



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA DE PACIENTES CON CÁNCER PULMONAR
EN TRATAMIENTO POR QUIMIOTERAPIA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

LORENZO ISLAS VÁZQUEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
DRA. SARA HUERTA YEPEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CD.MX., Mayo, 2017



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.

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 13 de marzo de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **ISLAS VÁZQUEZ LORENZO** con número de cuenta **99146025**, con la tesis titulada **"ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA DE PACIENTES CON CÁNCER PULMONAR EN TRATAMIENTO POR QUIMIOTERAPIA"**, realizada bajo la dirección del **DR. JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ**:

Presidente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Vocal: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA
Secretario: DRA. GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO
Suplente: DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO
Suplente: DRA. SARA HUERTA YEPEZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 08 de mayo de 2017

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

- Agradezco al posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por la formación académica otorgada durante la realización de este proyecto.
- Agradezco a CONACYT el apoyo económico otorgado a través de la beca para estudios de posgrado (307085).
- Agradezco al Doctor José Sullivan López González por el apoyo tanto académico como profesional que me ha brindado a lo largo de toda mi formación académica, por ser un ejemplo a seguir en este mundo de la investigación. Agradezco a las Doctoras Gloria Soldevila y Sara Huerta por haber aceptado ser parte de mi comité tutorial, por los comentarios, sugerencias y buenas ideas aportadas durante la realización del proyecto, así como por ser un apoyo más en este camino.

AGRADECIMIENTOS.

A mi familia que me ha brindado su apoyo durante toda mi vida, a mi mamá que siempre ha estado al pendiente de mí, a mi papá que siempre me ha impulsado a ser una mejor persona, a mis hermanos y sobrinos latosos que han sido ejemplo y motivación para seguir adelante.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Cáncer Pulmonar con los que he compartido experiencias e historias muy suí generis. En especial agradezco al Dr. Sullivan por haberme invitado hace tiempo a formar parte de su grupo, por orientarme en los momentos de vacilación, por patearme el cerebro cuando era necesario y por guiarme a lo largo del camino de la investigación. A los doctores Heriberto, Susana, Dolores, Ángeles, al M. en C. Manuel y la QFB Miriam por el apoyo y comentarios durante todo el tiempo que he estado en el laboratorio. A los pupilos que han pasado por este laboratorio (Vero, Ere, Rodolfo S., Ricardo, Servando, Guillermo, Alma, Jimena, Christian, Rodolfo C., Alfredo, Mariana) con los cuales he pasado muchos momentos agradables tanto dentro como fuera del laboratorio.

A mis amigos Alex, Nefi, Armando, Víctor, Hector “Compadre”, Barcenas, Pliego, Jonathan “Minge”, con quienes he compartido grandes anécdotas.

A Edith B1, por estar a mi lado todo este tiempo, por apoyarme en todo momento, por motivarme a seguir adelante ¡GRACIAS! Eres lo mejor que me ha pasado, sabes que este logro también es tuyo ¡T'E AMO!

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	i
ABREVIATURAS	ii
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
Cáncer Pulmonar	5
Inflamación crónica y cáncer	7
Sistema inmunológico y cáncer	8
<i>Inmunoección</i>	8
Mediadores solubles presentes en el microambiente tumoral	10
<i>Interferón γ (IFN-γ)</i>	11
<i>Factor de necrosis tumoral α (TNF-α)</i>	11
<i>Especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS)</i>	12
<i>Interleucina 1 (IL-1)</i>	12
<i>Interleucina 2 (IL-2)</i>	12
<i>Interleucina 4 (IL-4)</i>	13
<i>Interleucina 6 (IL-6)</i>	13
<i>Interleucina 8 (IL-8)</i>	14
<i>Interleucina 10 (IL-10)</i>	14
<i>Interleucina 17 (IL-17)</i>	14
<i>Factor de crecimiento transformante β (TGF-β)</i>	15
<i>Factor de crecimiento epitelial vascular (VEGF)</i>	15
Poblaciones celulares presentes en el microambiente tumoral	16
<i>Células asesinas naturales (Natural Killer [NK])</i>	16
<i>Neutrófilos</i>	17
<i>Macrófagos (M1/M2)</i>	18
<i>Células Dendríticas (DC)</i>	19
<i>Células Mieloides Supresoras (MDSC)</i>	19
<i>Linfocitos T CD4⁺</i>	20
<i>Linfocitos T CD8⁺</i>	24
ANTECEDENTES	26
Diagnóstico y tratamiento	26
<i>Cisplatino/Carboplatino</i>	26
<i>Taxanos (Paclitaxel/Docetaxel)</i>	27
Muerte Celular Inmunogénica	27
Quimioterapia y Sistema Inmunológico	28
Antecedentes directos del laboratorio	30
HIPÓTESIS	31
OBJETIVO GENERAL	32
Objetivos Particulares	32

METODOLOGÍA	33
Tipo de estudio y grupos de estudio	33
Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	33
Muestras biológicas	34
Separación de plasma y células mononucleares	34
Cuantificación de citocinas en plasma	34
Identificación de subpoblaciones de linfocitos T CD4 ⁺ , CD8 ⁺ y fenotipo naive, efector, de memoria central y de memoria efectora.	35
Purificación de células CD4 ⁺	36
Protocolo de tinción para citometría de flujo y adquisición de datos	37
Estrategias de análisis para los datos obtenidos por citometría de flujo	38
Análisis estadístico	41
RESULTADOS	42
Resultados obtenidos de acuerdo a los grupos de estudio sin tratamiento.....	42
<i>Concentración de citocinas en plasma</i>	42
<i>Porcentaje de linfocitos Th1, Th2, Th17 y Treg</i>	42
<i>Porcentaje de linfocitos Th17 productores de IL-17 y linfocitos Treg LAP TGF-β⁺</i>	43
<i>Porcentaje de linfocitos T CD8⁺ y proporción de CTLs que expresan granzima B y perforina</i>	43
<i>Porcentajes de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ con fenotipo naive, efector, de memoria central y de memoria efectora</i>	44
Resultados obtenidos de los pacientes en tratamiento por quimioterapia	49
<i>Concentración de citocinas en plasma.</i>	49
<i>Porcentaje de linfocitos Th1, Th2, Th17 y Treg</i>	49
<i>Porcentaje de linfocitos T CD8⁺ y proporción de CTLs que expresaron granzima B y perforina</i>	49
<i>Porcentajes de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ con fenotipo naive, efector, de memoria central y de memoria efectora</i>	49
Resultados en el grupo de pacientes de acuerdo a la sobrevida media de los pacientes.....	53
<i>Concentración de citocinas en plasma</i>	53
<i>Porcentaje de linfocitos Th1, Th2, Th17 y Treg</i>	54
<i>Porcentaje de linfocitos T CD8⁺ y proporción de CTLs que expresan granzima B y perforina</i>	54
<i>Porcentajes de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ con fenotipo naive, efector, de memoria central y de memoria efectora</i>	55
DISCUSIÓN	64
Tratamiento, sistema inmunológico y sobrevida	65
CONCLUSIONES	69
LITERATURA CITADA	70
ARTÍCULO DE REQUISITO	77

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

ESQUEMA 1. ESTRATEGIA REPRESENTATIVA DE ADQUISICIÓN DE DATOS EN EL CITÓMETRO DE FLUJO A PARTIR DE PBMCS.	38
ESQUEMA 2. ESTRATEGIA REPRESENTATIVA DE ANÁLISIS DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T CD3 ⁺	39
ESQUEMA 3. ESTRATEGIA REPRESENTATIVA DE ANÁLISIS PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL FENOTIPO NAIVE, EFECTOR Y DE MEMORIA.	40
ESQUEMA 4. ESTRATEGIA REPRESENTATIVA DE ANÁLISIS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LINFOCITOS Th17 PRODUCTORES DE IL-17.	40
ESQUEMA 5. ESTRATEGIA REPRESENTATIVA DE ANÁLISIS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LINFOCITOS TREG LAP TGF-β ⁺	40
FIGURA 1. CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE LAS CITOCINAS ESTUDIADAS EN SUJETOS SANOS NO FUMADORES, FUMADORES Y PACIENTES.	45
FIGURA 2. PORCENTAJE DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T CD3 ⁺ CD4 ⁺ EN SUJETOS SANOS NO FUMADORES, FUMADORES Y PACIENTES.	46
FIGURA 3. PORCENTAJE DE LINFOCITOS Th17 PRODUCTORES DE IL-17 Y LINFOCITOS TREG LAP TGF-β ⁺ EN SUJETOS SANOS NO FUMADORES, FUMADORES Y PACIENTES.	46
FIGURA 4. PORCENTAJE DE LINFOCITOS T CD8 ⁺ Y PROPORCIÓN DE CTLs QUE EXPRESARON GRANZIMA Y PERFORINA EN SUJETOS SANOS NO FUMADORES, FUMADORES Y PACIENTES.	47
FIGURA 5. PORCENTAJE DE LINFOCITOS T CD4 ⁺ Y CD8 ⁺ CON FENOTIPO DE MEMORIA, NAIVE Y EFECTOR EN SUJETOS SANOS NO FUMADORES, FUMADORES Y PACIENTES.	48
FIGURA 6. CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE LAS CITOCINAS ESTUDIADAS EN PACIENTES DURANTE EL TRATAMIENTO.	50
FIGURA 7. PORCENTAJE DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T CD3 ⁺ CD4 ⁺ EN PACIENTES DURANTE EL TRATAMIENTO.	51
FIGURA 8. PORCENTAJE DE LINFOCITOS T CD8 ⁺ Y PROPORCIÓN DE CTLs QUE EXPRESARON GRANZIMA B Y PERFORINA EN PACIENTES DURANTE EL TRATAMIENTO.	51
FIGURA 9. PORCENTAJE DE LINFOCITOS T CD4 ⁺ Y CD8 ⁺ CON FENOTIPO DE MEMORIA, NAIVE Y EFECTOR EN PACIENTES DURANTE EL TRATAMIENTO.	52
FIGURA 10. CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE LAS CITOCINAS ESTUDIADAS EN PACIENTES DE ACUERDO A LA SOBREVIDA MEDIA.	56
FIGURA 11. PORCENTAJE DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T CD3 ⁺ CD4 ⁺ EN PACIENTES DE ACUERDO A LA SOBREVIDA MEDIA.	57
FIGURA 12. PORCENTAJE DE LINFOCITOS T CD3 ⁺ CD8 ⁺ (CTLs) Y EXPRESIÓN DE GRANZIMA B Y PERFORINA EN PACIENTES DE ACUERDO A LA SOBREVIDA MEDIA.	57
FIGURA 13. PORCENTAJE DE LINFOCITOS T CD4 ⁺ Y CD8 ⁺ CON FENOTIPO DE MEMORIA, NAIVE Y EFECTOR EN PACIENTES DE ACUERDO A LA SOBREVIDA MEDIA.	58
FIGURA 14. CURVAS DE KAPLAN-MEIER PARA LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE LAS CITOCINAS ESTUDIADAS EN EL GRUPO DE PACIENTES.	61
FIGURA 15. CURVAS DE KAPLAN-MEIER PARA EL PORCENTAJE DE LINFOCITOS Th1, Th2, Th17 Y TREG.	62
FIGURA 16. CURVAS DE KAPLAN-MEIER PARA EL PORCENTAJE DE LINFOCITOS T CD8 ⁺ Y EXPRESIÓN DE GRANZIMA B Y PERFORINA.	62
FIGURA 17. CURVAS DE KAPLAN-MEIER PARA EL PORCENTAJE DE LINFOCITOS T CD4 ⁺ Y CD8 ⁺ CON FENOTIPO NAIVE, EFECTOR, DE MEMORIA CENTRAL Y DE MEMORIA EFECTORA.	63
TABLA 1. VALORES DE CORTE PARA CADA UNO DE LOS PARÁMETROS ESTUDIADOS.	59

ABREVIATURAS

SCLC: Carcinomas pulmonares de células pequeñas.

NSCLC: Carcinomas pulmonares de células no pequeñas.

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

ROS: Especies reactivas del oxígeno.

RNS: Especies reactivas del nitrógeno.

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad.

NKG2D: Receptor de célula NK grupo 2 miembro D

NK: Célula asesina natural.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α .

DC: Célula dendrítica.

IFN- γ : Interferón γ

TRAIL: Ligando inductor de apoptosis relacionado con la familia del factor de necrosis tumoral.

IL: Interleucina.

CTL: Linfocito T citotóxico.

TGF- β : Factor de crecimiento transformante β .

IDO: Indolamina 2, 3 dioxigenasa.

PDL-1/2: Ligando de muerte programada 1/2

CD: Cluster de diferenciación.

VEGF: Factor de crecimiento epitelial vascular.

GM-CSF: Factor de crecimiento celular de granulocitos y monocitos.

MDSC: Células mieloides supresoras.

Treg: Linfocitos T reguladores.

PGE2: Prostaglandina E2.

Th: Linfocito T cooperador.

NOS: Óxido nítrico sintasa.

HIF-1 α : Factor inducible por hipoxia 1 α .

ICAM-1: Molécula 1 de adhesión endotelial.

VCAM-1: Molécula 1 de adhesión vascular.

MMP: Metaloproteasa

LAP: Péptido de latencia asociado.

NO: Óxido nítrico.

ECM: Matriz extracelular.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos.

KIR: Receptores inhibitorios de célula NK tipo inmunoglobulina.

NCR: Receptores de activación de citotoxicidad natural.

PMN: Polimorfo nucleares.

MCP: Proteína quimiotáctica para macrófagos.

MIP: Proteína inflamatoria de macrófagos.

MIF: Factor inhibitorio de migración.

TAM: Macrófagos asociados al tumor.

EGF: Factor de crecimiento epidérmico.

APC: Célula presentadora de antígenos.

COX: ciclooxigenasa.

ARG: Arginasa.

STAT: Molécula transductora de señalización y activadora de la transcripción.

TSLP: Linfopoyetina estromal tímica

VEGFR: Receptor del factor de crecimiento epitelial vascular.

CTLA-4: Antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico.

LAG3: Gen-3 de activación de linfocitos.

ICD: Muerte celular inmunogénica.

DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño.

HMGB1: High mobility group box 1.

ATP: Adenosina trifosfato.

IT: Índice tabáquico.

FEV: Volumen espiratorio forzado.

FVC: Capacidad vital forzada.

EDTA: Ácido etilendiamotetraacético.

PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica.

CBA: Cytometric bead array/Arreglo de perlas para citometría.

PE: Ficoeritrina.

APC-Cy5: Aloficocianina-cianina 5.

PE-Cy5: Ficoeritrina-cianina 5.

PerCP/Cy5.5: Proteína clorofila peridina/cianina 5.5.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

RPMI: Roswell Park Memorial Institute.

PMA: Acetato de forbol miristato.

PBS: Solución salina amortiguada por fosfatos.

BSA: Albumina sérica bovina.

TA: Temperatura ambiente.

FSC: Forward scatter/Dispersión frontal.

SSC: Side scatter/Dispersión lateral.

ROC: Receiver operating characteristic/Característica de funcionamiento del receptor.

MFI: Intensidad media de fluorescencia.

