena por su ligando natural FasL. Esta molécula se expresa de manera mucho más restringida que el receptor. FasL es una proteína de membrana de 40 KiloDaltons que puede escindirse proteolíticamente para formar un trímero soluble activo. FasL puede asociarse con microvesículas lipídicas que la estabilizan y prolongan su vida media. Existen tres formas biológicamente activas de FasL, de membrana, soluble y asociado a microvesículas, generalmente su expresión es regulada por el factor nuclear de células T activadas (NFAT, por sus siglas en ingles) y por NF-K β . FasL se expresa constitutivamente en pulmón, intestino delgado, testículo y algunas estructuras de los ojos (41)(45).

Después de la unión con FasL, Fas se asocia con dos proteínas específicas, FADD y FADD caspasa-8, formando a DISC. FADD recluta a la caspasa-8 al complejo de

señalización de Fas. La caspasa-8 activa directa o indirectamente a otros miembros de la familia de las caspasas, escindiendo proteínas estructurales y reguladoras de la célula y por lo tanto en la inducción de la apoptosis (41).

Una vez reclutado DISC, la caspasa-8 se somete a un procesamiento autocatalítico produciendo la proteasa caspasa-8. En algunos tipos celulares, la apoptosis inducida por Fas también está regulada por la maquinaria mitocondrial y los miembros de la familia de Bcl2.(41) Esta vía de señalización involucra a la caspasa-9 (45). Los miembros de la familia Bcl2 estimulan a la mitocondria para liberar citocromo C, que forma un complejo con el factor de activación de proteasa y apoptosis 1 (APAF-1, por sus siglas en ingles). La caspasa-9 es activada por el complejo citocromo C/APAF-1 y esta a su vez activa a la procaspasa-3, principal degradador de la membrana nuclear (46).

En el segundo modelo sobre la señalización de Fas, se describen dominios de unión de ensamblaje a pre-ligandos extracelulares (PLADS, por sus siglas en ingles). En este modelo se describe que los PLADS se agregan a los receptores antes de la unión del ligando. Actualmente no es claro si el modelo de DISC o PLADS se complementan uno a otro, o son eventos independientes capaces de generar por si solo apoptosis (41).

Existen inhibidores endógenos de Fas que regulan la vía, incluso la activación de las caspasas y la muerte celular. FLIP es capaz de inducir cambios conformacionales en la caspasa-8, y competir con ella por la unión a DISC. FLIP se ha relacionado con la resistencia a apoptosis en células T vírgenes y en líneas celulares de melanoma. Las proteínas inhibidoras de apoptosis, inactivan las funciones de las caspasas -3, -7 y -9 a través de interacciones directas, mientras que Bcl-2 y Bcl-X_L inhiben la redistribución del citocromo C de la mitocondria al citosol. La expresión de las IAP's está regulada por el factor de transcripción nuclear NF- κ B (46).

II. Planteamiento del problema

El cáncer pulmonar es un problema de salud pública a nivel mundial en la actualidad. En México el cáncer de pulmón es uno de los más frecuentes entre hombres y mujeres. La tendencia indica que en los próximos años la incidencia y mortalidad por este tipo de cáncer aumentará en nuestro país.

Las células NK son efectores importantes del sistema inmune innato que poseen la habilidad de lisar células transformadas o infectadas por virus, independiente de la presencia o ausencia de moléculas de MHC. Estas células circulan en sangre periférica y una vez activadas son capaces de infiltrarse hacia tejidos para eliminar células infectadas o transformadas. Existen evidencias sobre la disminución en la actividad de las células NK en diversos carcinomas(47–49) incluso se ha demostrado que la actividad de las células NK es un indicador independiente del pronóstico de los pacientes con carcinoma gástrico(47). Sin embargo, los mecanismos responsables de las alteraciones en la activación y función de las células NK en pacientes con cáncer de pulmón no están definidas.

Uno de los posibles mecanismos responsables de la disminución en la eliminación de células tumorales y producción de citocinas por parte de células inmunes en pacientes con cáncer es el incremento en la apoptosis células T y NK(50). Las células tumorales expresan FasL y B7-H1, moléculas capaces de inducir apoptosis en linfocitos T y células NK, se ha sugerido que la vía Fas/FasL tiene un papel importante en el establecimiento de tumores a través de la inducción de apoptosis en linfocitos citotóxicos que infiltran tumores(51).

Se han descrito diversas alteraciones en la actividad de las células NK en varios tipos de cáncer(48) pero la expresión de Fas y su impacto en la funcionalidad de células NK de pacientes con cáncer de pulmón no se ha estudiado.

III. Objetivos

Objetivo general

Evaluar la expresión del marcador de superficie CD95 y CD178 así como su impacto en la funcionalidad de células Natural Killer de sangre periférica en pacientes con cáncer de pulmón.

Objetivos particulares

- Medir la frecuencia de células NK en pacientes con cáncer de pulmón sin tratamiento y sujetos sanos.
- Evaluar la expresión de los receptores CD95, CD178, CD56, CD158b y CD158e en células NK de pacientes con cáncer de pulmón y sujetos sanos por citometría de flujo.
- Evaluar la producción de IFN- γ en células NK de pacientes con cáncer de pulmón y sujetos sanos por citometría de flujo.
- Medir la concentración plasmática de CD178 en pacientes con cáncer de pulmón y sujetos sanos por ELISA.

IV. Hipótesis

- Las células NK de pacientes con cáncer de pulmón sobreexpresan los marcadores CD95, CD158b y CD158e en su activación y producción de citocinas.

V. Metodología

5.1 Población de estudio

Se seleccionaron 10 sujetos con diagnóstico confirmado de cáncer de pulmón de la estirpe histológica adenocarcinoma, reclutados para este estudio en colaboración con el Instituto Nacional de Cancerología. Se estudió un grupo control y un grupo de pacientes en estadio III y IV. Los pacientes incluidos en el estudio fueron reclutados y clasificados según la estirpe histológica y el estadio de la enfermedad, de acuerdo con el sistema TNM para la clasificación del cáncer de pulmón, recomendado por el Comité Americano para el Cáncer (52). El diagnóstico histológico de cáncer pulmonar de células no pequeñas primario, se estableció de acuerdo a la clasificación de tumores pulmonares de la Organización Mundial de la Salud y de la Asociación Internacional para el estudio del Cáncer de Pulmón. La evaluación preclínica incluyó el examen físico, pérdida de peso y estado físico general con un índice de ≤ 2 de acuerdo con las normas del ECOG (Eastern Cooperative Oncologic Group Scale).

5.2 Pacientes

5.2.1 Criterios de inclusión

1. Se incluyeron solo pacientes que aceptaron y firmaron carta de consentimiento informado.
2. Se incluyeron pacientes mayores de 18 años con diagnóstico histopatológico de cáncer de pulmón y que no hubieran recibido radioterapia y/o quimioterapia previa a la obtención de las muestras a analizar.
3. Citología positiva para malignidad en esputo, aspirado bronquial, cepillado bronquial, punción aspirativa pulmonar, líquido pleural o punción de otras localizaciones metastásicas.
4. Biopsia positiva para malignidad de origen bronquial, trasbronquial, pleural, pulmonar percutánea, pulmonar por toracotomía o de localizaciones metastásicas.

5.2.2 Criterios de exclusión

1. Pacientes que retiren su consentimiento y no quieran continuar con la evaluación del estudio.
2. Pacientes con un tipo histológico diferente al adenocarcinoma.

3. Pacientes que hayan recibido tratamiento quirúrgico, radiológico o de quimioterapia previo.
4. Pacientes con infecciones no controladas.
5. Pacientes con infección por VIH.

5.3 Sujetos sanos

5.3.1 Criterios de inclusión

1. Se incluyeron aquellos sujetos que hayan entendido y firmado el consentimiento informado.
2. Se incluyeron aquellos que no reporten hábito tabáquico al menos en los últimos 10 años.
3. Se incluyeron sujetos sin síntomas de cualquier enfermedad respiratoria en las dos semanas anteriores a la toma de la muestra.
4. Aquellos que presentaron espirometría normal.
5. Aquellos cuya evaluación radiológica sea considerada como normal.
6. Aquellos que presentaron valores normales en biometría hemática

Criterios de exclusión

1. Aquellos que tuvieran antecedentes familiares de cáncer de pulmón.
2. Sujetos con otro diagnóstico oncológico.
3. Sujetos con enfermedades autoinmunes (VIH, artritis, lupus, etc.)
4. Sujetos con enfisema pulmonar.

5.3.2 Criterio de eliminación

1. Retiro del consentimiento informado.

5.4 Toma de la muestra y tratamiento

Se obtuvieron 8 ml de sangre venosa heparinizada de 10 pacientes y 5 controles. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC's, por sus siglas en inglés) se obtuvieron a partir de un gradiente de centrifugación (Ficoll, Hypaque, Amsterdam), la sangre se centrifugó a 2700 RPM durante 30 minutos. La fracción de PBMC's se lavó dos veces con PBS (Buffer Fosfato Salino) y se determinó la viabilidad por microscopía óptica con azul de tripano.

5.5 Caracterización fenotípica de células NK por citometría de flujo

La tinción con anticuerpos para citometría de flujo se realizó en 1×10^6 células mononucleares de sangre periférica. Las células se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con 10 μ l de los siguientes anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de superficie de células de humano: CD3 (PE-Cy5), CD56 (APC-Cy7), CD95 (FITC), CD158b (FITC), CD158e (PE), CD178 (PE). Las células fueron adquiridas en el citómetro de flujo FACSAria con el software FACS Diva 6.5. (BD Biosciences, San José, Cal. USA) y se analizaron con el Software FlowJo V. X (Treestar, Inc, Ashland, Or, USA), En todos los casos se adquirieron 100 000 eventos.

5.6 Expresión intracelular de IFN- γ

Se analizó la expresión intracelular de IFN- γ en células NK de pacientes con cáncer y controles. Las se estimularon 1×10^6 células mononucleares de sangre periférica con PMA (50 ng/ml) un potente activador de transducción de señales de la enzima protein cinasa C y ionomicina (1 μ g/ml) ionóforo que incrementa el nivel de calcio, durante 5 horas en presencia de inhibidores del transporte de proteínas (Brefeldina A y monensina), posteriormente se incubaron con anticuerpos de superficie anti- CD3 (PE-Cy5) y anti-CD56 (APC-Cy7) durante 20 minutos. Las células se lavaron con PBS y se permeabilizaron con 450 μ l solución citofix/cytoperm (BD biosciences) durante 20 minutos, se lavaron dos veces con PBS/BSA y se incubaron con el anticuerpo intracelular anti-IFN- γ (PE) durante 20 minutos. Se lavaron y resuspendieron en PBS para su análisis por citometría de flujo como se describió anteriormente.

5.7 Cuantificación de Fas-L por ELISA

Para medir la concentración plasmática de Fas-L en pacientes con cáncer de pulmón, se utilizó el kit Human Fas Ligand/TNFSF6 Quantikine ELISA de R&D Systems. Se utilizaron los plasmas de 10 pacientes y 5 controles sanos. Los plasmas se obtuvieron centrifugando los tubos con las muestras sanguíneas 1500 rpm. Durante 10 minutos. Posteriormente se congelaron 1 ml. De plasma hasta el momento de su uso.

5.8 Análisis estadístico

Los valores obtenidos en cada una de las pruebas fueron analizados mediante la prueba estadística Shapiro-Wilk para saber si los datos obtenidos presentan una distribución

normal. Debido a que los datos no presentaban una distribución gaussiana se realizó la prueba de U de Mann-Whitney. Se consideró un valor significativo de p cuando éste sea ≤ 0.05 . Se utilizó el programa de análisis estadístico GraphPad Prism V. 5.0.4.

5.9 Consideraciones éticas

Este protocolo así como las Cartas de Consentimiento Informado para sujetos sanos y pacientes se sometieron para su aprobación por los Comités de Ciencia y Bioética de las instituciones participantes.

VI. Resultados

Características socio-demográficas y clínicas de los pacientes y controles

Se incluyeron en este estudio 10 pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas, con una media de edad de 60±14 años, 5 son mujeres y 5 hombres, El 30% de los pacientes del grupo, presentaban antecedentes de tabaquismo y/o expuestos al humo de leña (Tabla 4). El 80% de los pacientes se encontraron en la etapa clínica IV, todos ellos pertenecientes al tipo histopatológico de adenocarcinoma. El 60% de los casos presentaron derrame pleural. El 90% de los pacientes presentaban metástasis, 6 pacientes con polimetástasis y 4 con oligometástasis, mientras que 5 presentaban metástasis en sistema nervioso central.

Tabla 1. Características socio-demográficas.

	Casos <i>n=10</i> %	Controles <i>n=5</i> %	P
Sexo masculino	6/10 (60%)	3/5 (60%)	<i>P</i> < 0.5 <i>P</i> < 0.4
Edad	60±14	55±7	
Exposición humo de leña	3/10	0	<i>P</i> < 0.06
Tabaquismo	3/10	0	<i>P</i> < 0.06

Tabla 2. Características clínicas de los pacientes

Característica	Porcentaje	
Etapa clínica III/IV	2/8	80%
Histología (adenocarcinoma)	10/10	100%
Índice de masa corporal	25.63 (±3.4)	
Metástasis (si/no)	9/1	90%
Polimetastásico/Oligometastásico	6/4	60%
Metástasis SNC	5/10	50%
Derrame pleural	6/10	60%

ECOG 2/1
Karnofsky (media, \pm d.e.)

1/9
80 (\pm 10)

10%

Frecuencia de células NK

Se evaluó el porcentaje de células NK CD3⁻ CD56⁺ presentes en 10 pacientes con cáncer de pulmón y 5 controles sanos. El análisis se realizó a partir de una ventana de los parámetros Forward Scatter (FSC) vs. SideScatter (SSC) seleccionando una región de linfocitos, posteriormente se compararon a los marcadores CD3 y CD56.

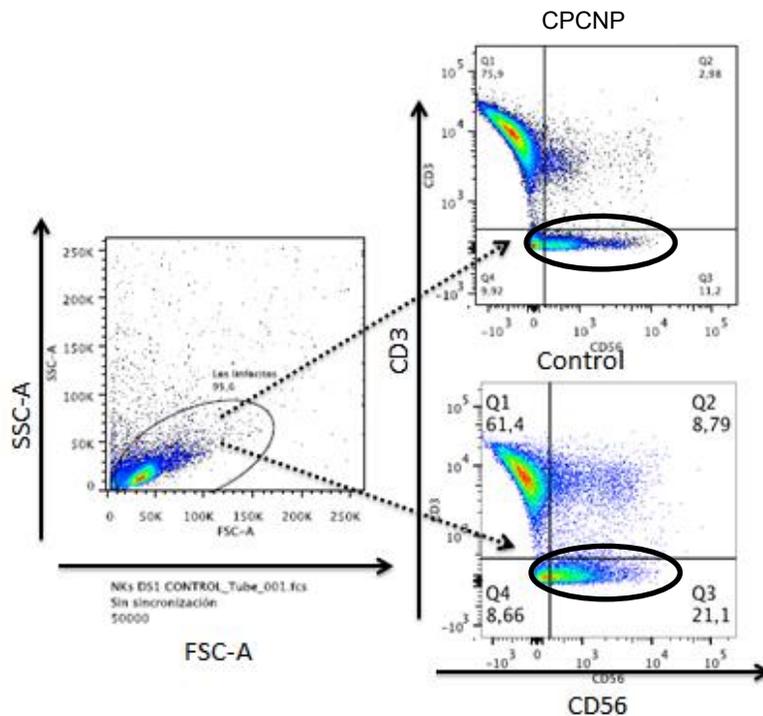


Figura 11. Ejemplo comparativo del porcentaje de células NK entre un paciente con cáncer de pulmón y un sujeto control donde se muestra la disminución en el porcentaje de estas células en pacientes al compararlos con controles. *CPCNP=cáncer de pulmón de células no pequeñas*

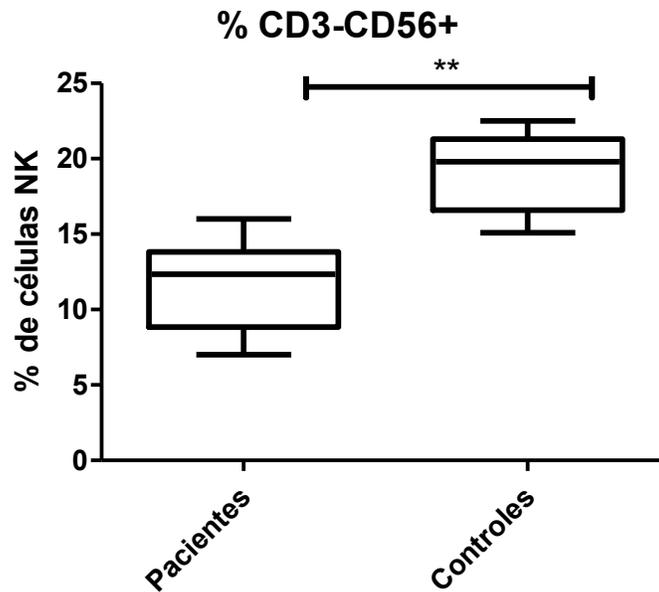


Figura 12. Porcentaje de células NK CD3⁻ CD56⁺ en pacientes con cáncer de pulmón y sujetos control. Los resultados se expresan como medianas y rangos (25-75).U de Mann-Whitney **p<0.0027

Como se muestra en la **figura 13**, los pacientes con cáncer de pulmón mostraron una disminución significativa en el porcentaje de células NK comparado con los controles [pacientes: mediana 12.32% (rango, 9.7-14); controles: mediana 19.8% (rango, 15.72, 22.53)]. Observamos que en los pacientes con cáncer de pulmón existe un menor porcentaje de células con fenotipo CD3⁻CD56⁺comparados con sujetos controles.