RESUMEN

Introducción: El cáncer pulmonar es un importante problema de salud pública a nivel mundial. El tratamiento por quimioterapia impacta directamente en la viabilidad de células tumorales mientras que se ha considerado que el sistema inmunológico tiene una pequeña participación. Diversos fármacos quimioterapéuticos inducen la muerte de las células tumorales favoreciendo la liberación de señales de daño (DAMPs) o bien disminuyen algunas poblaciones inmunosupresoras, este fenómeno podría llevar a la activación de la respuesta inmunológica en contra de células tumorales residuales. Por lo anterior, consideramos importante evaluar si el tratamiento convencional empleado en los pacientes con adenocarcinoma pulmonar favorece la activación de la respuesta inmunológica y si esta respuesta se asocia a la sobrevida de los pacientes.

Objetivo: Comparar los linfocitos T CD8⁺, las distintas subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺, así como las citocinas asociadas a estas poblaciones celulares, entre sujetos sanos y pacientes con adenocarcinoma pulmonar. Además, evaluar si el tratamiento con quimioterapia convencional a base de cisplatino induce cambios en los parámetros mencionados anteriormente.

Metodología: El estudio empleó muestras de pacientes con diagnóstico confirmado de adenocarcinoma pulmonar que recibieron 6 ciclos de tratamiento por quimioterapia convencional, así como muestras de sujetos sanos fumadores y sujetos sanos no fumadores. A partir de la sangre periférica de los grupos mencionados anteriormente se colectaron el plasma y las células mononucleares (PBMCs). En el plasma se cuantificaron IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL17 y TGF- β . En las PBMCs se determinaron los porcentajes de linfocitos Th1 (T-bet⁺), Th2 (CRTH2⁺), Th17 (ROR γ ⁺) y Treg (CD25⁺CD127⁻), así como el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ y la expresión de granzima B y perforina. Además, en los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ se determinó el fenotipo naive (CD45RO⁺CD27⁻), efector (CD45RO⁻CD27⁻), de memoria central (CD45RO⁺CD27⁺) y de memoria efectora (CD45RO⁺CD27⁻). Los parámetros estudiados se asociaron con la sobrevida de los pacientes.

Resultados: El grupo de pacientes presentó una mayor concentración de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, y TGF- β , mayores porcentajes de linfocitos Th17 y Treg, así como una mayor proporción de linfocitos T CD4⁺ con fenotipo efector comparado con los sujetos sanos fumadores y no fumadores. En los pacientes, la concentración de las citocinas, así como los porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos T fueron similares antes del tercer y sexto ciclo de tratamiento comparados con su nivel basal (antes del primer ciclo de tratamiento). Con respecto a la sobrevida media (12 meses), los pacientes con sobrevida mayor a 12 meses presentaron un mayor porcentaje de linfocitos T CD8⁺, así como una mayor proporción de CTLs granzima B⁺perforina⁺. Los linfocitos T CD8⁺ mostraron principalmente fenotipo efector. Empleando el método de Kaplan-Meier, los parámetros que se asociaron a la sobrevida total de los pacientes fueron la proporción de CTLs que expresaban granzima B y perforina, así como el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ con fenotipo naive.

Conclusiones: En el grupo de pacientes, el perfil de citocinas tipo Th2 encontrado pudiera favorecer el incremento de los linfocitos Th17 y Treg detectado, sin embargo, este fenómeno no afectó el porcentaje de CTLs, el cual fue similar al de los sujetos sanos no fumadores. El tratamiento por quimioterapia convencional a base de cisplatino y paclitaxel no modificó los parámetros evaluados a lo largo del tratamiento. Sin embargo, considerando la sobrevida media de los pacientes, aquellos con sobrevida mayor a la media tendieron a modificar el perfil de citocinas hacía un perfil pro-inflamatorio que pudiera favorecer la presencia de linfocitos T CD8⁺ con fenotipo efector, así como la producción de granzima B y perforina por parte de estos linfocitos. Con lo anterior podemos sugerir que los pacientes que presentan las características mencionadas anteriormente previo al tratamiento podrían presentar una mayor sobrevida media. Además, con base a los valores de corte que nos indican asociación con la sobrevida total, podemos proponer parámetros que podrían ser considerados como factores pronósticos.

ABSTRACT

Introduction. Lung cancer is the leading cause of cancer death worldwide. Chemotherapy treatment directly impacts on the viability of tumor cells and the immune system has been considered to have a small participation. Several chemotherapeutic drugs induce the death of tumor cells supporting the release of damage associated molecular patterns (DAMPs) or reduce some immunosuppressive populations, this phenomenon could lead to the activation of the immune response against residual tumor cells. Therefore, we consider it important to evaluate whether the conventional treatment used in lung adenocarcinoma patients favors the activation of the immune response and whether this response is associated with patient's survival.

Objective. To compare the CD8⁺ T lymphocytes, the different subpopulations of CD4⁺ T lymphocytes, as well as the cytokines associated with these cell populations, between healthy subjects and lung adenocarcinoma patients. In addition, assess whether treatment with conventional cisplatin-based chemotherapy induces changes in the parameters mentioned above.

Methodology. The study used samples from patients with a confirmed diagnosis of lung adenocarcinoma who received 6 cycles of treatment by conventional chemotherapy, as well samples from healthy smokers, and healthy non-smokers. From peripheral blood of the groups mentioned above, plasma and mononuclear cells (PBMCs) were collected. In the plasma IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL17 and TGF- β were quantified. The percentages of Th1 (T-bet⁺), Th2 (CRTH2⁺), Th17 (ROR⁺) and Treg (CD25⁺CD127⁻) lymphocytes were determined in the PBMCs, as well as the percentage of CD8⁺ T lymphocytes and granzyme B and perforin expression. In addition, we determined the naïve (CD45RO⁺CD27⁻), effector (CD45RO⁻CD27⁻), central memory (CD45RO⁺CD27⁺) and effector memory (CD45RO⁺CD27⁻) phenotype of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. The parameters studied were associated with patient's survival.

Results. The group of patients had a higher concentration of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, and TGF- β , higher percentages of Th17 and Treg lymphocytes, as well as a higher proportion of CD4⁺ T lymphocytes with effector phenotype with respect to healthy smokers and healthy non-smokers. In patients, cytokine concentrations as well as percentages of T cell subpopulations were similar before the third and sixth cycles of treatment compared to baseline (before the first treatment cycle). With respect to average survival (12 months), patients with survival greater than 12 months had a higher percentage of CD8⁺ T lymphocytes, as well as a greater proportion of granzyme B⁺perforin⁺ CTLs. These CD8⁺ T lymphocytes mainly showed effector phenotype. Using the Kaplan-Meier method, the parameters that were associated with the total patient survival were the proportion of CTLs expressing granzyme B and perforin, as well as CD8⁺ T lymphocytes with naïve phenotype.

Conclusions. In the group of patients, the profile of Th2 type cytokine could favor the increase of Th17 and Treg lymphocytes detected, however, this phenomenon did not affect the percentage of CTLs, which was similar to percentage of healthy non-smokers. Treatment with conventional cisplatin-based chemotherapy did not modify the parameters evaluated throughout the treatment. However, considering the average survival of patients, those with a survival greater than the average tended to modify the cytokine profile to a pro-inflammatory profile that could favor the presence of CD8⁺ T lymphocytes with effector phenotype, as well as the production of granzyme B and perforin by CD8⁺ T lymphocytes. With the above, we can suggest that patients with these characteristics before treatment could present a higher average survival. In addition, based on the cut-off values that indicate association with total survival, we can propose parameters that could be considered as prognostic factors.

INTRODUCCIÓN

Cáncer Pulmonar

El cáncer pulmonar es un importante problema de salud pública a nivel mundial, siendo la principal causa de muerte por cáncer. El cáncer ha sido definido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad multifactorial que puede afectar cualquier parte del organismo, se caracteriza por una replicación descontrolada de células malignas que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir tejidos adyacentes o propagarse a otros órganos.

En el año 2012 se registraron a nivel mundial 8.2 millones de defunciones debido a los distintos tipos de cáncer. Considerando ambos géneros, el cáncer con mayor mortalidad fue el cáncer de pulmón representando el 19.4% del total de defunciones¹, [GLOBOCAN 2012]. En México, varios autores han reportado un incremento en la incidencia y mortalidad por cáncer pulmonar; en el período de 1979 a 1993, el incremento en la tasa de mortalidad pasó de 5.01 a 7.25 por cada 100,000 habitantes^{2, 3}. En el período de 1998 al 2004 del total de muertes debidas a neoplasias malignas, el 11.5% correspondieron a cáncer pulmonar⁴ y hasta el año 2010 esta patología se mantuvo como la primera causa de muerte por cáncer considerando ambos géneros⁵.

El cáncer pulmonar se divide en dos grandes grupos, los carcinomas pulmonares de células pequeñas (SCLC por sus siglas en inglés) y carcinomas pulmonares de células no pequeñas (NSCLC por sus siglas en inglés), este último grupo a su vez se subdivide en 3 tipos histológicos, carcinomas de células grandes, carcinoma de células escamosas o epidermoide y adenocarcinoma, siendo este último el más frecuente en la población (62% aproximadamente)^{3, 5, 6}.

El tabaquismo es el principal factor de riesgo asociado al cáncer pulmonar, ya que el humo de cigarro es responsable del 85-90% de los casos^{7, 8, 9}. Las tres clases

principales de carcinogénicos contenidos en el humo del cigarro son: hidrocarburos policíclicos, nitrosaminas y aminas aromáticas^{9, 10, 11, 12}. El asbesto es el factor ocupacional más común relacionado con la incidencia de cáncer pulmonar. Otro factor ocupacional y ambiental incluye la exposición a radón, arsénico, cromo, níquel y radiación ionizante^{7, 9, 13, 14}. Por otro lado, enfermedades pulmonares no malignas preexistentes como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis pulmonar idiopática y tuberculosis también se asocian con el incremento en el riesgo de desarrollar cáncer pulmonar^{7, 8, 9}.

La mayoría de los agentes genotóxicos son metabolizados por enzimas detoxificadoras (principalmente de la familia del citocromo p450) para evitar que los metabolitos provenientes de estos agentes afecten al material genético¹⁵. Algunos individuos portan variantes génicas de estas enzimas detoxificadoras, que poseen una menor actividad, lo que incrementa la vida media de los metabolitos altamente reactivos favoreciendo su unión a proteínas y ácidos nucleicos¹⁵. Lo anterior conlleva a la formación de aductos que inducen mutaciones, especialmente del tipo de transversiones G-T^{11, 12, 15}. La permanencia de las mutaciones inducidas por los agentes genotóxicos marca la iniciación del proceso denominado carcinogénesis, el cual involucra tres etapas: iniciación, promoción y progresión.

La iniciación se lleva a cabo cuando la célula es afectada por algún agente genotóxico (químico, físico o biológico), ocasionando mutaciones en proto-oncogenes o en genes supresores de tumor^{11, 12, 15, 16, 17, 18, 19}. Los primeros son genes dominantes que codifican proteínas que participan en la proliferación y diferenciación celular o en la inhibición de la apoptosis; los segundos son genes recesivos que codifican proteínas involucradas en regulación o inhibición de la proliferación celular^{12, 18, 19}. Mutaciones en cualquiera de estos genes favorecen la proliferación celular descontrolada, característica del cáncer.

La promoción se lleva a cabo cuando la célula iniciada continúa expuesta a carcinógenos que inducen mutaciones y, además, en el medio se encuentran promotores que inducen proliferación celular, por lo que estas células transformadas acumulan mutaciones generación tras generación^{16, 17, 19}. Como resultado de esta etapa, la célula transformada puede ganar autonomía e independizar su proliferación de las señales reguladoras del microambiente^{18, 19}. Lo anterior explica la heterogeneidad celular observada en los tumores. La acumulación de las células transformadas origina un tumor primario o carcinoma *in situ*.

La progresión implica la dispersión de las células del tumor hacia los tejidos adyacentes, fenómeno conocido como invasión^{16, 17}. En esta etapa, las células transformadas manifiestan alteraciones en el patrón de expresión de las moléculas del complejo de adhesión celular E-cadherina-cateninas, el cual también es responsable en parte de mantener la arquitectura tisular y el fenotipo celular diferenciado^{8, 18}. Las alteraciones en la expresión o función de las proteínas de este complejo, o de sus reguladores, provoca la pérdida de adhesión intercelular, alteraciones morfológicas e incremento en la motilidad celular. Aunado a esto, las células neoplásicas sintetizan enzimas proteolíticas con las que degradan la membrana basal y entran a circulación sanguínea y/o linfática, para distribuirse a otros órganos del cuerpo^{8, 17, 18, 19}. Durante este proceso cerca del 99% de las células malignas mueren; las que sobreviven pasan a través de la capa de células endoteliales que revisten el interior de la pared capilar y penetran en la matriz extracelular adyacente de algún órgano “blanco” por distante que esté, y generar en él un tumor secundario^{17, 18, 19}. Este proceso se denomina metástasis y es una característica de los tumores malignos.

Inflamación crónica y cáncer

Un proceso inflamatorio agudo es precedente de una respuesta protectora en contra de infecciones por patógenos o en la resolución de eventos traumáticos²⁰.

Por otra parte, hace aproximadamente 150 años, Virchow postuló que la inflamación es un factor asociado con el desarrollo del cáncer. Esta hipótesis se basó en que observó que los tumores se generaban en sitios de inflamación crónica y que en los tumores resecaos existía una alta infiltración de células del sistema inmunológico²¹.

Un proceso inflamatorio crónico se ha relacionado con las distintas etapas del proceso de carcinogénesis. En la etapa de iniciación, durante el proceso de inflamación se generan radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), afectando genes responsables de la proliferación celular^{8, 22, 23}. Durante la promoción, las células inflamatorias producen diversos factores de crecimiento que promueven la proliferación de las células transformadas y, aunado al estrés genotóxico, incrementan el número de mutaciones en estas células^{21, 22}. Finalmente, en la etapa de progresión, algunas células inflamatorias producen metaloproteasas y factores pro-angiogénicos que favorecen la invasión y metástasis^{8, 20, 22, 23}.

Sistema inmunológico y cáncer

Desde hace décadas existe gran controversia sobre la participación que puede tener la respuesta inmunológica en el desarrollo de los tumores. En la última década, varios grupos de investigación han aportado evidencia sobre la participación del sistema inmunológico en el reconocimiento de las células pre-neoplásicas, así como en la progresión tumoral participando en la modulación de la inmunogenicidad de los tumores^{24, 25, 26, 27, 28, 29, 30}.

Inmunoedición

La teoría de la inmunovigilancia, propuesta en los años 70's por Burnet y Thomas, menciona que el sistema inmunológico actúa como centinela reconociendo y eliminando células transformadas, evitando de esta manera el desarrollo de

tumores²⁸. Sin embargo, pronto se redefinió y extendió el concepto a la llamada teoría de la “inmunoedición” para describir las interacciones entre el sistema inmunológico y las distintas etapas que involucra el desarrollo del cáncer. Este proceso dinámico comprende tres etapas: eliminación, equilibrio y escape^{27, 29, 30, 31}.

En la etapa de eliminación, las células que han sido transformadas por algún agente carcinogénico, expresan moléculas inducidas por estrés y antígenos tumorales en el contexto de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I y/o ligandos del receptor de célula NK grupo 2 miembro D (NKG2D)^{27, 28, 31}. Estos últimos son reconocidos por células asesinas naturales (Natural Killer [NK]) que inducen la apoptosis de las células tumorales^{29, 31, 32}. Por otra parte, células del sistema inmunológico innato como macrófagos y granulocitos, secretan factor de necrosis tumoral α (TNF- α), y especies reactivas del oxígeno (ROS) que favorecen la eliminación de las células tumorales^{23, 26}. Las células dendríticas (DCs) fagocitan las células tumorales en apoptosis y posteriormente presentan los antígenos tumorales a los linfocitos T (incluidos los linfocitos NKT)²⁵. Estos linfocitos efectores liberan interferón γ (IFN- γ) que inhibe la proliferación de las células tumorales y en etapas avanzadas evitan la angiogénesis^{27, 29}. Además, los linfocitos T CD8⁺ (CTLs) inducen la apoptosis de más células neoplásicas mediante la interacción de ligandos de muerte (Fas ligando [FasL] y ligandos inductores de apoptosis relacionados con la familia del factor de necrosis tumoral [TRAIL]) o liberación de perforinas y granzimas²⁵. En resumen, en la fase de eliminación se ve favorecida una respuesta inmunológica anti-tumoral debido a la expresión de antígenos tumorales y el receptor de muerte (Fas) en las células tumorales, así como producción de perforinas, granzimas, IFN- γ , interleucina-1 (IL-1), IL-2 y TNF- α por parte de las células del sistema inmunológico presentes en el microambiente tumoral.

En ocasiones, la eliminación de las células tumorales no es completa y algunas clonas presentan cambios genéticos y epigenéticos y debido a la constante presión

por parte del sistema inmunológico surgen clones con baja inmunogenicidad (pérdida de antígenos tumorales o defectos en la presentación de antígenos) y/o capaces de inducir inmunosupresión mediante la secreción de factores solubles^{28, 31}. En esta etapa conocida como equilibrio, se presenta un balance entre citocinas que favorecen una respuesta inmunológica anti-tumoral (IL-2, IFN- γ) y citocinas que favorecen la progresión tumoral (por ejemplo: IL-10, factor de crecimiento transformante β [TGF- β]).

En la fase de escape, las células tumorales evaden el reconocimiento por parte de las células del sistema inmunológico (pérdida de antígenos tumorales, moléculas de clase I del MHC o moléculas de co-estimulación), expresan moléculas que evitan la apoptosis (Bcl2), moléculas que favorecen la inmunosupresión (indolamina 2, 3 dioxigenasa [IDO], ligando de muerte programada 1 [PDL-1], CD39, CD73) y secretan citocinas que favorecen la angiogénesis (factor de crecimiento vascular endotelial [VEGF], factor de crecimiento transformante β [TGF- β], IL-6, factor de crecimiento celular de granulocitos y monocitos [GM-CSF])^{28, 29, 31, 33, 34, 35}. Además, las células mieloides supresoras (MDSC), macrófagos, DCs expresan moléculas inmunoreguladoras (arginasa, IDO) y secretan citocinas (IL-10, TGF- β) que inhiben a los linfocitos T efectores y favorecen la diferenciación y reclutamiento de linfocitos T reguladores (Treg)^{25, 33, 34}. Durante la etapa de escape, el equilibrio se inclina hacia la progresión tumoral debido a la presencia de factores solubles como IL-10, TGF- β , VEGF y moléculas inmunosupresoras como IDO y PDL-1 y el sistema inmunológico no es capaz de controlar a las células tumorales, las cuales forman un tumor clínicamente detectable.

Mediadores solubles presentes en el microambiente tumoral

Como se mencionó anteriormente, el paso de la etapa de eliminación a la etapa de escape involucra una compleja interacción de eventos en los que participan factores solubles secretados tanto por células tumorales, células del sistema inmunológico, así como por células epiteliales cercanas al tumor. De este modo, las

citocinas presentes en el microambiente pueden favorecer un proceso anti-tumoral o un proceso pro-tumoral. A continuación, se mencionan algunos mediadores solubles presentes dentro del microambiente tumoral en cáncer de pulmón.

Interferón γ (IFN- γ)

El IFN- γ es secretado por células NK y NKT y linfocitos T (CD4⁺ y CD8⁺) activados³⁶. Durante la etapa de eliminación, el IFN- γ es la principal citocina activadora de macrófagos y favorece la presentación de antígenos induciendo la expresión de moléculas del MCH clase I y clase II^{36, 37}. El IFN- γ inhibe la producción de factores inmunosupresores como el TGF- β y prostaglandina E2 (PGE2)³⁷. Por otra parte, en la fase de escape la producción de IFN- γ es inhibida por la IL-4, IL-10 y TGF- β producidos por linfocitos Th2, Treg, macrófagos M2 o células tumorales, esta disminución afecta de manera negativa la expresión de las moléculas del MHC, lo que se asocia con la reducida inmunogenicidad del tumor^{37, 38}.

Factor de necrosis tumoral α (TNF- α)

El TNF- α es producido por macrófagos y DCs como respuesta a un estímulo pro-inflamatorio³⁷. El TNF- α participa durante la etapa de eliminación favoreciendo la activación de monocitos y neutrófilos, favorece el reclutamiento de células del sistema inmunológico a sitios de inflamación induciendo la expresión de moléculas de adhesión para neutrófilos, monocitos y linfocitos por parte de las células endoteliales^{23, 37, 39}. En la etapa de escape se ha reportado una disminución en la concentración de esta citocina, lo que se asocia a una supresión del sistema inmunológico⁴⁰. Por otra parte, las células tumorales pueden secretar pequeñas cantidades de TNF- α que genera permeabilidad de los vasos sanguíneos lo que promueve la formación de derrame pleural en pacientes con cáncer pulmonar^{37, 41}.

Especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS)

En una respuesta inflamatoria se generan ROS y RNS a través de la inducción de NADPH oxidasa y óxido nítrico sintasa (NOS) por parte de macrófagos y polimorfonucleares (neutrófilos)^{42, 43}. Ambas especies reactivas favorecen la eliminación de células tumorales induciendo estrés oxidativo y daño en lípidos, proteínas y DNA⁴⁴. Sin embargo, estas especies reactivas también pueden incrementar el daño al DNA sin causar la muerte celular, en este caso, las células tumorales incrementan sus mutaciones generando una mayor heterogeneidad tumoral. Además, en la etapa de escape el incremento de estas especies reactivas puede favorecer la proliferación del tumor a través de la activación del factor inducible por hipoxia 1 α (HIF-1 α), así como favorecer la remodelación tisular y angiogénesis^{22, 23}.

Interleucina 1 (IL-1)

La familia de la IL-1 consiste en dos moléculas agonistas (IL-1 α e IL-1 β) y un receptor antagonista (IL-1Ra) que al unirse a la IL-1 preformada no genera ninguna señal de activación³⁶. La expresión de IL-1 β es regulada a través de un proceso de activación mediada por el inflamasoma⁴⁵. En la etapa de eliminación, la IL-1 β tiene un papel similar al descrito para TNF- α ³⁷. Por otra parte, en la etapa de escape el incremento en la concentración de IL-1 β se ha asociado con angiogénesis y metástasis ya que favorece la sobre-expresión de la molécula 1 de adhesión endotelial (ICAM-1), la molécula 1 de adhesión vascular (VCAM-1), VEGF y TGF- β en las células tumorales^{39, 46}.

Interleucina 2 (IL-2)

La IL-2 es secretada principalmente por linfocitos T CD4+ activados y CD8+ naive, así como por DCs^{36, 37}. En la etapa de eliminación, la IL-2 actúa como un potente estimulador de la respuesta inmunológica, es un factor de crecimiento para los

linfocitos T, responsable de la expansión clonal en respuesta al reconocimiento de antígenos tumorales. También estimula la proliferación y diferenciación de las células NK^{36, 37, 47, 48}. En la etapa de escape, la IL-2 puede ser captada por las células Treg que expresan la sub-unidad α del receptor de IL-2, esta sub-unidad presenta una alta afinidad por la IL-2, lo que provoca una disminución en la concentración de IL-2 y por consecuencia no se genere una adecuada respuesta inmunológica mediada por linfocitos T^{37, 49, 50}. Además, en nuestro grupo de trabajo hemos detectado células tumorales que expresan la molécula CD25 y éstas podrían captar la IL-2 restante para su crecimiento, favoreciendo con ello la progresión tumoral y por ende un mal pronóstico para los pacientes con NSCLC.

Interleucina 4 (IL-4)

La IL-4 es considerada una citocina anti-inflamatoria, producida por linfocitos T activados (Th2), mastocitos, basófilos, eosinófilos y células NKT^{36, 51, 52}. No se ha descrito su participación en la etapa de eliminación, pero en la etapa de escape la IL-4, al unirse a la sub-unidad α de su receptor (IL-4R α) induce la expresión del factor de transcripción GATA3 lo que favorece la generación de linfocitos Th2, a la vez que suprime la polarización hacia un perfil tipo Th1 (silenciando la expresión de IL-12 e IFN γ ^{36, 51}). Además, la IL-4 también participa en la inducción de linfocitos T reguladores (Treg) en periferia favoreciendo la progresión tumoral⁵³.

Interleucina 6 (IL-6)

La IL-6 es una citocina producida por macrófagos, linfocitos Th2, células endoteliales y fibroblastos^{36, 37}. La IL-6 favorece el reclutamiento de neutrófilos, promueve la migración, proliferación y activación de linfocitos T y junto con el TNF- α estimula a los linfocitos T CD8⁺ favoreciendo una potente actividad citolítica lo que lleva a la eliminación de las células tumorales^{36, 37, 39}. Sin embargo, la IL-6 puede tener un papel negativo en la etapa de escape, inhibe la diferenciación de DCs, favorece la inducción de macrófagos tipo M2, es un regulador positivo de las células

mieloides supresoras (MDSC) reclutadas en el sitio del tumor, induce la producción de metaloproteasas (MMP) y favorece la angiogénesis y metástasis^{37, 54}.

Interleucina 8 (IL-8)

La IL-8 es un miembro de la familia de quimiocinas CXC, actúa como ligando de receptores acoplados a proteínas G y es producida por fibroblastos y macrófagos como respuesta a un estímulo mediado por TNF- α e IL-1^{36, 37}. Al igual que IL-6, la IL-8 participa tanto en la eliminación como en el escape de las células tumorales, en la eliminación favorece el reclutamiento de neutrófilos, los cuales junto con la IL-8 activan a las células NK³⁶. Por otra parte, en la etapa de escape las células tumorales producen IL-8 y la acumulación de ésta favorece procesos angiogénicos^{37, 55}.

Interleucina 10 (IL-10)

La IL-10 es una potente citocina anti-inflamatoria, es secretada por linfocitos Th2 y Treg, linfocitos B, monocitos, macrófagos, granulocitos, keratinocitos y DCs^{36, 37}. La IL-10 participa en la etapa de escape y afecta principalmente a macrófagos y DCs inhibiendo su diferenciación y sus características de células presentadoras de antígenos (APC), disminuyendo la expresión de moléculas del MHC clase II y de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86^{35, 36, 37}. Además, evita la producción de citocinas de tipo Th1 (IL-2, IFN- γ)^{37, 56}. En los pacientes con cáncer se ha reportado que el incremento en la concentración de IL-10 se asocia con un pronóstico negativo, ya que favorece la sobre-expresión de la molécula BCL-2 en las células tumorales, evitando de esta manera la apoptosis^{57, 58}.

Interleucina 17 (IL-17)

La familia de IL-17 incluye la IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (también llamada IL-25) e IL-17F. La IL-17 es producida principalmente por linfocitos Th17, y en pequeñas cantidades por linfocitos $\gamma\delta$, células NKT, células NK, neutrófilos y

eosinófilos^{36, 59, 60}. La participación de esta citocina en el proceso de inmunomodulación no se ha descrito del todo, pero puede participar durante la fase de equilibrio y escape. En la fase de equilibrio, la IL-17 induce la producción de factor de crecimiento de granulocitos-monocitos (GM-CSF), factor de crecimiento de granulocitos (G-CSF); quimiocinas como CXCL-1, CXCL-8, lo que favorece el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos^{60, 61}. También induce la producción de IL-6, IL-8, TNF- α , IL-1 β , este microambiente pro-inflamatorio favorece la activación de los linfocitos T CD8⁺⁶¹. Por otra parte, en la etapa de escape además de las citocinas mencionadas anteriormente, la IL-17 induce la producción de MMP y VEGF favoreciendo la invasión y metástasis de las células tumorales^{60, 61}.

Factor de crecimiento transformante β (TGF- β)

El TGF- β es una citocina que presenta tres isoformas distintas TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3, siendo la primera la más abundante. El TGF- β se secreta en una forma latente, la cual se activa al disociarse del péptido de latencia asociado a TGF- β (LAP-TGF- β)^{62, 63}. El TGF- β 1 es un potente estimulador de la quimiotaxis, ya que estimula la migración de monocitos, neutrófilos, fibroblastos y linfocitos^{64, 65}. El TGF- β ha sido considerado como el principal factor inmunosupresor secretado por las células tumorales, favorece la expresión de IL-10 y suprime la producción de IL-2, así como la proliferación de linfocitos T inducida por IL-2, en los linfocitos T CD8⁺ y células NK inhibe la producción de IFN- γ , granzimas y perforina^{35, 37}. Además, es un factor importante en la diferenciación de linfocitos Th17 y linfocitos T reguladores (Treg)⁶⁶.

Factor de crecimiento epitelial vascular (VEGF)

El VEGF es un factor de crecimiento importante para la angiogénesis, promueve la proliferación de células endoteliales y la permeabilidad vascular. El VEGF presenta cinco isoformas distintas (VEGF-A, B, C, D y E), siendo el VEGF-A (VEGF) la más común⁶⁷. En la etapa de escape, la sobre-expresión de VEGF promueve la

replicación de DNA, proliferación, mantenimiento de las células tumorales⁶⁷. También, promueve la pérdida de uniones intercelulares y producción de óxido nítrico (NO) que incrementa la permeabilidad vascular, induce la expresión de metaloproteasas (MMP) que degradan la matriz extracelular (ECM), seguido del reclutamiento de células endoteliales^{35, 67, 68}. Además, el VEGF favorece la evasión tumoral inhibiendo la maduración de DCs, también induce la expresión de CXCL12 favoreciendo la infiltración de monocitos y macrófagos dentro del tumor^{34, 67}. El incremento en la producción de VEGF es sinergizado por el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), HIF-1 α , TGF- β , IL-1 e IL-6^{23, 67}.

Poblaciones celulares presentes en el microambiente tumoral

Además de los factores solubles presentes mencionados anteriormente, es importante reconocer que dentro de ese microambiente existe una compleja heterogeneidad celular que puede modular el microambiente y la arquitectura tumoral. A continuación, se mencionan algunas poblaciones celulares presentes dentro del microambiente tumoral en cáncer de pulmón.

Células asesinas naturales (Natural Killer [NK])

Las células NK son parte del sistema inmunológico innato y se localizan en sangre periférica, bazo y médula ósea. No expresan el receptor de linfocitos T (TCR) y no poseen la capacidad de desarrollar memoria inmunológica^{47, 69}. Las células NK participan de manera importante en la eliminación de células tumorales, mediante un repertorio de receptores de inhibición y activación modulan su actividad³². Los receptores inhibitorios de célula NK tipo inmunoglobulina (KIR), los receptores de activación de citotoxicidad natural (NCR) y los receptores de célula NK grupo 2 miembro D (NKG2D), son los receptores involucrados en el reconocimiento de células transformadas con una baja expresión de MHC clase I y/o que expresen las moléculas MIC-A y MIC-B (ligandos del receptor NKG2D)^{25, 32, 47}.