Frecuencia de la expresión del receptor CD95 en células NK

La evaluación de la expresión de los marcadores CD95 y CD178 se realizó mediante marcaje de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con cáncer pulmonar libres al tratamiento, así como en sujetos sanos.

Los datos mostrados en la **figura 14** representan porcentajes de células positivas en un población total de 100, 000 eventos para todas las muestras. El análisis de todas las subpoblaciones estudiadas se realizó inicialmente a partir de una ventana que mostrara a los tipos celulares por tamaño y complejidad (Forward Scatter (FSC) vs. SideScatter (SSC)). Posteriormente se analizó la expresión independiente del marcador CD95 y

CD178 en la población CD3⁻ CD56⁺. Se muestra la distribución de la frecuencia de este receptor en pacientes y controles.

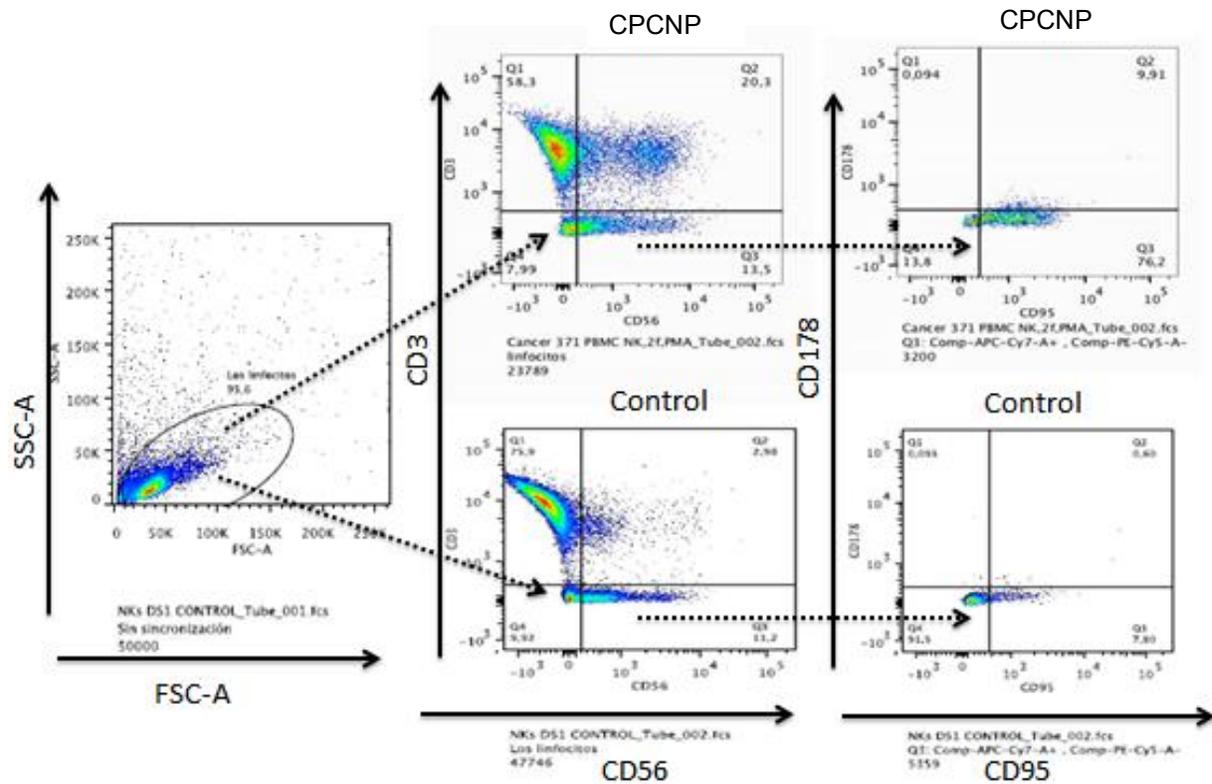


Figura 13. Estrategia de análisis para la expresión del receptor CD95 y CD178 en células CD3⁻ CD56⁺ en pacientes con cáncer de pulmón y sujetos control. Ejemplo representativo de un paciente y un control. *CPCNP=cáncer de pulmón de células no pequeñas*

Se encontró un incremento significativo en células NK positivas para la expresión del marcador CD95 en los pacientes con cáncer de pulmón, comparados con el grupo control [pacientes: mediana 45.45% (rango, 31.65-55.40); controles: mediana 13.9% (rango, 11.16-14.59)], (Figura 15A) (P<0.007).

Al analizar el marcador CD178, no encontramos diferencias significativas entre pacientes y controles [pacientes: mediana 7.89% (rango, 6.8-10.1); controles: mediana 8.76% (rango, 15.72, 22.53)] (Dato no mostrado).

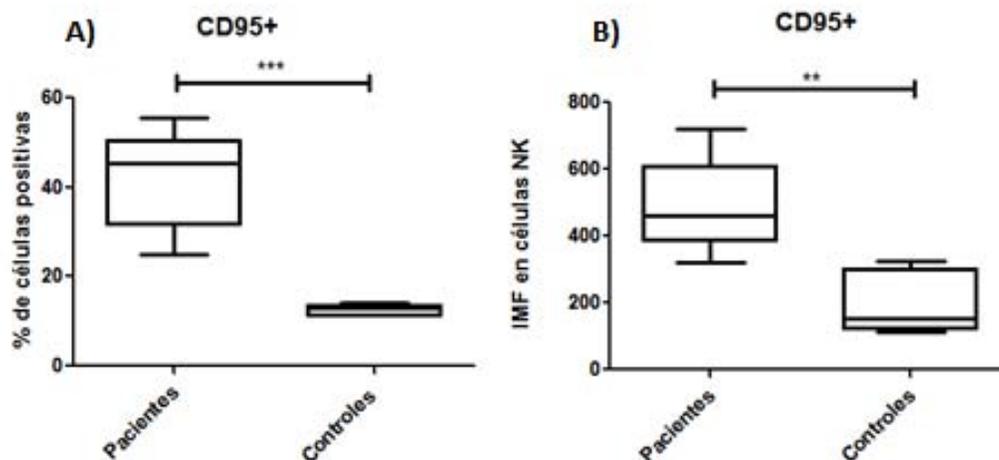


Figura 14.A) Incremento en el porcentaje de expresión del receptor CD95 en células NK de pacientes con adenocarcinoma (n=10) en comparación con controles (n=5) *Los resultados se expresan como medianas y rangos. U de Mann-Whitney *** (p<0.0007).* B) Incremento en la intensidad media de fluorescencia en pacientes con cáncer de pulmón en comparación con sujetos control *Los resultados se expresan como medianas y rangos U de Mann-Whitney ** (p<0.0013).* Se observa un incremento significativo en las dos gráficas en células CD3⁺CD56⁺ en el grupo de pacientes al compararlos con los controles.

Se realizó también el análisis de la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) del receptor CD95 en células NK. Se encontró un incremento significativo en la IMF en pacientes [Mediana: 459.5 (rango, 384.3-609)] con cáncer pulmonar libres de tratamiento comparados con sujetos control [Mediana: 154 (rango, 120.5-301)] (Figura 15 B) (P<0.0013).

Frecuencia de la expresión del receptor tipo inmunoglobulina killer CD158b en células NK

El análisis de la expresión de los receptores tipo inmunoglobulina killer se realizó a partir de la región de linfocitos en la ventana de FSC vs. SSC. Posteriormente se seleccionó a la población CD3⁺CD56⁺ para comparar la expresión de los receptores CD158b y CD158e (Figura 16).

El análisis sobre la población de células NK mostró un incremento significativo en la expresión del receptor CD158b en pacientes con cáncer pulmonar comparados con sujetos control [pacientes: mediana 21.10% (rango, 18.40-29); Controles: mediana 7.8% (rango, 6.05-9.2)] (Figura 17A).

No se identificaron diferencias estadísticas cuando se comparó la expresión del receptor CD158e en pacientes con cáncer de pulmón y en sujetos sanos [Pacientes: mediana 6.13% (rango, 5.21-7.86); Controles: mediana 7.1% (rango, 6.32-8.21)] (Dato no mostrado).

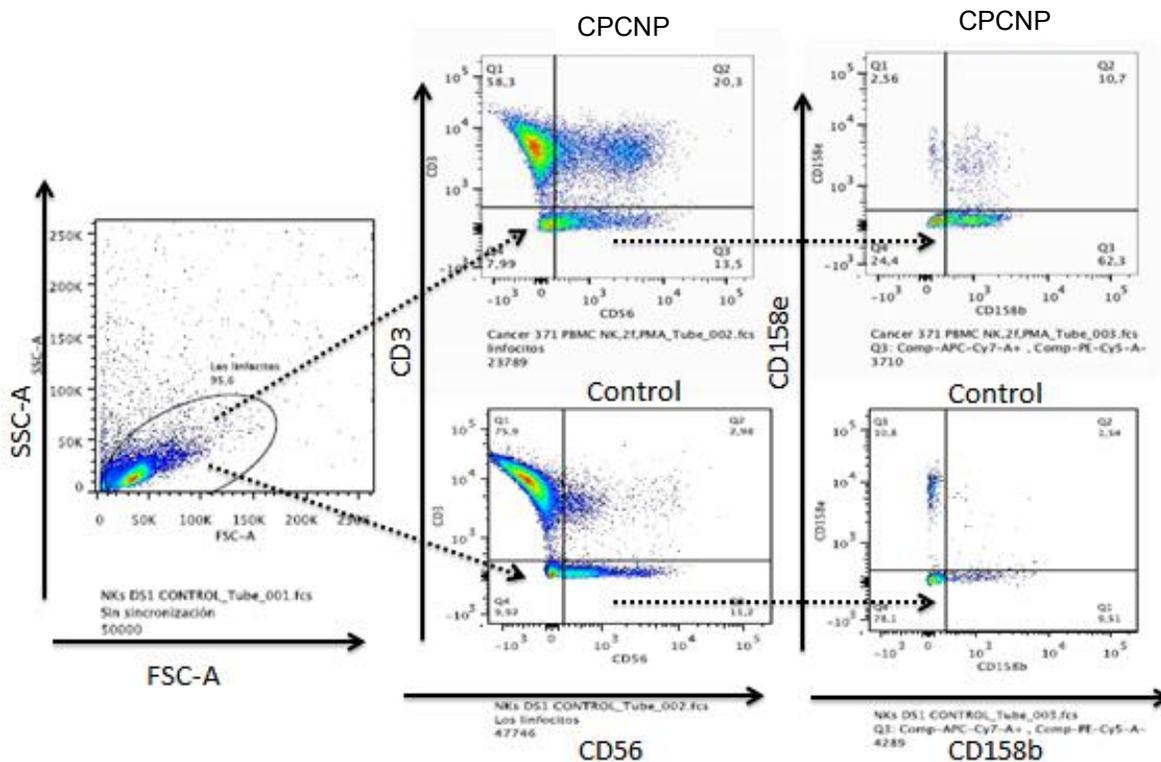


Figura 15. Estrategia de análisis para la expresión de los receptores CD158b y CD158e en pacientes con cáncer de pulmón y en sujetos control. Se observa un incremento en la expresión del receptor CD158b en pacientes al compararlos con los controles, pero no así en el receptor CD158e. Ejemplo representativo de un paciente y un control. *CPCNP= cáncer de pulmón de células no pequeñas*

De igual forma se realizó el análisis de la IMF del marcador CD158b en la población de células NK de pacientes con cáncer pulmonar comparándolo con sujetos sanos como

control [Pacientes: mediana 616% (rango, 398-813); Controles: mediana 113% (rango, 92-132)]. (Figura 17 B).

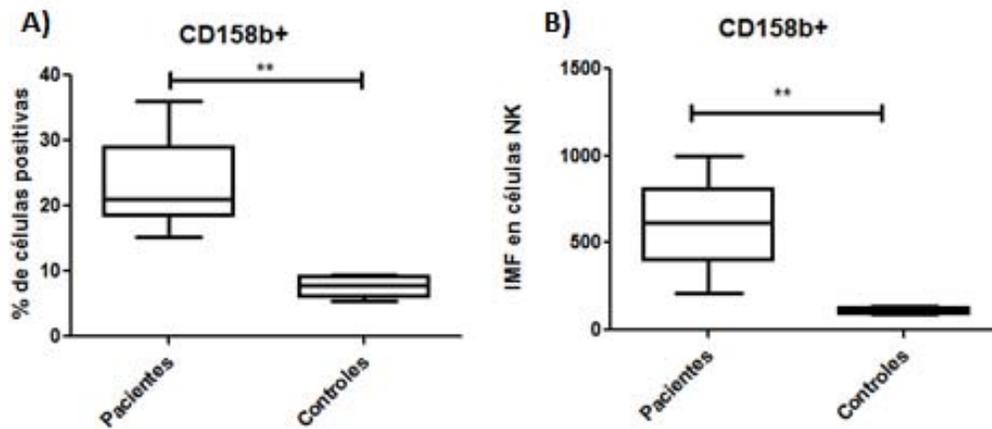


Figura 16. A) Incremento en el porcentaje de expresión del receptor CD158b en células NK de pacientes con cáncer de pulmón (n=10) en comparación con controles (n=5). Los resultados se expresan como medianas y rangos. U de Mann-Whitney ** (p<0.0022). B) Incremento en la intensidad media de fluorescencia del receptor CD158b en pacientes con cáncer de pulmón en comparación con sujetos control. Los resultados se expresan como medianas y rangos. U de Mann-Whitney ** (p<0.002). Se observa un incremento significativo en las dos gráficas en células CD3-CD56+ en el grupo de pacientes al compararlos con los controles.

Al analizar la IMF del marcador CD158b observamos un incremento significativo en pacientes con cáncer de pulmón comparado con los sujetos sanos. La IMF demuestra la sobreexpresión del receptor CD158b en células NK de pacientes con cáncer de pulmón.

Evaluación de la expresión de IFN- γ en células NK

La medición de la producción intracelular de IFN- γ se llevó a cabo en células mononucleares de sangre periférica de 10 pacientes con cáncer de pulmón y 5 sujetos sanos. Las células fueron estimuladas con PMA e ionomicina durante 5 horas y se realizó una tinción intracelular para IFN- γ . El análisis se realizó a partir de la región de linfocitos en la ventana de FSC vs. SSC. Posteriormente se seleccionó a la población CD3-CD56+ para el análisis de la expresión de IFN- γ .

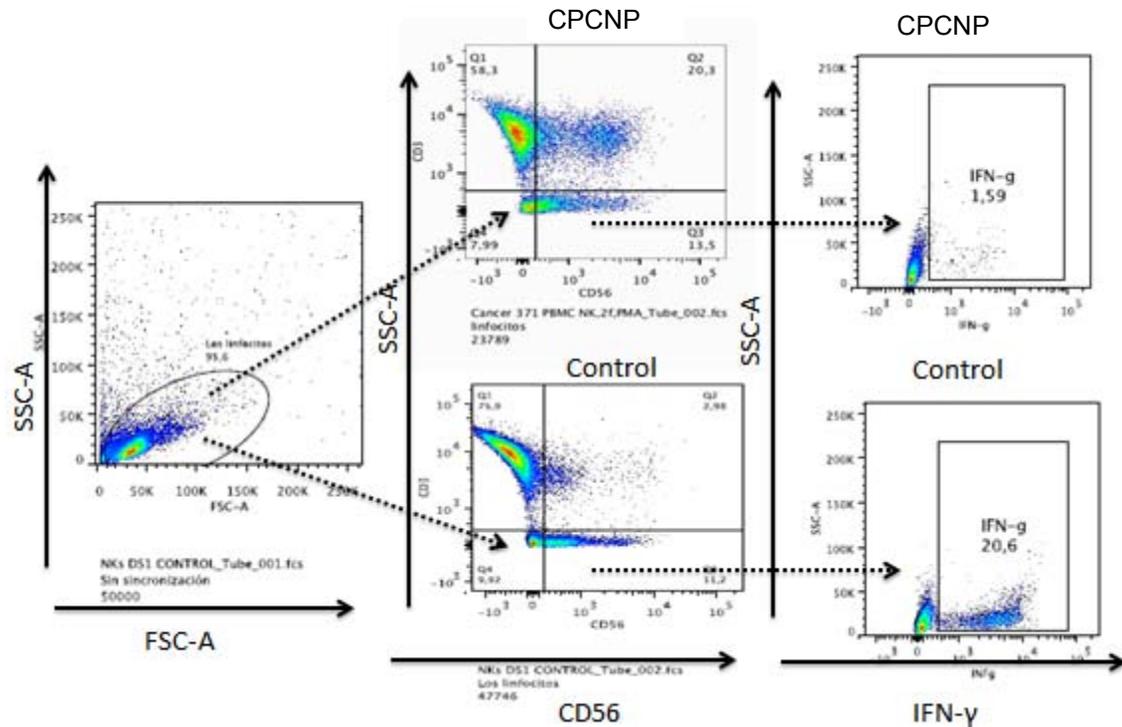


Figura 17. Estrategia de análisis para la expresión intracelular de IFN- γ en células CD3⁺ CD56⁺ de pacientes con cáncer de pulmón y sujetos control. Ejemplo representativo de un control y un paciente. CPCNP=cáncer de pulmón de células no pequeñas