Una vez activadas, las células NK eliminan a las células tumorales mediante la vía dependiente de gránulos, liberando granzimas y perforinas. También expresan de manera constitutiva ligandos inductores de apoptosis relacionados con la familia del TNF (TRAIL) y el ligando de Fas (FasL) induciendo la apoptosis de la célula blanco por la vía mediada por receptores³². Además, las células NK favorecen la interacción entre DCs y linfocitos T a través de la liberación de IFN- γ , el IFN- γ liberado por las células NK estimula la maduración de las DCs y la producción de IL-12, que da como resultado una potente respuesta anti-tumoral mediada por linfocitos T CD8⁺⁶⁹. Sin embargo, en la fase de escape se presenta una disminución en la actividad y reclutamiento de las células NK, debido al microambiente tumoral con características inmunosupresoras^{38, 70}.

Neutrófilos

Los neutrófilos, también conocidos como polimorfonucleares (PMN), son células del sistema inmunológico innato que participan en infecciones microbianas y la reparación tisular⁴³. En cáncer, se ha reportado que los neutrófilos son reclutados al sitio del tumor (neutrófilos asociados al tumor [TAN]) y éstos pueden tener una actividad anti-tumoral (N1) o protumoral (N2)^{43, 51, 71}. Los neutrófilos N1 contienen grandes concentraciones de serin-proteasas (incluidas MMP), péptidos antimicrobianos (defensinas), son capaces de secretar ROS y favorecer la eliminación de células tumorales^{43, 71}.

Por otra parte, los neutrófilos N2 secretan factores pro-angiogénicos como el VEGF, CCL2 e IL-8⁴³. En la etapa de escape, las células tumorales reclutan neutrófilos N2, vía ligando de CXCR2 (CXCL2), estos neutrófilos secretan citocinas que suprimen la respuesta inmunológica anti-tumoral (TGF- β , IL-10, MCP/CCL2, MIP1- β /CCL4, así como factor inhibitorio de migración (MIF)^{43, 51, 71}.

Macrófagos (M1/M2)

Los macrófagos son células del sistema inmunológico innato con un papel importante en la respuesta inmunológica innata y adaptativa en contra de patógenos, mantenimiento de la homeóstasis, presentación de antígenos, así como en la resolución de un proceso inflamatorio²⁵. En cáncer, los macrófagos son reclutados al sitio del tumor (macrófagos asociados al tumor [TAM]) por quimiocinas derivadas por células tumorales, interaccionan con las células tumorales y se localizan preferencialmente en regiones con una baja tensión de oxígeno, esta infiltración es asociada con un pronóstico desfavorable en el cáncer pulmonar^{42, 72, 73}.

Los macrófagos como otras células del sistema inmunológico presentan distintos fenotipos dependiendo del microambiente tumoral: macrófagos M1 (activados de manera clásica) y macrófagos M2 (activados de manera alternativa)⁷³. Los macrófagos M1 favorecen una respuesta inmunológica anti-tumoral durante la etapa de eliminación, son polarizados en respuesta a un estímulo inmunológico mediado por IFN- γ y TNF- α ⁷³. Los macrófagos M1 secretan grandes cantidades de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 e IL-23), así como quimiocinas (CXCL9, CXCL10 y CXCL15) que promueven el reclutamiento de linfocitos Th1, linfocitos T CD8+ y células NK^{42, 73}.

En contraste, los macrófagos polarizados hacia el fenotipo M2 participan durante la fase de escape, favoreciendo un microambiente inmunosupresor favorable para el crecimiento tumoral⁷⁴. Los macrófagos M2 son polarizados a partir de la estimulación de citocinas tipo Th2 (IL-4, IL-13), IL-10 y TGF- β ⁷³. Los macrófagos M2 secretan citocinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- β , quimiocinas como CCL17, CCL22 y CCL24, favoreciendo el reclutamiento de linfocitos Th2, linfocitos Treg. Además, secretan VEGF, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), FGF, MMP-2 y MMP-9 que promueven la angiogénesis y metástasis^{42, 73}.

Células Dendríticas (DC)

Las DCs son conocidas como las células presentadoras de antígenos (APC) más potentes y se localizan en tejidos periféricos, así como en órganos linfoides como el timo, médula ósea, bazo, ganglios linfáticos y placas de Peyer⁷⁵. La principal función de las DCs, en la etapa de eliminación es reconocer, fagocitar y presentar antígenos tumorales a los linfocitos T^{25, 75, 76}. A través de la presentación de antígenos, las DCs forman un puente entre la respuesta inmunológica innata y adaptativa, por lo que presentan un papel crítico en la generación de una respuesta inmunológica anti-tumoral antígeno-específica^{25, 76}.

Por otra parte, en la etapa de escape el microambiente tumoral inhibe la maduración de las DCs, lo que ocasiona que no se lleve a cabo una correcta presentación de antígenos, por falta de moléculas de co-estimulación, lo que da como resultado la anergia de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺^{77, 78}.

Células Mieloides Supresoras (MDSC)

Las MDSC son células con una actividad inmunosupresora, tienen un progenitor común con las DCs³⁵. En la etapa de escape, las MDSC son una parte importante del infiltrado tumoral. La ciclooxigenasa (COX2), PGE2 e IL-6 tienen un papel preferencial en la diferenciación y proliferación de las MDSC³³. Las MDSC afectan el balance entre macrófagos M1 y M2, favoreciendo la polarización hacia macrófagos M2 mediante la secreción de altas concentraciones de IL-10^{51, 79}. También polarizan la respuesta inmunológica a un perfil tipo Th2⁸⁰. Además, las MDSC son capaces de inhibir la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, bloquear la activación de células NK a través de la secreción de arginasa-1 (ARG-1) óxido nítrico sintasa 2 (NOS2), la ARG-1 disminuye los niveles de L-arginina y favorecen la actividad de NOS2 generando ROS y RNS^{33, 79}. Las MDSC también favorecen la expansión de los linfocitos Treg dependiente de TGF-β e IL-10^{79, 80}.

Linfocitos T CD4⁺

Los linfocitos T CD4⁺ o linfocitos Th son una población capaz de diferenciarse hacia distintas subpoblaciones dependiendo del antígeno presentado por las APC y de las citocinas presentes en el microambiente. Cada subpoblación de linfocitos T CD4⁺ expresa un factor de transcripción “maestro”, moléculas transductoras de señalización y activadoras de la transcripción (STAT), así como un patrón de secreción de citocinas.

Linfocitos Th1/Th2

Las primeras subpoblaciones descritas fueron los linfocitos Th1 y Th2, los linfocitos Th1 necesitan de IL-12 e IFN- γ para diferenciarse, expresan el factor de transcripción T-bet y las moléculas STAT1 y STAT4, además secretan IFN- γ y TNF- α ^{25, 81}. Por otra parte, los linfocitos Th2 se diferencian en un microambiente con IL-4 y la linfopoyetina estromal tímica (TSLP), expresan el factor de transcripción GATA-3, la molécula STAT6 y secretan IL-4, IL-5 e IL-14^{25, 81}.

Una vez activados los linfocitos Th1 secretan grandes cantidades de IFN- γ , TNF- α e IL-12, así como niveles bajos de IL-4 e IL-5, estas citocinas colaboran con la función citotóxica de los linfocitos T CD8⁺, favorece el incremento de la presentación de antígenos en el contexto de moléculas del MHC clase I y clase II por parte de las APCs^{25, 31, 82}. Además, los linfocitos Th1 favorecen la expansión y mantenimiento de linfocitos T CD8⁺ antígeno-específicos mediante la producción de IL-2^{25, 83}. En cáncer pulmonar, los linfocitos Th1 tienen un papel importante en la respuesta inmunológica anti-tumoral de manera directa a través de la secreción de IFN- γ y TNF- α , y de manera indirecta a través de la activación y expansión de linfocitos T CD8⁺. En contraste, en la etapa de escape, los linfocitos Th2 secretan grandes cantidades de IL-4, IL-5 IL-6 IL-19 e IL-13 que inducen la anergia de los linfocitos T, inhiben la citotoxicidad mediada por linfocitos T^{82, 84}. Debido a esto, una respuesta

de tipo Th2 favorece el crecimiento tumoral al inhibir la citotoxicidad mediada por linfocitos T.

En años recientes, se han descrito otras subpoblaciones de linfocitos T CD4+, entre las que se encuentran los linfocitos T reguladores (Treg) y los linfocitos Th17.

Linfocitos Th17

Los linfocitos Th17 requieren de la IL-6 y TGF- β para su diferenciación, expresan el factor ROR γ y la molécula STAT3 y producen citocinas de la familia de la IL-17, principalmente la IL-17A e IL-22^{25, 81}.

Se ha reportado que las células tumorales, o los fibroblastos derivados del tumor secretan MCP-1 (ligando de CCR2 o CCR4) y RANTES (ligando de CCR1, CCR3 o CCR5), ambas moléculas tienen un efecto quimioatrayente en los linfocitos Th17, quienes son reclutados de la periferia al sitio del tumor^{61, 85}. Las células tumorales y células del estroma secretan IL-1 β , IL-6, IL-23 y TGF- β , estas citocinas generan un microambiente pro-inflamatorio óptimo para la diferenciación y expansión de los linfocitos Th17⁸⁵. Sin embargo, su participación dentro de los NSCLC es limitada y controversial, debido a que la actividad de los linfocitos Th17 se ha asociado tanto a un efecto anti-tumoral como a un efecto pro-tumoral^{61, 86}.

Se ha reportado que linfocitos Th17 específicos en contra del antígeno tumoral MAGE-A3 tienen un efecto anti-tumoral mediado por IFN- γ *in-vivo*⁸⁷. Además de este efecto directo de los linfocitos Th17 sobre células tumorales, se ha reportado que la IL-17 promueve la maduración de progenitores de DCs incrementando la expresión de moléculas co-estimuladoras, moléculas del MHC clase II, induce la producción de IL-6 e IL-12 por parte de los macrófagos y DCs, lo anterior da como resultado una correcta presentación de antígenos a los linfocitos T efectores favoreciendo la inducción de linfocitos T citotóxicos (CTLs) específicos en contra del tumor^{85, 88}. Por otra parte, se ha reportado que los linfocitos Th17 inducen

quimiocinas tipo Th1 como CXCL9 y CXCL10, estas citocinas favorecen el reclutamiento de células efectoras al sitio del tumor^{85, 86}.

El efecto pro-tumoral mediado por linfocitos Th17 e IL-17 ha sido reportado en modelos murinos y en humanos⁸⁶. El mecanismo potencial responsable de esta actividad involucra principalmente un proceso angiogénico y la inducción de un microambiente favorable para la progresión tumoral. La IL-17 presente en el microambiente tumoral induce la producción de VEGF y PGE2 por parte de fibroblastos y células tumorales; a su vez, el VEGF induce la producción de TGF- β , el cual favorece el incremento en la expresión del receptor para VEGF (VEGFR) en las células endoteliales, lo que promueve la formación de nuevos vasos sanguíneos⁸⁹. Además, la IL-17 también induce la producción de IL-8 e IL-6^{61, 85}. La IL-8 promueve una respuesta angiogénica en las células endoteliales, incrementa la proliferación, supervivencia y migración de las células tumorales, así como una infiltración de macrófagos y neutrófilos^{37, 55}. Por otra parte, la IL-6 activa la señalización de la molécula STAT3 en las células tumorales que da como resultado la sobre-expresión de genes pro-angiogénicos, así como genes que favorecen la supervivencia de las células tumorales^{37, 54}. Finalmente, la producción crónica de TNF- α dependiente de IL-17 incrementa el reclutamiento de MDSC que contribuyen a la progresión tumoral^{61, 85}.

Linfocitos Treg

Los linfocitos T reguladores (Treg) se diferencian en microambientes donde esté presente principalmente TGF- β , expresan el factor de transcripción Forkhead box P3 (FOXP3), la subunidad α del receptor de IL-2 (CD25) y secretan IL-10 y TGF- β ^{25, 81}.

La acumulación de linfocitos Treg dentro del tumor, así como en sangre periférica se ha asociado generalmente a un pronóstico desfavorable en NSCLC^{90, 91, 92}. En este contexto, los linfocitos Treg son considerados como un mecanismo principal de la

evasión tumoral. En el microambiente tumoral están presentes la quimiocina CCL22, producida por las células tumorales y TAMs, así como la quimiocina CCL28, la cual está asociada a la expresión de HIF-1 α , ambas quimiocinas reclutan linfocitos Treg al sitio del tumor a través de sus receptores (CCR4 y CCR10, respectivamente) presentes en estos^{93, 94}. Al llegar al sitio del tumor, el TGF- β , la IL-10 y la adenosina presente en el microambiente tumoral promueve la expansión y generación de los linfocitos Treg^{94, 95}.

Los linfocitos Treg pueden contribuir al proceso angiogénico de manera indirecta suprimiendo la actividad de los linfocitos Th1, evitando que estos produzcan citocinas angiostáticas como TNF- α e IFN- γ ⁵⁰. Además, en condiciones de hipoxia, los linfocitos Treg contribuyen al proceso angiogénico directamente a través de la producción de VEGF⁹⁴. Además del efecto sobre el proceso angiogénico, los linfocitos Treg actúan suprimiendo la respuesta inmunológica anti-tumoral a través de la secreción de citocinas como la IL-10 y el TGF- β , evitando la maduración y función de las DCs y linfocitos T efectoros^{50, 96, 97}.

Los linfocitos Treg presentan en su superficie las moléculas CD39 y CD73, estas moléculas son ectoenzimas que generan adenosina pericelular, la cual, al unirse al receptor de adenosina 2A (A2AR) presente en los linfocitos T efectoros, induce arresto celular, también favorece la diferenciación de los linfocitos iTreg inhibiendo la producción de IL-6 y promoviendo la producción de TGF- β ^{50, 97, 98}. Además, se ha reportado que dada la alta expresión de la molécula CD25 en los linfocitos Treg, estos linfocitos son capaces de consumir la IL-2 presente en el microambiente, lo que da como resultado que los linfocitos T efectoros entren en apoptosis^{50, 97}.

Los linfocitos Treg pueden llevar a cabo su función efectora mediante el contacto célula-célula gracias a moléculas presentes en su superficie. Se ha reportado que el antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA-4) expresado en los linfocitos Treg interacciona con las moléculas CD80 y CD86 presentes en las DCs, esta interacción evita la maduración de las DCs lo que disminuye su capacidad de

presentar antígenos a los linfocitos T efectores^{50, 96, 97}. Además, los linfocitos Treg promueven que las DCs secreten indolamina 2, 3 dioxigenasa (IDO), esta molécula induce la inhibición y apoptosis de linfocitos T efectores a través de metabolitos pro-apoptóticos generados a partir del triptófano^{50, 97}. Las moléculas galectina-1 y neurofilina-1 también son expresadas en la superficie de los linfocitos Treg cuya interacción con las DCs induce, en el caso de la galectina-1, el arresto celular y apoptosis de las DCs, mientras que la neurofilina-1 disminuye su capacidad de presentar antígenos^{96, 97}. Finalmente se ha reportado que la molécula gen-3 de activación de linfocitos (LAG3 [CD223]) es capaz de bloquear la maduración de las DCs debido a que LAG3 al ser una molécula homóloga de la molécula CD4, se une con una gran afinidad al MHC clase II^{96, 97}.

Linfocitos T CD8⁺

Los linfocitos T CD8⁺ (CTLs) tienen un papel esencial en la respuesta inmunológica contra virus y cáncer. En la etapa de eliminación, los linfocitos T CD8⁺ reconocen péptidos tumorales unidos a la molécula del MHC clase I presentados por las APCs dentro de un microambiente pro-inflamatorio y una correcta co-estimulación (interacción CD28-CD80/86)^{25, 76}. Una vez activados los linfocitos T CD8⁺ producen IFN- γ y pueden eliminar células tumorales mediante la vía dependiente de gránulos, liberando granzimas y perforinas, o mediante la vía mediada por receptores a través de la interacción del ligando de Fas (FasL) con su receptor (Fas)^{48, 99}. Sin embargo, en la etapa de escape, hay una disminución en la infiltración y actividad de los linfocitos T CD8⁺^{38, 100}. Esta disfunción puede atribuirse a distintas causas, entre las que destacan, una presentación de antígeno deficiente por parte de las DCs, disminución de citocinas tipo Th1 (IL-2, IL-12) un incremento en la concentración de citocinas inmunosupresoras del microambiente tumoral como la IL-10, el TGF- β , así como IDO y ARG-1 derivadas de poblaciones de MDSC y linfocitos Treg reclutados en el sitio del tumor^{33, 35, 100, 101}. Además, los linfocitos T CD8⁺ pueden presentar

defectos en el complejo CD3 ϵ , un componente esencial del complejo CD3/TCR, que evita la activación de los linfocitos T CD8⁺¹⁰².

ANTECEDENTES

Diagnóstico y tratamiento

Para realizar el diagnóstico del cáncer de pulmón se emplean los métodos más convenientes y menos invasivos posibles, entre estos destacan la evaluación radiológica de tórax y la tomografía por emisión de positrones (PET). Además, se debe incluir la citología del esputo, análisis de líquido bronco-alveolar, así como de líquido pleural. Finalmente, la confirmación del diagnóstico se realiza a través del análisis de biopsias de tejido pulmonar y/o ganglios linfáticos obtenidos mediante broncoscopía¹⁰³.

El tratamiento dependerá del estadio diagnosticado; cuando se detecta en estadios I y II, el paciente puede ser candidato a cirugía y posteriormente tratado con quimioterapia; cuando se diagnostica en estadio IIIa, el paciente puede recibir tratamiento por quimioterapia y si se reduce el tamaño del tumor, ser candidato a cirugía; cuando el cáncer pulmonar es diagnosticado en estadios IIIb o IV el paciente sólo es candidato a quimioterapia paliativa, en estos estadios difícilmente el paciente puede ser sometido a cirugía^{103, 104, 105, 106}.

Desafortunadamente en México, los pacientes son diagnosticados en estadios IIIb y IV por lo que tienen un pobre pronóstico. Para estos pacientes, el tratamiento estándar es la quimioterapia a base de compuestos platinados (cisplatino o carboplatino) combinado con taxanos (paclitaxel o docetaxel). La quimioterapia consta de 6 ciclos, uno cada 3-4 semanas^{104, 105, 107, 108}.

Cisplatino/Carboplatino

El cisplatino o cis-diaminoetilcloroplatino fue el primer compuesto platinado aprobado para su uso en 1978, posteriormente se aprobó el uso del carboplatino. La dosis administrada dependerá del compuesto platinado, el fármaco con el cual será combinado, así como del estado general del paciente. El cisplatino es usado

generalmente a dosis de entre 50 y 120 mg/m² por ciclo, mientras que la dosis de carboplatino depende de cada paciente¹⁰⁷.

El efecto citotóxico de los compuestos platinados es mediado por la formación de aductos de guanina y adenosina, estas uniones detienen la replicación del DNA e inducen la apoptosis de las células^{106, 107, 109, 110}. Los compuestos platinados atacan indiscriminadamente todas las células que se encuentran en proceso de división celular y un efecto adverso importante es la capacidad de inducir resistencia al fármaco. Por otra parte, los efectos secundarios más comunes son náuseas vómito, mielosupresión, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad^{107, 109}.

Taxanos (Paclitaxel/Docetaxel)

El paclitaxel fue el primer compuesto de la familia de los taxanos que presentó actividad anti-tumoral y en 1995 fue aprobado su uso clínico en el tratamiento de los NSCLC^{108, 111}.

El paclitaxel y el docetaxel se unen a la subunidad beta de la microtubulina favoreciendo su ensamblaje y estabilizando los microtúbulos impidiendo su despolimerización. Esto inhibe la reorganización normal de la red de microtúbulos, esencial para las funciones celulares en la fase G₂/M interrumpiendo la división celular^{108, 111}. Ambos compuestos generalmente son bien tolerados, sin embargo, pueden generar toxicidad y efectos secundarios como alopecia, artralgias, mialgias, reacciones de hipersensibilidad¹¹².

Muerte Celular Inmunogénica

La quimioterapia ha sido considerada como una estrategia que impacta directamente en la viabilidad de las células tumorales, induciendo su muerte a través de la vía de la apoptosis (aunque también induce necrosis), la apoptosis se ha considerado como tolerogénica por lo que la participación de la respuesta inmunológica no se ha considerado relevante. Sin embargo, de manera reciente se

ha reportado que una serie de cambios en la composición de la superficie celular, así como liberación de factores solubles por parte de las células tumorales en proceso de muerte son capaces de inducir una respuesta inmunológica en contra de antígenos asociados a estas células, considerando este tipo de muerte una muerte celular inmunogénica (ICD por sus siglas en inglés)^{113, 114}.

La inmunogenicidad de la muerte celular dependerá de moléculas llamadas “patrones moleculares asociados a daño” (DAMPs) o también llamadas alarminas. Los DAMPs son moléculas intracelulares que adquieren propiedades inmunoestimuladoras cuando son expresadas en la superficie de las células o liberadas al ambiente extracelular¹¹⁵. Los DAMPs característicos de la ICD son: relocalización de calreticulina en la membrana celular, liberación de ATP y secreción de HMGB1^{113, 114, 116}.

Como resultado del estrés inducido por el tratamiento, la calreticulina que se encuentra normalmente en el retículo se relocaliza en el exterior de la membrana plasmática, donde actúa como una señal de “cómeme” facilitando la fagocitosis de las células tumorales por parte de las DCs^{113, 114, 116}. Al igual que la calreticulina, la liberación de ATP al medio extracelular puede ser inducida por el tratamiento quimioterapéutico, esta molécula actúa como una señal quimiotáctica o de “encuéntrame” para macrófagos y DCs favoreciendo su maduración e incrementando la expresión de moléculas co-estimuladoras y moléculas de clase II del MHC^{113, 116}. Además, la molécula HMGB1, que normalmente se localiza en el núcleo de las células, también es liberada al medio extracelular y actúa como otra molécula de “encuéntrame” y una vez captada por sus receptores presentes en macrófagos y DCs desencadena una respuesta proinflamatoria^{113, 114, 116}.

Quimioterapia y Sistema Inmunológico

Además de la inducción de ICD, varios fármacos quimioterapéuticos empleados de manera convencional en el tratamiento de distintos tipos de cáncer, entre ellos los

NSCLC, pueden favorecer la participación de la respuesta inmunológica^{117, 118, 119}. Se ha reportado que la gemcitabina incrementa la expresión de moléculas de clase I del HLA¹²⁰, promueve la presentación de antígenos¹²¹ e induce la eliminación de MDSCs¹²². La doxorubicina promueve la producción de MCP1, TNF- α e IL-8^{123, 124}. Mientras que la ciclofosfamida disminuye el porcentaje de linfocitos Treg y MDSCs^{125, 126}, esto favorece el reclutamiento de macrófagos y la activación de células NK y CTLs.

En el caso de los taxanos (docetaxel y paclitaxel), se ha reportado que disminuyen la proporción de MDSCs¹²⁷, células Treg¹²⁸ e inducen la producción de MCP1 (Proteína Quimiotáctica de Macrófagos 1) o CCL2¹²⁴ por parte de las células tumorales favoreciendo la infiltración de monocitos/macrófagos. Además, el paclitaxel induce la secreción de citocinas pro-inflamatorias, favorece la maduración de las DCs, así como la activación de células T y NK¹⁰⁸.

Se ha reportado que los compuestos platinados como el carboplatino, cisplatino y oxaliplatino, incrementan la expresión de moléculas de clase I del HLA en células tumorales¹²⁰ y disminuyen la expresión de la molécula PDL2¹²⁹. Además, en modelos animales de carcinoma de Lewis, el tratamiento con cisplatino induce la sobreexpresión de Fas en las células tumorales, lo que favorece la lisis por parte de los CTLs¹³⁰.

De manera particular, se ha reportado que en los NSCLC el tratamiento con gemcitabina y cisplatino favorece la disminución de células Treg (CD4+CD25+FOXP3+)¹³¹. También, se ha reportado que la combinación de paclitaxel cisplatino y doxorubicina induce la expresión del receptor de manosa-6-fosfato en células tumorales, lo que favorece la eliminación de estas células tumorales por granzima B¹³².

Antecedentes directos del laboratorio

Nuestro grupo de trabajo ha reportado que los linfocitos CTLs de pacientes con cáncer pulmonar presentan defectos en el complejo CD3 ϵ ¹⁰² que evitan su correcta activación, así como disminución en su actividad citotóxica dependiente de granzimas y perforinas^{100, 133}. También ha reportado que los CTLs efectores provenientes de derrame pleural son susceptibles a la muerte celular inducida por activación (AICD por sus siglas en inglés)¹³⁴. Estas disfunciones pueden ser debidas a la presencia de factores solubles como TGF- β , IL-10 e IL-6 producidos por las células tumorales^{135, 136} o por la actividad tanto de linfocitos Treg como de linfocitos Th17¹³⁷.

Por otra parte, nuestro grupo también ha reportado que un alto infiltrado de DCs en biopsias de pacientes con adenocarcinoma pulmonar se asocia con la expresión de HMGB1 en células tumorales¹³⁸. En un estudio inicial, nuestro grupo ha observado que algunos pacientes con cáncer pulmonar bajo tratamiento por quimioterapia a base de compuestos platinados (cisplatino/carboplatino combinado con paclitaxel/docetaxel) incrementan ligeramente HMGB1 a nivel sérico, lo que parece asociarse con mayor sobrevida.

Por lo anterior, consideramos importante evaluar si el tratamiento convencional empleado en los pacientes con adenocarcinoma pulmonar favorece la activación de la respuesta inmunológica y si esta respuesta se asocia a la sobrevida de los pacientes.

HIPÓTESIS

En los pacientes con adenocarcinoma pulmonar, la quimioterapia convencional a base de compuestos platinados modificará las distintas subpoblaciones de linfocitos T, así como las citocinas asociadas a éstas, favoreciendo un perfil anti-tumoral que se reflejará a nivel sistémico.

OBJETIVO GENERAL

Comparar los linfocitos T CD8⁺, las distintas subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺, así como las citocinas asociadas a estas poblaciones celulares entre sujetos sanos y pacientes con adenocarcinoma pulmonar. Además, evaluar si el tratamiento con quimioterapia convencional a base de cisplatino/paclitaxel induce cambios en los parámetros mencionados anteriormente.

Objetivos Particulares

En los sujetos sanos, así como en el grupo de pacientes antes y durante el tratamiento:

Cuantificar las citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL17 y TGF- β en plasma.

Determinar las proporciones de las subpoblaciones de linfocitos Th1 (CD4⁺T-bet⁺), Th2 (CD4⁺CRTH2⁺), Th17 (CD4⁺ROR γ ⁺), Treg (CD4⁺CD25⁺CD127⁻), así como el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ (CTLs).

A partir de los linfocitos T CD8⁺ evaluar la proporción de CTLs que expresan granzima B, perforina o ambas moléculas.

Determinar la proporción de linfocitos T CD4⁺ y CTLs con fenotipo naive (CD45RO⁺CD27⁻), efector (CD45RO⁻CD27⁻), de memoria central (CD45RO⁺CD27⁺) y de memoria efectora (CD45RO⁺CD27⁻).

Establecer la asociación de los parámetros estudiados con la supervivencia de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar.

METODOLOGÍA

Tipo de estudio y grupos de estudio

El presente estudio es de tipo retrospectivo-prospectivo, longitudinal y de tipo cohorte. Grupo de estudio: pacientes atendidos en la clínica de cáncer (servicio clínico 3) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) "Ismael Cosío Villegas". Grupos control: sujetos sanos no fumadores y sujetos sanos fumadores "pesados" (Índice tabáquico [I.T.] > 15 paquetes/año). Este estudio fue aprobado por el Comité de Ciencia y Bioética del INER.

Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Se seleccionaron pacientes de 40 años en adelante con diagnóstico confirmado de adenocarcinoma pulmonar primario estadio IIIb y IV. El diagnóstico fue establecido por medio del análisis histológico por parte del Departamento de Patología del INER, basados en los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS)⁶.

Los pacientes que participaron en este estudio fueron tratados con quimioterapia a base de cisplatino y paclitaxel durante seis ciclos, se incluyeron aquellos pacientes que no presentaron comorbilidades (disfunción cardiopulmonar severa, cardiopatías), tuvieron un Karnofsky mayor o igual a 80%, así como función renal y hepática aceptable. Los sujetos control fueron sujetos sanos de 40 años en adelante con una función respiratoria normal (relación volumen espiratorio forzado en el primer segundo [FEV1] / capacidad vital forzada [FVC] > 70), no presentaron alguna infección o recibieron algún tratamiento médico por lo menos 3 meses antes de la toma de muestra. En el caso de los sujetos sanos fumadores tuvieron un I.T. > 15paquetes/año. Todos los participantes del estudio firmaron una carta de consentimiento informado.

Se excluyeron del estudio aquellos pacientes que no aceptaron participar en el estudio, no fueron candidatos a recibir tratamiento por quimioterapia a base de

cisplatino y paclitaxel, presentaron comorbilidades, tuvieron un Karnofsky menor a 80%, o su función renal y/o hepática estaba afectadas. En el caso de los sujetos control se excluyeron aquellos cuya función respiratoria estuvo afectada (FEV1/FVC < 70), que presentaron alguna infección o no aceptaron participar en el estudio.

Se descartaron aquellos pacientes que presentaron linfopenia durante el tratamiento y/o abandonaron el tratamiento.

Muestras biológicas

Se colectó sangre periférica de pacientes, sujetos sanos fumadores y sujetos sanos no fumadores. La muestra se colectó en tubos con anticoagulante (EDTA) por punción venosa. En el caso de los pacientes, la muestra biológica se colectó antes del primer, tercer y sexto ciclo de tratamiento.

Separación de plasma y células mononucleares

A partir de la muestra de sangre periférica se obtuvo el plasma y células mononucleares (PBMCs) empleando un gradiente de densidad por ficoll (Lymphoprep, Axis-Shield). El plasma se colectó y se almacenó a -70°C hasta su uso para la detección de citocinas. La fracción correspondiente a las PBMCs fue lavada y almacenada en nitrógeno líquido y una vez colectados los 3 ciclos de tratamiento se emplearon para el análisis por citometría de flujo.

Cuantificación de citocinas en plasma

La cuantificación de las citocinas en plasma, se realizó empleando el kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (Becton Dickinson [BD]), siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Las citocinas analizadas fueron IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , INF- γ e IL-17A. Los datos fueron adquiridos en el citómetro de flujo FACSCanto II (BD) empleando el software BD FacsDiva (BD), posteriormente se analizaron en el software FCAP Array V3.0 (Softlow). Finalmente,

los resultados fueron graficados con el software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software).