El análisis mostró una disminución significativa en el número de células capaces de producir IFN- γ en pacientes con cáncer de pulmón comparado con los sujetos control [Pacientes: mediana 2.35% (rango, 1.51-3.69); Controles: mediana 15% (rango, 9.5-16.12)] (Figura 19).

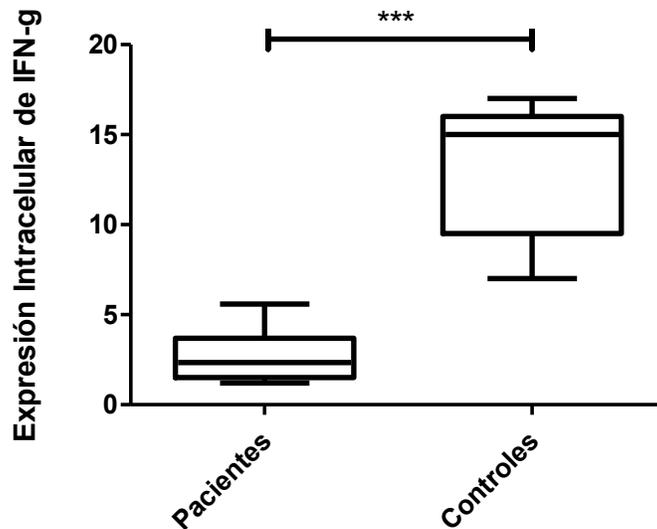


Figura 18. Porcentaje de expresión intracelular de IFN- γ en células NK de pacientes con adenocarcinoma y sujetos control. ***Los resultados se expresan como medianas y rangos. U de Mann Whitney ($p < 0.0007$)

Cuantificación del receptor soluble CD178 en plasma

Para medir la concentración plasmática de FasL soluble (CD178) se utilizó el kit Human Fas Ligand/TNFSF6 Quantikine ELISA de R&D Systems. Se utilizaron plasmas de 112 pacientes con adenocarcinoma y 30 sujetos control para la realización del inmunoensayo.

Las concentraciones de FasL soluble en los 10 pacientes fueron 90.12 ± 77 pg/ml, mientras que la concentración de FasL soluble en los sujetos control fue de 31.19 ± 43 pg/ml y no se encontraron diferencias significativas al comparar estas dos grupos.

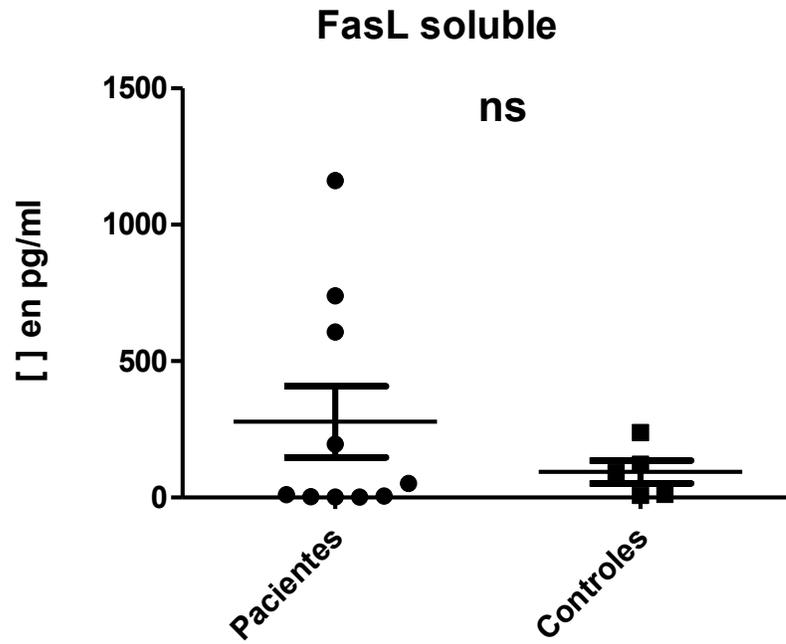


Figura 20. Concentración plasmática del receptor soluble CD178 en pacientes con adenocarcinoma y sujetos control. Los resultados se expresan con medianas y rangos. No se observan diferencias significativas. *U de Mann Whitney* ($p < 0.27$)

VII. Discusión

Las células NK representan la primera línea de defensa contra infecciones virales y células malignas transformadas. Constituyen alrededor del 15% de los linfocitos de sangre periférica y se distinguen por la expresión del marcador CD56 y la ausencia de CD3 (32).

El mecanismo a través del cual las células NK eliminan células tumorales no requiere de activación previa, aunque se sabe que citocinas como IL-2 e IL-12 incrementan la citotoxicidad en contra de éstas. Las células NK estimulan la respuesta inmune adaptativa a través de la secreción de IFN- γ , polarizando la respuesta hacia un perfil de tipo Th1 (48).

Las células NK participan en la inmunovigilancia del tumor, particularmente en leucemias, neuroblastomas y tumores del estroma gastrointestinal(47).

Se sabe que alteraciones genéticas en oncogenes y genes supresores de tumores o cambios epigenéticos en los tumores modulan el crecimiento de éste, al igual que la invasión al tejido que lo rodea, provoca un infiltrado persistente que genera inflamación. Estos infiltrados celulares modulan el desarrollo y progresión del tumor. Las células infiltradas varían en tamaño y composición dependiendo en gran medida del estadio en el que se encuentre el desarrollo del tumor. Estos infiltrados celulares son aprovechados por el tumor para generar una respuesta inmune exagerada y a través de diversos mecanismos, modular negativamente la respuesta inmune promoviendo la progresión tumoral y metástasis (53).

En el presente estudio evaluamos la frecuencia de células NK en sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón. Los resultados demuestran que los pacientes con adenocarcinoma pulmonar presentan un número reducido de células CD3⁻ CD16⁺ al compararlos con controles sanos.

Una de las posibles causas que intervienen en la reducción del número de células NK, es el incremento de poblaciones de células supresoras de origen mieloide (MDSCs, por sus siglas en inglés), estas células representan una población que tiene la capacidad de suprimir la respuesta inmune.

En pacientes con cáncer de pulmón se ha descrito con anterioridad un incremento en poblaciones con fenotipo supresor presentes en sitios del tumor así como en sangre periférica (53). Aún es relativamente pequeño el número de estudios que correlacionan con precisión la disminución de poblaciones de células NK con el incremento de poblaciones con fenotipo supresor, pero se sabe que a través de distintos mecanismos como la síntesis de citocinas, es posible regular negativamente el balance de señales en células NK(55).

Las MDSCs representan uno de los principales obstáculos para el éxito de las inmunoterapias. Diversos estudios describieron que la eliminación o inactivación de las MDSCs *in vivo* restaura la actividad antitumoral por parte de poblaciones linfocitarias en diferentes carcinomas (39,53,56,57).

Evaluamos también la expresión de Fas y FasL como posible mecanismo responsable de la disminución en las poblaciones de células NK.

Fas se caracteriza por tener tres dominios extracelulares ricos en cisteína y una región intracelular con un dominio de muerte, crítico en la señalización de la apoptosis. La expresión de Fas se induce a través de citocinas como IFN- γ y TNF- α . El mecanismo inductor de muerte celular en la vía Fas/FasL inicia cuando estas dos moléculas se unen formando un dominio de muerte llamado FADD en la células blanco. Al mismo tiempo se activa la caspasa-8 que junto a FADD forma a DISC. La caspasa-8 activa directa o indirectamente a otros miembros de la familia de las caspasas desencadenando la apoptosis (58).