Además, se realizó la cuantificación de TGF- β 1 empleando el kit Quantikine ELISA Human TGF- β 1 Immunoassay (R&D systems), siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. La placa de 96 pozos fue analizada en el espectrofotómetro Multiskan Ascent (Thermo Scientific) determinando la densidad óptica a una longitud de onda de 450nm. Los resultados fueron graficados empleando el software GraphPad Prism 6.

Identificación de subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y fenotipo naive, efector, de memoria central y de memoria efectora.

Para llevar a cabo la identificación de los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ se emplearon los anticuerpos dirigidos en contra de moléculas de superficie α -CD3 PE-CF594 (Clona: UCHT1, BD Horizon TM), α -CD4 Alexa Fluor 700 (Clona: RPA-T4, BD Pharmingen TM) y α -CD8 APC/Cy7 (Clona: HIT8a, BioLegend). Además, para identificar a los linfocitos Th1 se empleó el anticuerpo α -T-bet FITC (Clona: 4B10, BioLegend); para identificar a los linfocitos Th2 se empleó el anticuerpo α -CRTH2 PE (Clona: BM16, BioLegend) y para identificar a los linfocitos Th17 se empleó el anticuerpo α -ROR γ PE (Clona: AFKJS-9, eBioscience), mientras que para identificar a los linfocitos Treg se emplearon los anticuerpos α -CD25 PE-Cy5 (Clona: M-A251, BD Pharmingen TM), α -CD127 Alexa Fluor 647 (Clona: A019D5, BioLegend) y α -FOXP3 Alexa Fluor 488 (Clona: 150D, BioLegend). Además, se emplearon los anticuerpos α -Granzima B FITC (Clona: GB11, BioLegend) y α -Perforina PE (Clona: B-D48, BioLegend) para identificar la proporción de CTLs que expresan granzima B y perforina. Finalmente, para identificar los fenotipos naive, efector, de memoria central y de memoria efectora se emplearon los anticuerpos α -CD45RO PE (Clona: UCHL1, BioLegend) y α -CD27 PerCP/Cy5.5 (Clona: O323, BioLegend).

Purificación de células CD4⁺

Parte de las PBMCs, se purificaron por selección negativa las células CD4⁺ empleando el kit CD4+ Tcell Isolation Kit II human (MACS, Miltenyi Biotec) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Para conocer el grado de pureza de la fracción obtenida, se realizó la tinción con anticuerpos α -CD3 FITC (Clona: HIT3a, BioLegend), α -CD4 PE (Clona: RPA-T4, BioLegend), α -CD8 PE-Cy5 (Clona: HIT8a, BioLegend).

Estimulación de PBMCs para la detección de IL-17 y estimulación de células CD4⁺ purificadas para la detección de IL10 y LAP TGF- β

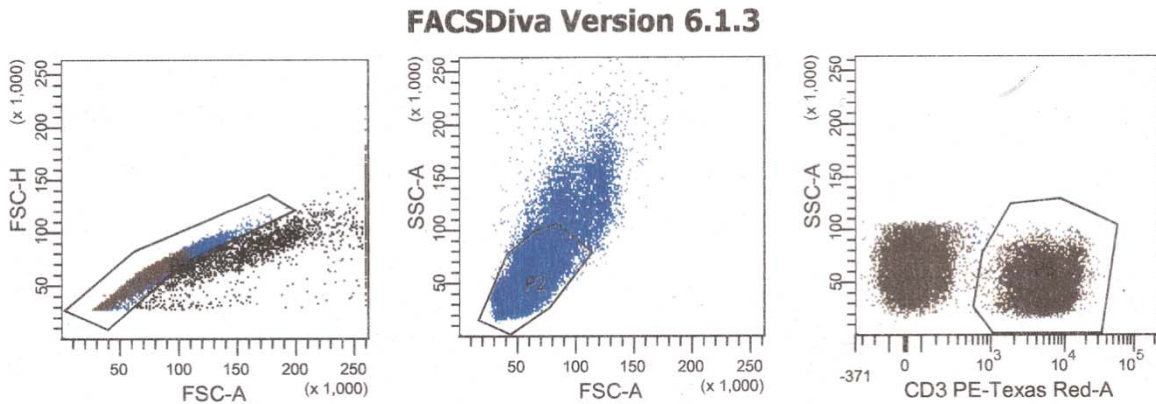
A 1×10^6 CMN en 500 μ l de medio RPMI-1640 (suplementado con 10% de suero fetal bovino) se adicionaron 5 μ l de los anticuerpos α -CD2, α -CD3 y α -CD28 unidos a perlas látex (T Cell Activation/Expansion Kit human, MACS Miltenyi Biotec) y se colocaron en placa de 48 pozos. La placa se incubó a 37°C durante 72 h. Después de colectar las células, se lavaron, se ajustaron a 1×10^6 células y se estimularon con PMA (25ng/mL), ionomicina (1 μ g/mL) y brefeldina A (10 μ g/mL) en un volumen de 1mL con medio RPMI-1640 (suplementado con 10% de suero fetal bovino) a 37°C por 5 h. Se emplearon los anticuerpos α -CD4 PE-Cy5 (Clona: RPA-T4, BioLegend), α -IL-17 PE (Clona: BL168, BioLegend) y α -IFN- γ Alexa Fluor 488 (Clona: 4S.B3, BioLegend) para identificar células Th17 productoras de IL-17.

Por otra parte, las células CD4⁺ purificadas, se estimularon con PMA (25ng/mL), ionomicina (1 μ g/mL) y brefeldina A (10 μ g/mL) en un volumen de 1mL con medio RPMI-1640 (suplementado con 10% de suero fetal bovino) a 37°C por 5 h. Se emplearon los anticuerpos α -CD4 Alexa Fluor 700 (Clona: RPA-T4, BD Pharmingen TM), α -CD25 PE-Cy5 (Clona: M-A251, BD Pharmingen TM), α -CD127 Alexa Fluor 647 (Clona: A019D5, BioLegend), α -FOXP3 Alexa Fluor 488 (Clona: 150D, BioLegend), α -LAP(TGF β 1) PE (Clona: TW4-6H10, BioLegend) para identificar LAP TGF- β en

membrana o anticuerpo α -IL-10 PE (Clona: JES3-19F1, BioLegend) para detectar la citocina intracelular.

Protocolo de tinción para citometría de flujo y adquisición de datos

Las PBMCs (estimuladas y no estimuladas), así como células CD4⁺ purificadas, se ajustaron a 2×10^5 células por tubo de tinción, posteriormente se realizó un lavado con solución PBS/BSA y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min. El botón celular se resuspendió en 100 μ L de PBS/BSA y se adicionaron los anticuerpos dirigidos en contra de las moléculas CD3, CD4, CD8, CRTH2, CD25, CD127, LAP TGF- β , CD45RO y CD27, expresadas en la membrana celular de los linfocitos T. Los tubos se incubaron a TA durante 30 min con agitación constante. Las células se lavaron y el botón celular se resuspendió en 200 μ L de solución Fix/Perm (BioLegend), se incubó a TA durante 20 min con agitación constante. Las células se lavaron nuevamente y el botón celular se resuspendió en 200 μ L de solución Perm (BioLegend), se incubó a TA durante 15 min con agitación constante. A las células permeabilizadas se agregaron los anticuerpos dirigidos en contra de los factores de transcripción T-bet, ROR γ y FOXP3, o bien en contra de IL-17, IL-10, granzima B y perforina. Los tubos se incubaron a TA durante 30 min con agitación constante, las células se lavaron y el botón celular se resuspendió en 300 μ L de paraformaldehído. Finalmente, las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo FACSCanto II empleando el programa BD FACS Diva. Se realizó la gráfica de tamaño área (FSC-A) vs tamaño altura (FSC-H) delimitando el área correspondiente a las células individuales, a partir de esa región se realizó la gráfica de tamaño (FSC) vs granularidad (SSC), se delimitó la región correspondiente a los linfocitos y a partir de esa región se realizó la gráfica de granularidad (SSC) vs CD3 o la gráfica de granularidad (SSC) vs CD4, seleccionando la región correspondiente a los linfocitos CD3⁺ o CD4⁺ respectivamente. De esta última región se adquirieron 20,000 eventos (Esquema 1).



Esquema 1. Estrategia representativa de adquisición de datos en el citómetro de flujo a partir de PBMCs. Muestra proveniente de un paciente previo al tratamiento.

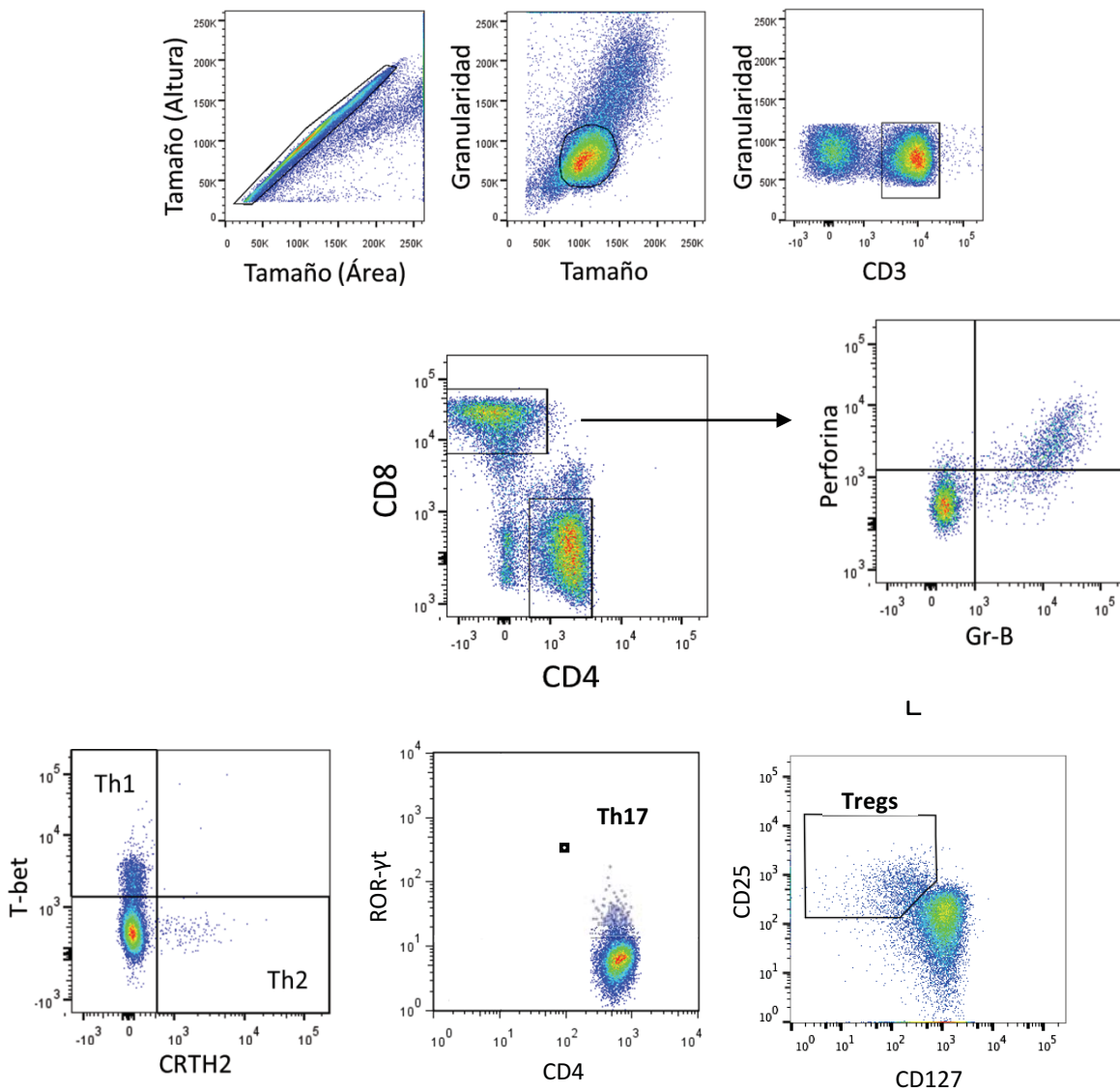
Estrategias de análisis para los datos obtenidos por citometría de flujo

En las muestras de PBMCs, se realizó la gráfica de a partir de la gráfica de tamaño área (FSC-A) vs tamaño altura (FSC-H) delimitando el área correspondiente a las células individuales, a partir de esa región se realizó la gráfica de tamaño (FSC) vs granularidad (SSC) de la que se obtuvo la región correspondiente a los linfocitos y a partir de esa región se realizó la gráfica de granularidad (SSC) vs CD3 se realizó la gráfica de CD4 vs CD8 para delimitar las regiones correspondientes a los linfocitos T CD3⁺CD4⁺ y linfocitos T CD3⁺CD8⁺. De la región de linfocitos T CD3⁺CD4⁺ se identificaron a los linfocitos Th1 (T-bet⁺), Th2 (CRTH2⁺), Th17 (ROR-γ⁺) y Treg (CD127⁻CD25⁺) mientras que a partir de la región de linfocitos T CD3⁺CD8⁺ se identificaron los CTLs que expresaron granzima B y/o perforina (esquema 2).

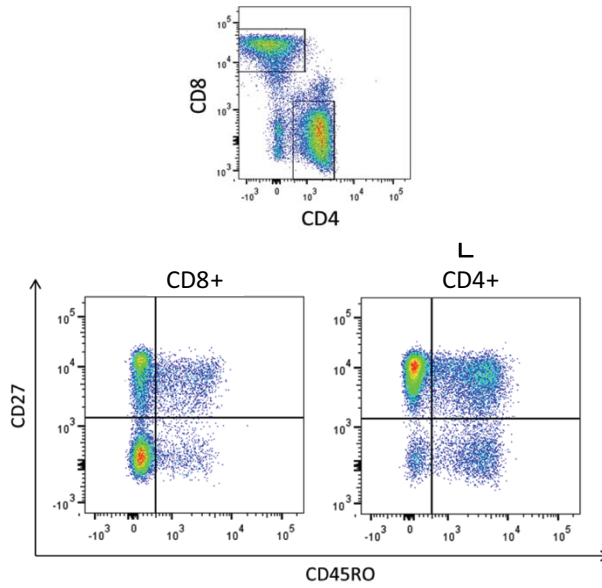
A partir de las regiones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ se identificaron los linfocitos con fenotipo naive (CD45RO⁻CD27⁺), efector (CD45RO⁻CD27⁻), de memoria central (CD45RO⁺CD27⁺) y de memoria efectora (CD45RO⁺CD27⁻) (esquema 3).

Además, en las muestras estimuladas, a partir de la gráfica de tamaño (FSC) vs granularidad (SSC) se realizó la gráfica de granularidad (SSC) vs CD4 para delimitar la región correspondiente a los linfocitos CD4⁺. De la región de linfocitos T CD4⁺ se identificaron a los linfocitos Th17 productores de IL-17 (IL-17⁺IFN γ⁻) (esquema 4).