FasL induce apoptosis en células susceptibles a través de la unión con su ligando Fas. Por lo general FasL se expresa en linfocitos T citotóxicos e infiltrados en el tumor y en células NK. Se ha descrito que en varios tumores como melanoma, linfoma, carcinoma esofágico, carcinoma gástrico y de colon sobreexpresan FasL como mecanismo de evasión inmunológica (59).

Los organismos han desarrollado diversos mecanismos que aseguren una rápida y selectiva eliminación de células no deseadas, uno de estos mecanismos es la interacción en la superficie celular de Fas con su ligando FasL. (49). Como habíamos mencionado

antes, la apoptosis es esencial para remover el exceso de poblaciones linfocitarias como parte de uno de los distintos mecanismos que se encargan de mantener la homeostasis durante la respuesta inmune(8). Por lo cual observamos que este proceso normal, sufre alteraciones en diversas patologías.

Nuestros resultados indican que las células NK de pacientes con carcinoma de pulmón, sobre expresan el marcador CD95 (Fas) pero no así el marcador CD178 (FasL) en comparación con los sujetos control.

Una de las funciones de Fas es la atenuación de la respuesta inmune a través de la depleción de linfocitos activados. Por el contrario, en procesos patológicos, la expresión de Fas en poblaciones linfocitarias favorece que estas entren en procesos apoptóticos (51). De esta forma, el hecho de que las células NK sobreexpresen el receptor CD95, representa un mecanismo a través de cual, las células son susceptibles a entrar en procesos apoptóticos, lo que disminuiría su número y capacidad de contrarrestar el crecimiento tumoral. El incremento en la expresión de este receptor puede inducirse a través de la secreción de diversas citocinas por parte del tumor, lo que representaría un mecanismo de evasión de la respuesta inmune por parte de las células tumorales.

En el caso del receptor CD178, no encontramos expresión del marcador en células NK en pacientes con adenocarcinoma y tampoco en los controles. Algunos estudios indican que al activar las células NK con PMA e ionomicina, en un periodo de tres horas, la molécula FasL se escinde proteolíticamente de la membrana en un estado soluble(58). Esto nos llevó a analizar los sobrenadantes de las células que fueron estimuladas con PMA e ionomicina por ELISA. Sin embargo no encontramos concentración de FasL en los sobrenadantes de células de pacientes con adenocarcinoma de pulmón y tampoco en los sujetos control. Lo que nos lleva a pensar que la molécula de FasL soluble se degradó antes analizarlo por la prueba de ELISA.

Los mecanismos de supresión que ejercen células del sistema inmune asociadas a tumores sobre células NK incluyen la secreción de diversas citocinas y/o enzimas producidas por las células T reguladoras (Treg), células dendríticas tolerogénicas, macrófagos asociados a tumor (TAM's, por sus siglas en ingles), y MDSC's. Una de estas citocinas, es el Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β , por sus siglas en ingles).

Estudios anteriores en nuestro laboratorio indican que en pacientes con adenocarcinoma de pulmón los niveles plasmáticos de TGF- β son significativamente mayores al compararlos con sujetos control (Datos no publicados).

La señalización de TGF- β involucra a las proteínas intracelulares de familia Smads, pero también se ha descrito que incrementa la actividad de otras vías intracelulares que incluyen a las MAPK, pequeñas GTPasas de la superfamilia de Ras y el fosfoinositol 3 cinasa. Esta última vía se ha relacionado ampliamente con el incremento en la expresión de Fas y la disminución en la expresión de FasL en células NK(62).

De esta forma pensamos que TGF- β podría ser el principal responsable de la inducción de un estado de anergia en células NK (40), a través de la inhibición de la expresión de diferentes marcadores de activación cruciales para el reconocimiento de células tumorales y su eliminación, al mismo tiempo que favorece el incremento de receptores de inhibición.

En este mismo contexto, nuestros resultados indican que las células NK de pacientes con cáncer de pulmón son incapaces de generar y secretar IFN- γ , aún con estímulos de ionomicina y PMA. Se ha reportado con anterioridad la correlación entre la acumulación de población con fenotipo supresor que expresan y secretan TGF- β , con la disminución en la expresión de receptores de activación y producción de IFN- γ por parte de las células NK (40,63,64). De la misma forma algunas investigaciones refieren que la eliminación de las MDSCs restaura la citotoxicidad y producción de IFN- γ por parte de las células NK.

Es importante mencionar que una de las funciones del IFN- γ es la regulación positiva de la expresión de Fas en varias líneas celulares tumorales, macrófagos y células del parénquima *in vitro*. En estudios *in vivo*, se ha demostrado que la producción de IFN- γ en diversos órganos incrementa los niveles de RNAm de Fas en células epiteliales. Además se ha demostrado que en ratones knockout para IFN- γ la expresión de Fas se reduce hasta en un 50% comparados con animales wildtype(65).

De esta forma, la atenuación de las células NK, por parte de MDSCs o cualquier otra población con fenotipo supresor, a través de TGF- β , ya sea por contacto célula-célula o en

forma soluble; podría representar un mecanismo de evasión de la respuesta inmune por parte de células cancerígenas en pacientes con adenocarcinoma de pulmón.

Por otra parte, el análisis de las concentraciones de CD95 y CD178 en plasma ha sido utilizado con anterioridad para proveer información acerca del estado de metástasis y la respuesta a quimioterapia en pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas. FasL se forma a partir de la escisión por metaloproteinasas; es una proteína transmembranal miembro de la familia de citocinas de factor de necrosis tumoral, éste se expresa en células NK, células T y una gran variedad de tumores los cuales también son capaces de expresar Fas. Se observaron altos niveles de FasL soluble en alteraciones hematopoyéticas, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer esofaríngeo y pancreático. El potencial citotóxico de FasL soluble es significativamente menor al FasL que encontramos en la superficie celular, pero aun así, es capaz de generar apoptosis en la célula blanco (66).

El sistema Fas-FasL que predomina entre las células tumorales y el sistema inmune, es altamente complejo. La expresión aberrante de FasL en una constante en células tumorales, esta expresión aberrante incrementa las posibilidades de una mayor invasión a los tejidos adyacentes, metástasis y facilita el escape a la respuesta inmune. La invasión y metástasis por parte de las células tumorales genera una secreción importante de metaloproteinasas de matriz, las células tumorales rodean a las células estromales, provocando una síntesis excesiva de metaloproteinasas que desestabilizan la integridad del tejido. Algunos autores refieren a este mecanismo como responsable del aumento de FasL soluble en plasma de pacientes con diversos carcinomas (66)(67).

Diversos inhibidores sintéticos de metaloproteinasas de matriz se utilizan actualmente para impedir la remodelación del tejido y angiogénesis por parte de las células tumorales, aunque aún no se ha demostrado que este tipo de terapia influya directamente en los niveles circulantes de FasL, debido principalmente a los pocos estudios realizados.

Se sabe que FasL se expresa con intensidad en la superficie de células tumorales en pacientes con SCLC, y al igual que el FasL soluble, puede contrarrestar la respuesta inmune del hospedero, incrementando las probabilidades de que células tumorales escapen. Se ha propuesto que el sistema de señalización Fas/FasL tiene un papel

importante en la apoptosis inducida por quimioterapia en algunos tipos de células en carcinomas celulares. La expresión de Fas y FasL, al igual que los niveles de FasL soluble, se incrementan en células de NSCLC después de la exposición a agentes anticancerosos(66).

El origen del Fas-L soluble aún no está esclarecido, pero existen tres posibles rutas que podrían relacionarse. Podría derivarse del sitio tumoral, de los linfocitos de sangre periférica o del estroma que rodea al tejido tumoral en respuesta a la activación de células inmunes(68). Sin embargo, está claro que el tratamiento de quimioterapia afecta a las vías involucradas en la producción de esta molécula soluble.

Aunque este estudio no tiene como objetivo determinar que la concentración de Fas-L soluble sea útil como un marcador pronóstico, el incremento de estudios donde se incluyan un número mayor de pacientes y controles podría lograr este objetivo.

Como se mencionó anteriormente, las células NK expresan una gran variedad de receptores pertenecientes a diferentes familias, que regulan tanto la actividad citotóxica como la inhibición de esta. Los receptores de tipo inmunoglobulina Killer (KIR), pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, que se pueden clasificar en dos grupos, los primeros con características inhibitorias que se caracterizan por tener una cola citoplasmática tipo "Long" y dos o tres dominios tipo inmunoglobulina extracelulares, señalizan a través de motivos inhibitorios ricos en tirosina(32). Los segundos, con funciones de activación poseen dos o tres dominios tipo inmunoglobulina extracelulares y una cola citoplasmática tipo "short", estos receptores señalizan a través de la molécula adaptadora DAP12.