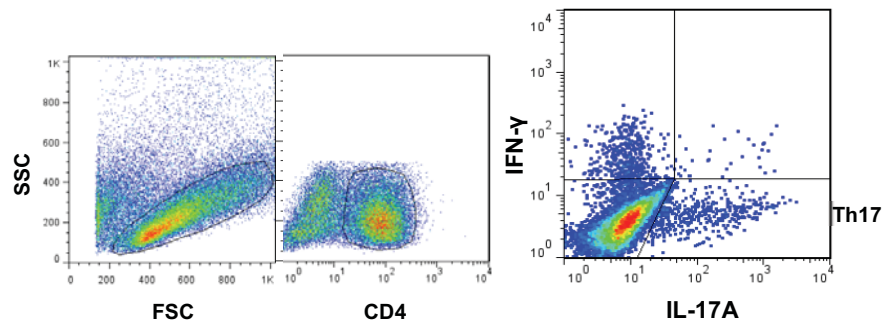
Por otra parte, en las muestras de linfocitos T CD4⁺ purificados, a partir de la gráfica de tamaño (FSC) vs granularidad (SSC) se realizó la gráfica de granularidad (SSC) vs CD4 para delimitar la región correspondiente a los linfocitos CD4⁺. De esta región se identificaron a los linfocitos Treg (CD127⁻CD25⁺). Finalmente se identificó el porcentaje de células LAP TGF-β⁺ (esquema 5).



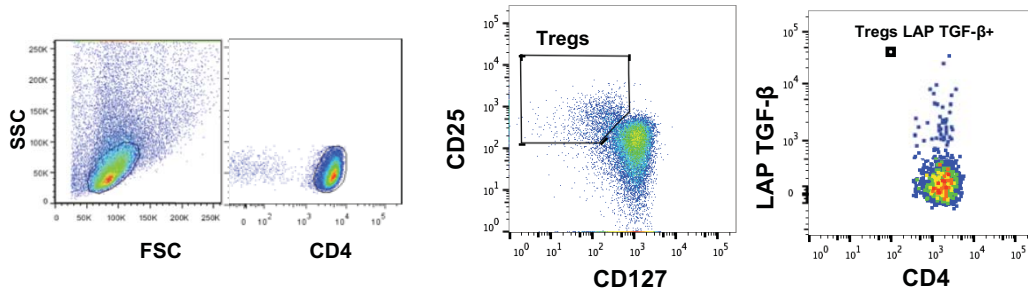
Esquema 2. Estrategia representativa de análisis de las subpoblaciones de linfocitos T CD3⁺. Muestra proveniente de un paciente previo al tratamiento.



Esquema 3. Estrategia representativa de análisis para la identificación del fenotipo naive, efector y de memoria. Muestra proveniente de un paciente previo al tratamiento.



Esquema 4. Estrategia representativa de análisis para la identificación de linfocitos Th17 productores de IL-17. Muestra proveniente de un paciente previo al tratamiento.



Esquema 5. Estrategia representativa de análisis para la identificación de linfocitos Treg LAP TGF-β⁺. Muestra proveniente de un paciente previo al tratamiento.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó con el programa GraphPad Prism 6. Se aplicó la prueba de D'Agostino & Pearson para identificar si los datos presentaban una distribución Gaussiana. Debido a que los datos presentaron una distribución no-Gaussiana se emplearon pruebas no paramétricas en los análisis posteriores.

Para determinar si existían diferencias entre pacientes y sujetos control se empleó la prueba de Kruskal Wallis y posteriormente la prueba de comparación múltiple de Dunn, considerando una $p < 0.05$ como nivel de significancia estadística.

Para el análisis a lo largo de los ciclos de tratamiento se empleó la prueba de Friedman para muestras pareadas, considerando una $p < 0.05$ como nivel de significancia estadística.

Para el análisis de los grupos con base a la supervivencia media, se emplearon las pruebas de Wilcoxon para muestras pareadas y la prueba de U de Mann-Whitney para comparación entre dos grupos independientes, considerando una $p < 0.05$ como nivel de significancia estadística.

Finalmente, para definir el valor de corte de los distintos parámetros evaluados se emplearon las curvas ROC (del inglés Receiver Operating Characteristic), y para determinar si existía asociación con la supervivencia, se empleó el método de Kaplan-Meier utilizando la prueba de Log-rank (Mantel-Cox) considerando una $p < 0.05$ como nivel de significancia estadística.

RESULTADOS

Resultados obtenidos de acuerdo a los grupos de estudio sin tratamiento

La cuantificación de las citocinas en plasma se realizó en muestras provenientes de 39 pacientes, 15 sujetos sanos fumadores y 13 sujetos sanos no fumadores. Por otra parte, el análisis de las subpoblaciones de linfocitos T se realizó en muestras provenientes de 28 pacientes, 15 sujetos sanos fumadores y 13 sujetos sanos no fumadores

Concentración de citocinas en plasma

Las concentraciones de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17 e IFN- γ fueron similares entre los sujetos sanos no fumadores y sujetos sanos fumadores, las concentraciones de TGF- β y TNF- α tendieron a ser mayores en el grupo de sujetos sanos fumadores comparadas con los sujetos sanos no fumadores. En el grupo de pacientes, las concentraciones de IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10 fueron significativamente mayores con respecto a los grupos de sujetos sanos fumadores y no fumadores. La concentración de TGF- β fue significativamente mayor con respecto al grupo de sujetos no fumadores y la concentración de TNF- α tendió a ser menor con respecto a los grupos de sujetos sanos fumadores y no fumadores (figura 1).

Porcentaje de linfocitos Th1, Th2, Th17 y Treg

Los porcentajes de linfocitos Th1, Th2 fueron similares entre los grupos de sujetos sanos fumadores y sujetos sanos no fumadores, mientras que los porcentajes de linfocitos Th17 y Treg tendieron a ser mayores en el grupo de sujetos sanos fumadores con respecto a los sujetos sanos no fumadores. En el grupo de pacientes, los porcentajes de linfocitos Th1 y Th2 tendieron a ser mayores con respecto los grupos de sujetos sanos fumadores y no fumadores. Los porcentajes de linfocitos Th17 y Treg fueron significativamente mayores con respecto a los sujetos sanos no fumadores (figura 2).

Porcentaje de linfocitos Th17 productores de IL-17 y linfocitos Treg LAP TGF- β

Los porcentajes de linfocitos Th17 productores de IL-17 fueron similares entre el grupo de sujetos sanos fumadores y el grupo de pacientes y ambos grupos fueron significativamente mayores con respecto al grupo de sujetos sanos no fumadores.

Los porcentajes de linfocitos Treg que expresaban LAP TGF- β fueron similares entre el grupo de sujetos sanos fumadores y sujetos sanos no fumadores. El porcentaje de linfocitos Treg que expresaban LAP TGF- β fue significativamente mayor en el grupo de pacientes con respecto a los grupos control.

Por otra parte, se analizó la expresión de LAP TGF- β empleando la intensidad media de fluorescencia (MFI). La MFI fue similar entre los grupos de sujetos sanos fumadores y no fumadores, mientras que fue significativamente mayor en el grupo de pacientes con respecto a los grupos control (figura 3). Finalmente, no detectamos producción de IL-10 en los linfocitos Treg (datos no mostrados).

Porcentaje de linfocitos T CD8⁺ y proporción de CTLs que expresan granzima B y perforina

El porcentaje de linfocitos T CD8⁺ (CTLs) tendió a ser menor en el grupo de sujetos sanos fumadores con respecto al porcentaje de CTLs de los sujetos sanos no fumadores. También, el porcentaje de CTLs que expresó granzima B, perforina o ambas moléculas, tendió a ser menor en el grupo de sujetos sanos fumadores con respecto al grupo de sujetos sanos no fumadores.

En el grupo de pacientes, el porcentaje de CTLs tendió a ser menor comparado con el grupo de sujetos sanos no fumadores. Además, el porcentaje de CTLs que expresó granzima B tendió a ser mayor con respecto al grupo de sujetos sanos no fumadores, mientras que el porcentaje de CTLs que expresaban perforina o ambas moléculas fue similar al porcentaje del grupo de sujetos sanos no fumadores.

Por otra parte, se analizó la expresión de granzima B y perforina (MFI). La MFI de la granzima B tendió a ser mayor en el grupo de sujetos sanos fumadores y en el grupo de pacientes con respecto al grupo de sujetos sanos no fumadores, mientras que la MFI de la perforina fue similar en los grupos estudiados (figura 4).

Porcentajes de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ con fenotipo naive, efector, de memoria central y de memoria efectora

En los grupos de sujetos sanos fumadores y sujetos sanos no fumadores, el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ con fenotipo naive y efector fue similar, mientras que el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ con fenotipo de memoria central tendió a incrementar y el de memoria efectora tendió a disminuir. En el grupo de pacientes, el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ con fenotipo de memoria efectora fue similar al porcentaje del grupo de sujetos sanos no fumadores, el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ con fenotipo naive y de memoria central tendió a ser menor comparado con los grupos control. Finalmente, el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ con fenotipo efector fue significativamente mayor con respecto a los grupos de sujetos sanos fumadores y no fumadores (figura 5).

En el grupo de sujetos sanos fumadores comparado con el grupo de sujetos sanos no fumadores, el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ con fenotipo naive y con fenotipo de memoria efectora tendió a ser mayor, el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ con fenotipo de memoria central fue significativamente mayor, mientras que el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ con fenotipo efector tendió a ser menor. En el grupo de pacientes, el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ con fenotipo naive, efector, de memoria central y de memoria efectora fue similar al porcentaje de los sujetos sanos no fumadores. Además, el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ con fenotipo naive y de memoria central fue significativamente menor, mientras que el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ con fenotipo efector fue significativamente mayor con respecto al grupo de sujetos sanos fumadores (figura 5).

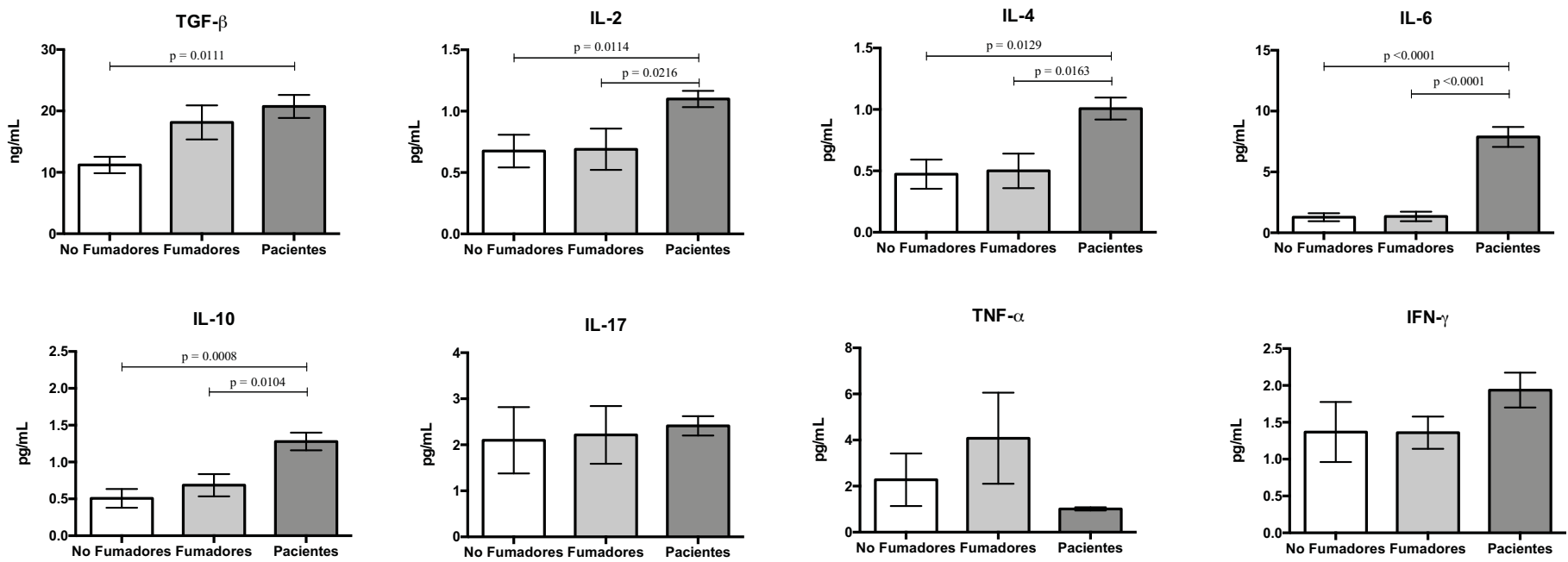


Figura 1. Concentración plasmática de las citocinas estudiadas en sujetos sanos no fumadores, fumadores y pacientes.

Pacientes n=39. Sujetos sanos fumadores n=15. Sujetos sanos no fumadores, n=13. Se indica la media y el error estándar.

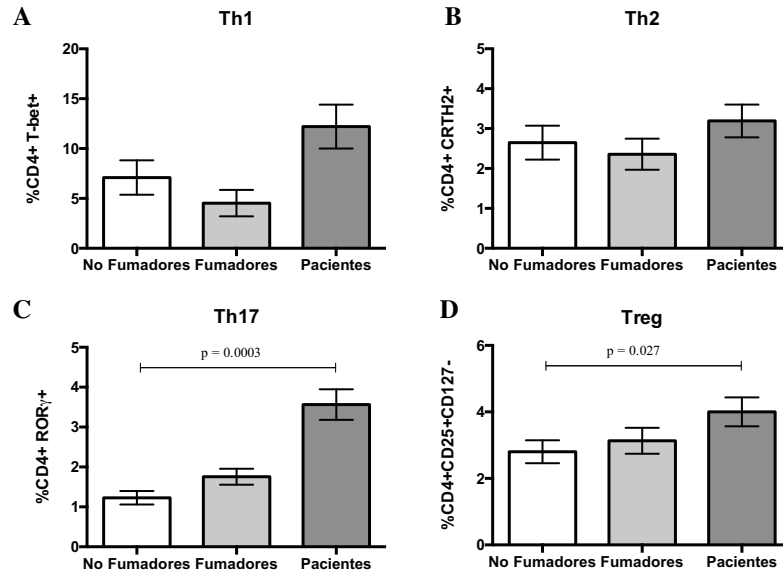


Figura 2. Porcentaje de las subpoblaciones de linfocitos T CD3⁺CD4⁺ en sujetos sanos no fumadores, fumadores y pacientes.

A. Linfocitos Th1 (CD4⁺T-bet⁺). **B.** Linfocitos Th2 (CD4⁺CRTH2⁺). **C.** Linfocitos Th17 (CD4⁺ROR- γ ⁺). **D.** Linfocitos Treg (CD4⁺CD127⁻CD25⁺). Pacientes n=28. Sujetos sanos fumadores n=15. Sujetos sanos no fumadores, n=13. Se indica la media y el error estándar.