Los receptores KIR de inhibición se caracterizan por bloquear la actividad citotóxica de las células NK a través de la unión a moléculas HLA de clase I, sin embargo, la pérdida de moléculas HLA por parte de la célula blanco activa a las células NK desencadenando una respuesta citotóxica(33).

Como parte de este estudio, se evaluó la expresión de los receptores CD158b y CD158e, en células NK de pacientes con cáncer de pulmón. Estos dos receptores se caracterizan por inhibir la citotoxicidad de células NK y bloquear la lisis de la célula blanco. El

incremento en la expresión de CD158b en pacientes con cáncer de pulmón reduce potencialmente la función citotóxica en presencia de moléculas HLA clase I que se expresan en células tumorales (32).

Diversos estudios sostienen que la expresión de los receptores KIR es modulada por los diferentes genotipos de HLA. Se ha observado que la frecuencia de células NK que expresan los distintos KIR está ampliamente relacionado al tipo de alelo HLA en las células, de esta forma en células de donadores que poseen el alelo HLA-C2 el número de células NK que expresan CD158e es mayor en comparación con células de donadores que han perdido el alelo HLA-C2. Para el caso del marcador CD158b, su expresión se relaciona con el ligando HLA-C1(32).

Se ha demostrado que la expresión de los KIR en células CD16⁺ CD56⁺ incrementa alrededor de un 10% después de ser incubarlas con IL-2+IL12+IL15 por 6 días, de la misma forma el estímulo con IL2+IL18 tiene la capacidad de incrementar la expresión de CD158b y CD158e. Existe la posibilidad de que el incremento en los niveles de citocinas *in vivo* sea la responsable del aumento en la expresión de los receptores CD158b y CD158e en pacientes con cáncer de pulmón(33).

En adición a los defectos funcionales en las células NK de pacientes con cáncer de pulmón, el incremento en la expresión de CD158b por parte de estas células contribuye a inhibir su función en presencia de moléculas HLA de clase 1. La disminución en la producción de IFN- γ puede, indirectamente, prevenir la activación de células T contra el tumor. Con todas estas disfunciones, las células NK son incapaces de migrar a sitios tumorales y cumplir sus funciones efectoras.

VIII. Conclusión

Nuestros resultados sugieren que las células NK de pacientes con cáncer de pulmón son fenotípica y funcionalmente diferentes comparadas con controles sanos. Las diferencias encontradas son la disminución en el porcentaje de células NK y en la producción de IFN- γ , al igual que un incremento en la expresión de los receptores CD95 y CD158b.

La actividad antitumoral de las células NK las convierte en una herramienta para dirigir estrategias terapéuticas para la inmunoterapia contra el cáncer. Una de las principales ventajas es que las deficiencias selectivas en las células NK son extremadamente raras, por lo que el hecho de encontrar células NK infiltradas en los tejidos tumorales, se asocia con una mejor prognosis en pacientes con diversos carcinomas. A pesar de esto, es un hecho que las células NK sufren alteraciones biológicas debido al microambiente tumoral, Por lo que conocer el estado de las células NK circulantes contribuiría al desarrollo de nuevas inmunoterapias.

IX. Bibliografía

1. Carla D, Velasco RM, De C. Cáncer de pulmón. 2009;33–45.
2. Medina-morales F, Salazar-flores M. Frecuencia y patrón cambiante del cáncer pulmonar en México. 2000;42(4).
3. Arrieta O, Alba EG, Alba-lópez LF, Acosta-espinoza A, Alatorre-alexander J, Alexander-meza JF, et al. Consenso nacional de diagnóstico y tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas. 2013;65:5–84.
4. Igney FH, Krammer PH. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2002 Jun;71(6):907–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12050175>
5. Luci C, Tomasello E. Natural killer cells: detectors of stress. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2008 Jan [cited 2012 Sep 24];40(11):2335–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18595768>
6. Farag SS, Caligiuri M a. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev* [Internet]. 2006 May [cited 2012 Jul 18];20(3):123–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16364519>
7. Knorr D a, Kaufman DS. Pluripotent stem cell-derived natural killer cells for cancer therapy. *Transl Res* [Internet]. Mosby, Inc.; 2010 Sep [cited 2012 Sep 24];156(3):147–54. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2932648&tool=pmcentrez&render type=abstract>
8. Sharma K, Wang RX, Zhang LY, Yin DL, Luo XY, Solomon JC, et al. Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2000 Dec;88(3):333–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11337030>
9. Hanahan D, Weinberg R a. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011 Mar 4 [cited 2012 Jul 12];144(5):646–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>
10. Hanahan D, Weinberg RA, Francisco S. The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco. 2000;100:57–70.
11. Ames BN, Gold LS, Berkeley L. The Causes and Prevention of Cancer : Gaining Perspective. 1997;105(June):865–73.
12. Thompson RH, Dong H, Kwon ED. Implications of B7-H1 expression in clear cell carcinoma of the kidney for prognostication and therapy. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2007 Jan 15 [cited 2014 Jan 16];13(2 Pt 2):709s – 715s. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17255298>
13. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* [Internet]. 2010 Dec 15 [cited

2013 Aug 6];127(12):2893–917. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21351269>

14. de las enfermedades no transmisibles 2010 de las enfermedades no transmisibles. 2010;
15. Ruíz-Godoy L, Rizo Rios P, Sánchez Cervantes F, Osornio-Vargas a, García-Cuellar C, Meneses García a. Mortality due to lung cancer in Mexico. *Lung Cancer* [Internet]. 2007 Nov [cited 2013 Aug 23];58(2):184–90. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17659812>
16. Massion PP, Carbone DP. The molecular basis of lung cancer : molecular abnormalities and therapeutic implications. 2003;15:1–15.
17. Arrieta O, Campos-Parra AD, Zuloaga C, Avilés A, Sánchez-Reyes R, Manríquez MEV, et al. Clinical and pathological characteristics, outcome and mutational profiles regarding non-small-cell lung cancer related to wood-smoke exposure. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2012 Aug;7(8):1228–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22659961>
18. Lee YJ, Kim J-H, Kim SK, Ha S-J, Mok TS, Mitsudomi T, et al. Lung cancer in never smokers: change of a mindset in the molecular era. *Lung Cancer* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2011 Apr [cited 2014 Jan 16];72(1):9–15. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21272954>
19. Cohen AJ, Arden C, Speizer FE, Sc D, Pope CA, Ph D. Ambient air pollution as a risk factor for lung cancer. 1997;39:0–10.
20. Field RW, Krewski D, Lubin JH, Zielinski JM, Alavanja M, Catalan VS, et al. An overview of the North American residential radon and lung cancer case-control studies. *J Toxicol Environ Health A* [Internet]. 2006 Apr [cited 2014 Jan 16];69(7):599–631. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16608829>
21. Paris C, Benichou J, Raffaelli C, Genevois A, Fournier L, Menard G, et al. Factors associated with early-stage pulmonary fibrosis as determined by high-resolution computed tomography among persons occupationally exposed to asbestos. *Scand J Work Environ Health* [Internet]. 2004 Jun [cited 2014 Jan 16];30(3):206–14. Available from:
http://www.sjweh.fi/show_abstract.php?abstract_id=781
22. Travis WD. Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med* [Internet]. Elsevier Inc; 2011 Dec [cited 2014 Jan 28];32(4):669–92. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22054879>
23. Anumanthan G, Halder SK, Osada H, Takahashi T, Massion PP, Carbone DP, et al. Restoration of TGF-beta signalling reduces tumorigenicity in human lung cancer cells. *Br J Cancer* [Internet]. 2005 Nov 14 [cited 2012 Sep 17];93(10):1157–67. Available from:
http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2361493&tool=pmcentrez&render_type=abstract
24. Stämpfli MR, Anderson GP. disease and cancer. 2009;9(mAy):377–84.
25. Spugnini EP, Bosari S, Citro G, Lorenzon I, Cognetti F, Baldi A. Human malignant mesothelioma: molecular mechanisms of pathogenesis and progression. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2006 Jan [cited 2014 Jan 28];38(12):2000–4. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16963313>

26. De Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2006 Jan [cited 2012 Jul 12];6(1):24–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16397525>
27. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. 2001;410(April):1107–11.
28. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2006 Oct [cited 2014 Jan 22];6(10):715–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16977338>
29. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012 Apr [cited 2012 Jul 16];12(4):253–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22437938>
30. Cells T. IMMUNOSUPPRESSIVE STRATEGIES THAT ARE MEDIATED BY. 2010;267–96.
31. Fan Y, Yang B, Wu C. Phenotypically and functionally distinct subsets of natural killer cells in human PBMCs. *Cell Biol Int* [Internet]. 2008 Feb [cited 2012 Aug 15];32(2):188–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17920947>
32. Omar SY AI, Middleton D, Christmas SE. Increased killer immunoglobulin-like receptor expression and functional defects in natural killer cells in lung cancer. 2011;80:94–104.
33. Bae DS, Hwang YK, Lee JK. Importance of NKG2D-NKG2D ligands interaction for cytolytic activity of natural killer cell. *Cell Immunol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012 Mar [cited 2012 Aug 3];276(1-2):122–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22613008>
34. Elmore S. NIH Public Access. 2007;35(4):495–516.
35. Bryceson YT, March ME, Ljunggren H-G, Long EO. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* [Internet]. 2006 Jan 1 [cited 2013 Aug 23];107(1):159–66. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1895346&tool=pmcentrez&render type=abstract>
36. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2008 Aug [cited 2012 Jul 19];8(8):618–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18633355>
37. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. 2009;9(March).
38. Zea AH, Rodriguez PC, Atkins MB, Hernandez C, Signoretti S, Zabaleta J, et al. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res* [Internet]. 2005 Apr 15;65(8):3044–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15833831>
39. Liu C-Y, Wang Y-M, Wang C-L, Feng P-H, Ko H-W, Liu Y-H, et al. Population alterations of L-arginase- and inducible nitric oxide synthase-expressed CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺/CD33⁺ myeloid-derived suppressor cells and CD8⁺ T lymphocytes in patients with advanced-stage

- non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2010 Jan [cited 2012 Jul 22];136(1):35–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19572148>
40. Li H, Han Y, Guo Q, Zhang M, Cao X. Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol* [Internet]. 2009 Jan 1;182(1):240–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19109155>
 41. Reichmann E. The biological role of the Fas / FasL system during tumor formation and progression. 2002;12(02):309–15.
 42. Fulda S, Debatin K-M. Exploiting death receptor signaling pathways for tumor therapy. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2004 Dec 10 [cited 2013 Mar 8];1705(1):27–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15585171>
 43. Movahedi K, Guillemins M, Van den Bossche J, Van den Bergh R, Gysemans C, Beschin A, et al. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* [Internet]. 2008 Apr 15 [cited 2012 Aug 13];111(8):4233–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18272812>
 44. Jin Z, El-deiry WS. Overview of Cell Death Signaling Pathways ND ES SC OVERVIEW OF APOPTOSIS. 2005;(February):139–63.
 45. Gordon N, Kleinerman ES. Pediatric and Adolescent Osteosarcoma. Jaffe N, Bruland OS, Bielack S, editors. Boston, MA: Springer US; 2010 [cited 2013 Mar 13];152:497–508. Available from: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-4419-0284-9>
 46. Abrams SI. Laboratory of Tumor Immunology and Biology, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, 10 Center Drive, Room 5B46, Bethesda, MD 20892-1402 U.S.A. 2005;809–21.
 47. Saito H, Takaya S, Osaki T, Ikeguchi M. Increased apoptosis and elevated Fas expression in circulating natural killer cells in gastric cancer patients. *Gastric Cancer* [Internet]. 2012 Nov 22 [cited 2013 Feb 3]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23179366>
 48. Lin C-T, Yu M-T, Li C, Ho Y-C, Shen C-H, Liu D-W, et al. Dysfunction of natural killer cells in patients with transitional cell carcinoma. *Cancer Lett* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2010 May 1 [cited 2012 Sep 24];291(1):39–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19931980>
 49. Houston A, O'Connell J. The Fas signalling pathway and its role in the pathogenesis of cancer. *Curr Opin Pharmacol* [Internet]. 2004 Aug [cited 2013 Mar 23];4(4):321–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15251123>
 50. Prado-Garcia H, Romero-Garcia S, Morales-Fuentes J, Aguilar-Cazares D, Lopez-Gonzalez JS. Activation-induced cell death of memory CD8+ T cells from pleural effusion of lung cancer patients is mediated by the type II Fas-induced apoptotic pathway. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 2012 Jul [cited 2014 Aug 9];61(7):1065–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22159518>
 51. Lee S-H, Bar-Haim E, Goldberger O, Reich-Zeliger S, Vadai E, Tzehoval E, et al. Expression of FasL by tumor cells does not abrogate anti-tumor CTL function. *Immunol Lett* [Internet]. 2004 Feb 15 [cited 2013 Mar 23];91(2-3):119–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15019279>

52. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome P a, Rami-Porta R, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2007 Aug;2(8):706–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17762336>
53. Srivastava MK, Zhu L, Harris-White M, Kar UK, Kar U, Huang M, et al. Myeloid suppressor cell depletion augments antitumor activity in lung cancer. *PLoS One* [Internet]. 2012 Jan [cited 2014 Aug 30];7(7):e40677. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3398024&tool=pmcentrez&render type=abstract>
54. Nagaraj S, Collazo M, Corzo C a, Youn J-I, Ortiz M, Quiceno D, et al. Regulatory myeloid suppressor cells in health and disease. *Cancer Res* [Internet]. 2009 Oct 1 [cited 2012 Aug 27];69(19):7503–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2756310&tool=pmcentrez&render type=abstract>
55. Hoechst B, Voigtlaender T, Ormandy L, Gamrekelashvili J, Zhao F, Wedemeyer H, et al. Myeloid derived suppressor cells inhibit natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma via the NKp30 receptor. *Hepatology* [Internet]. 2009 Sep [cited 2012 Sep 3];50(3):799–807. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19551844>
56. Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, Montero AJ. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 2009 Jan [cited 2012 Jul 25];58(1):49–59. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3401888&tool=pmcentrez&render type=abstract>
57. Manuscript A. of melanoma. 2013;189(11):5147–54.
58. Lee H, Ferguson T a. Biology of FasL. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2003 Jun [cited 2013 Mar 23];14(3-4):325–35. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359610103000285>
59. Kim R, Emi M, Tanabe K, Uchida Y, Toge T. The role of Fas ligand and transforming growth factor beta in tumor progression: molecular mechanisms of immune privilege via Fas-mediated apoptosis and potential targets for cancer therapy. *Cancer* [Internet]. 2004 Jun 1 [cited 2014 Feb 23];100(11):2281–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15160330>
60. Pardali K, Moustakas A. Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. [Internet]. *Biochimica et biophysica acta*. 2007. p. 21–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16904831>
61. Akhurst RJ, Derynck R. TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2001 Nov;11(11):S44–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11684442>
62. Cai Z, Yang F, Yu L, Yu Z, Jiang L, Wang Q, et al. Activated T cell exosomes promote tumor invasion via Fas signaling pathway. *J Immunol* [Internet]. 2012 Jun 15 [cited 2014 Sep 21];188(12):5954–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22573809>

63. Centuori SM, Trad M, Lacasse CJ, Alizadeh D, Larmonier CB, Hanke NT, et al. Myeloid-derived suppressor cells from tumor-bearing mice impair TGF- β -induced differentiation of CD4+CD25+FoxP3+ Tregs from CD4+CD25-FoxP3- T cells. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2012 Aug 16 [cited 2012 Aug 27];92(November):1–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22891289>
64. Ghiringhelli F, Ménard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med* [Internet]. 2005 Oct 17 [cited 2012 Jul 13];202(8):1075–85. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2213209&tool=pmcentrez&render_type=abstract
65. Roth E, Pircher H. IFN-gamma promotes Fas ligand- and perforin-mediated liver cell destruction by cytotoxic CD8 T cells. *J Immunol* [Internet]. 2004 Feb 1;172(3):1588–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14734739>
66. Shimizu M, Kondo M, Ito Y, Kume H. Soluble Fas and Fas ligand provide new information on metastasis and response to chemotherapy in SCLC patients. 2005;29:175–80.
67. Codony-Servat J, Garcia-Albeniz X, Pericay C, Alonso V, Escudero P, Fernández-Martos C, et al. Soluble FAS in the prediction of benefit from cetuximab and irinotecan for patients with advanced colorectal cancer. *Med Oncol* [Internet]. 2013 Mar [cited 2013 Mar 21];30(1):428. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23338968>
68. Naumnik W, Izycki T, Ossolińska M, Chyczewska E. serum levels of sfas and sfasl during chemotherapy of lung cancer. 2007;2007:132–6.