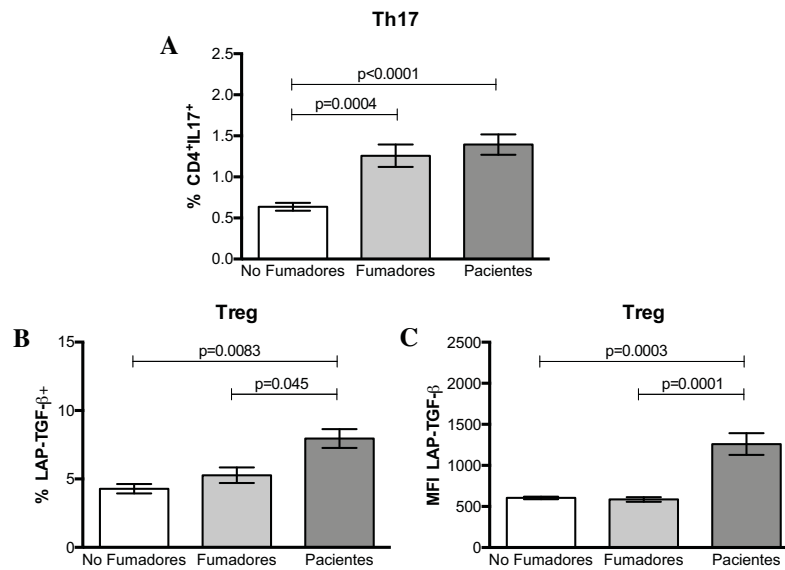


Figura 3. Porcentaje de linfocitos Th17 productores de IL-17 y linfocitos Treg LAP TGF- β ⁺ en sujetos sanos no fumadores, fumadores y pacientes.

A. Linfocitos Th17 IL-17⁺. **B.** Linfocitos Treg LAP TGF- β ⁺. **C.** MFI de LAP TGF- β ⁺. Pacientes n=28. Sujetos sanos fumadores n=15. Sujetos sanos no fumadores, n=13. Se indica la media y el error estándar.

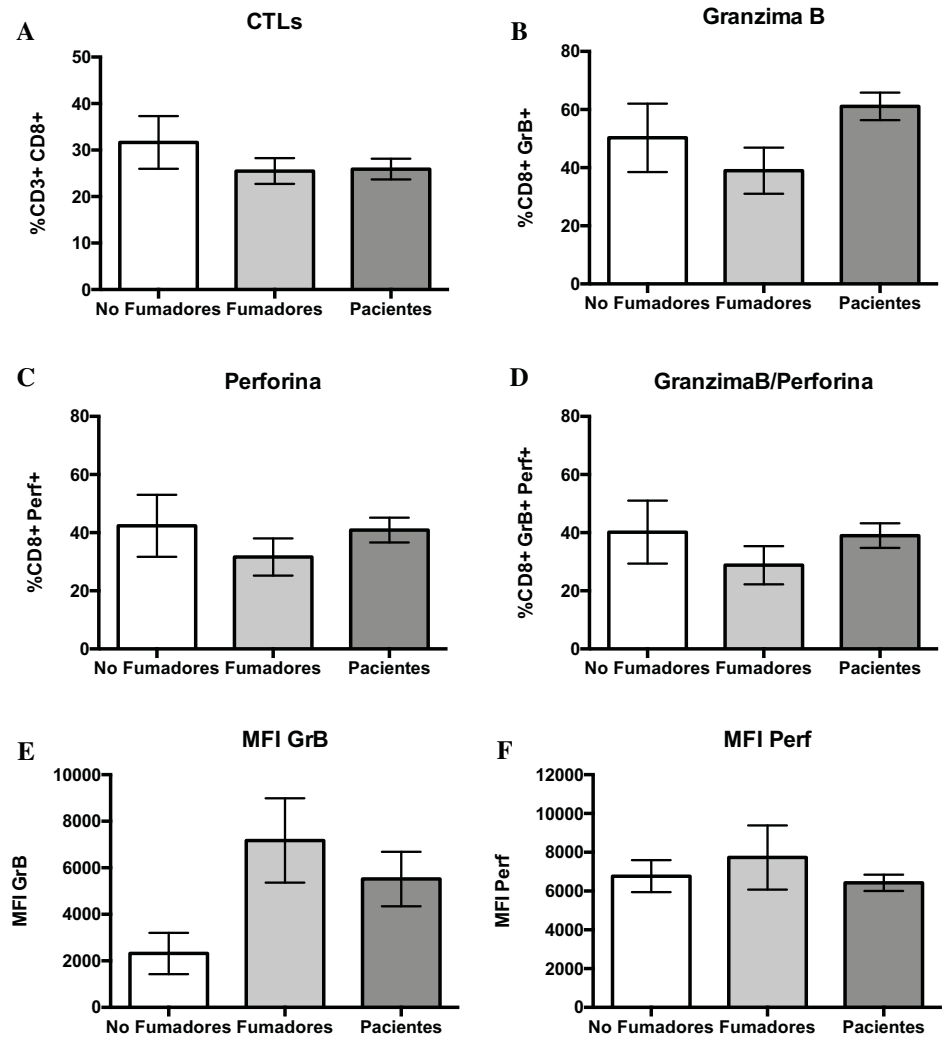


Figura 4. Porcentaje de linfocitos T CD8⁺ y proporción de CTLs que expresaron granzima y perforina en sujetos sanos no fumadores, fumadores y pacientes.

A. Linfocitos T CD8⁺. **B.** CTLs granzima B⁺. **C.** CTLs perforina⁺. **D.** CTLs granzima B⁺perforina⁺. **E.** MFI de granzima B. **F.** MFI de perforina. Pacientes n=28. Sujetos sanos fumadores n=15. Sujetos sanos no fumadores, n=13. Se indica la media y el error estándar.

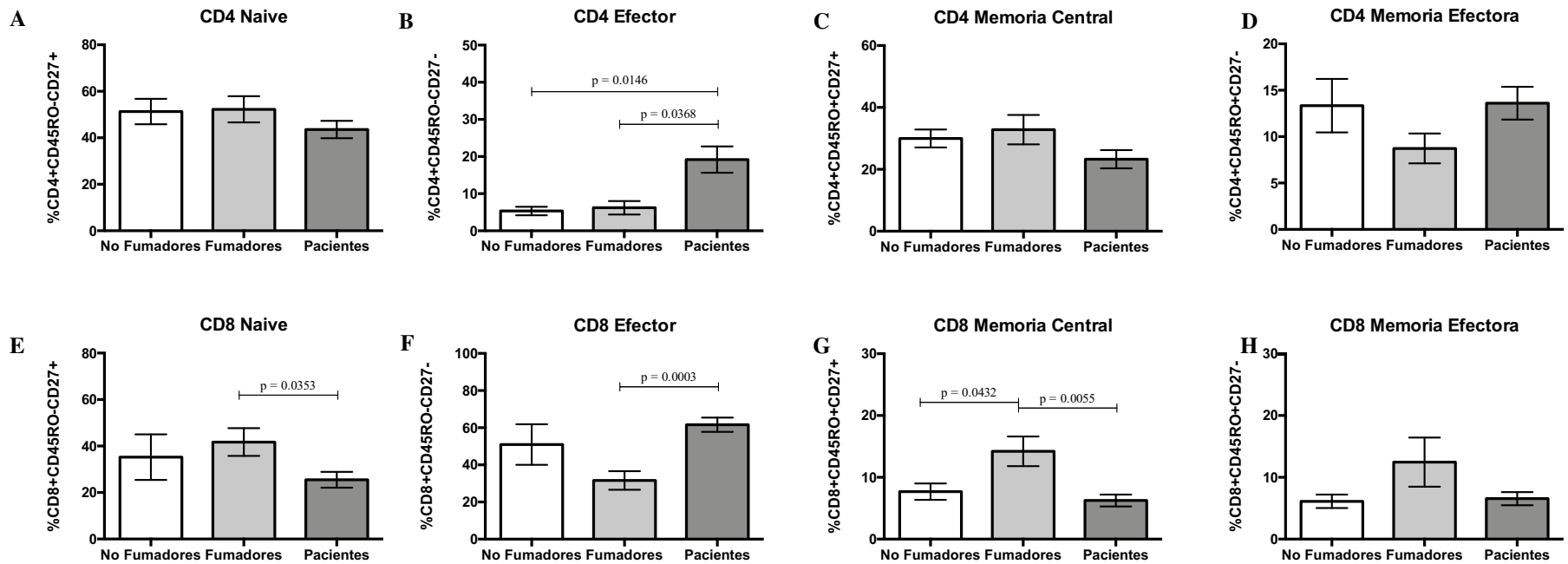


Figura 5. Porcentaje de linfocitos T CD4+y CD8+ con fenotipo de memoria, naive y efeitor en sujetos sanos no fumadores, fumadores y pacientes.

Porcentaje de Linfocitos T CD4⁺ con fenotipo naive (A), efeitor (B), de memoria central (C) y de memoria efeitora (D). Porcentaje de Linfocitos T CD8⁺ con fenotipo naive (E), efeitor (F), de memoria central (G) y de memoria efeitora (H). Pacientes n=28. Sujetos sanos fumadores n=15. Sujetos sanos no fumadores, n=13. Se indica la media y el error estándar.

Resultados obtenidos de los pacientes en tratamiento por quimioterapia

Para determinar si en el grupo de pacientes, el tratamiento por quimioterapia convencional a base de cisplatino y paclitaxel modificaba los parámetros estudiados, se analizó con respecto a su nivel basal, la concentración de las citocinas, los porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+, la proporción de CTLs que expresaron granzima B y perforina, así como el fenotipo naive efector y de memoria de los linfocitos T CD4+ y CD8+. Los datos se obtuvieron de las muestras provenientes antes de antes del primer ciclo (nivel basal), antes del tercer ciclo y antes del sexto ciclo.

Concentración de citocinas en plasma.

A lo largo del tratamiento no hubo diferencias en las concentraciones de TGF- β , IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ , mientras que la concentración de IL-6 tendió a incrementar antes del sexto ciclo (figura 6).

Porcentaje de linfocitos Th1, Th2, Th17 y Treg

Los porcentajes de los linfocitos Th1, Th2, Th17 y Treg no mostraron diferencias significativas durante los ciclos de tratamiento (figura 7).

Porcentaje de linfocitos T CD8⁺ y proporción de CTLs que expresaron granzima B y perforina

Los porcentajes de CTLs, así como de CTLs que expresaron granzima B y perforina no mostraron diferencias durante los ciclos de tratamiento. Además, el nivel de expresión (MFI) de ambas moléculas fue similar a lo largo del tratamiento (figura 8).

Porcentajes de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ con fenotipo naive, efector, de memoria central y de memoria efectora

Los porcentajes de linfocitos T CD4⁺, así como los porcentajes de linfocitos T CD8⁺ con fenotipo naive, efector, de memoria central y memoria efectora no mostraron diferencias durante los ciclos de tratamiento (figura 9).

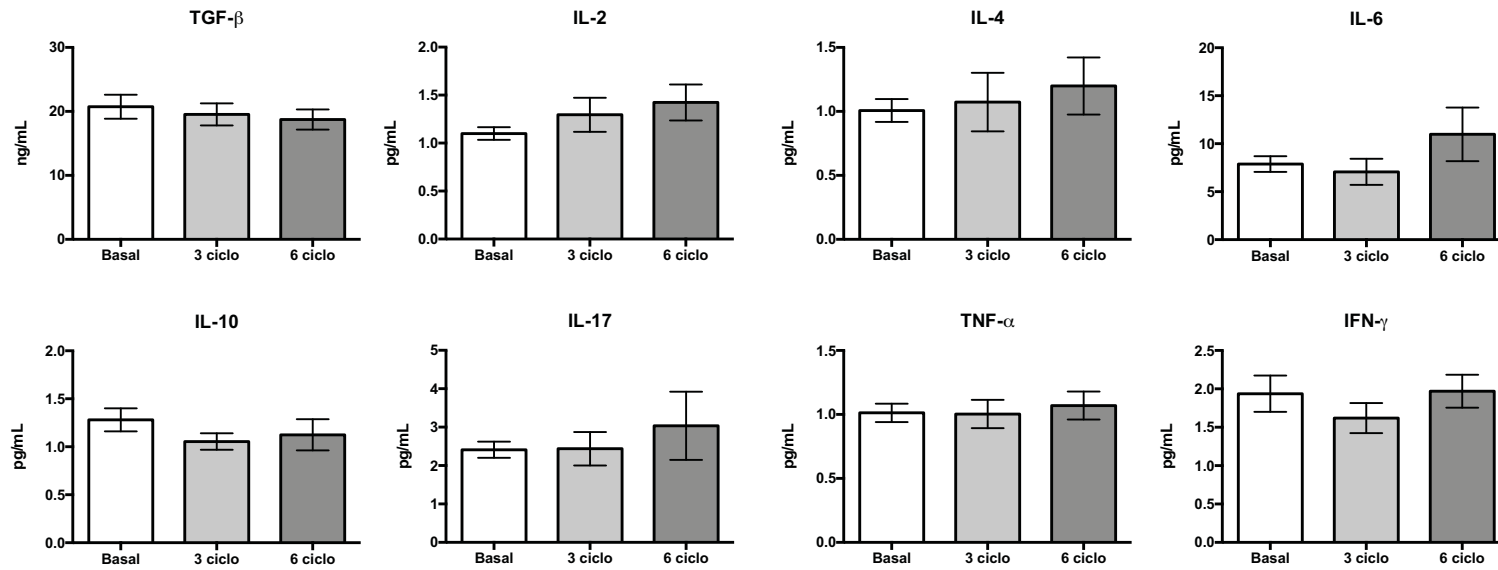


Figura 6. Concentración plasmática de las citocinas estudiadas en pacientes durante el tratamiento.

Se muestran la concentración basal (previa al primer ciclo de tratamiento), previa al 3^{er} ciclo de tratamiento y previa al 6^o ciclo de tratamiento. n=39. Se indica la media y el error estándar.

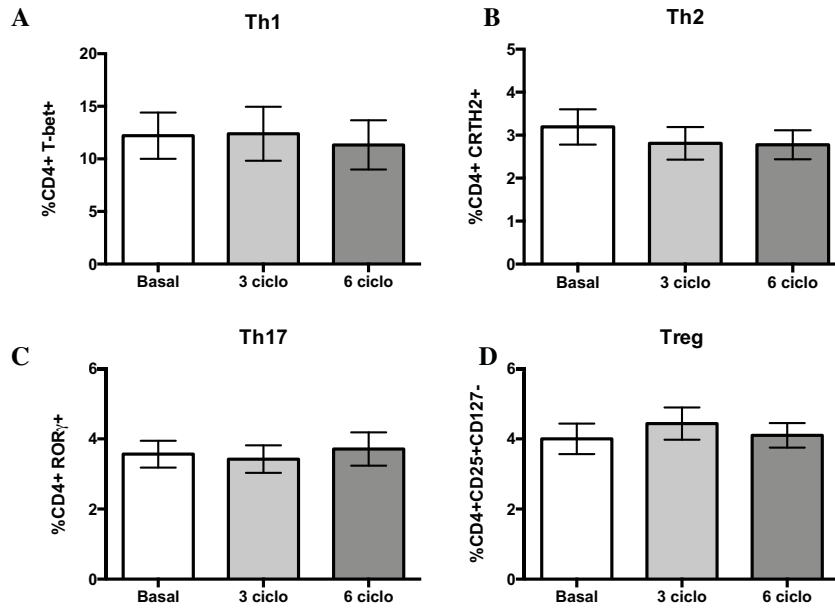


Figura 7. Porcentaje de las subpoblaciones de linfocitos T CD3⁺CD4⁺ en pacientes durante el tratamiento.

A. Linfocitos Th1 (CD4⁺T-bet⁺). **B.** Linfocitos Th2 (CD4⁺CRTH2⁺). **C.** Linfocitos Th17 (CD4⁺ROR-γ⁺). **D.** Linfocitos Treg (CD4⁺CD127⁻CD25⁺). n=28. Se grafica la media y el error estándar.

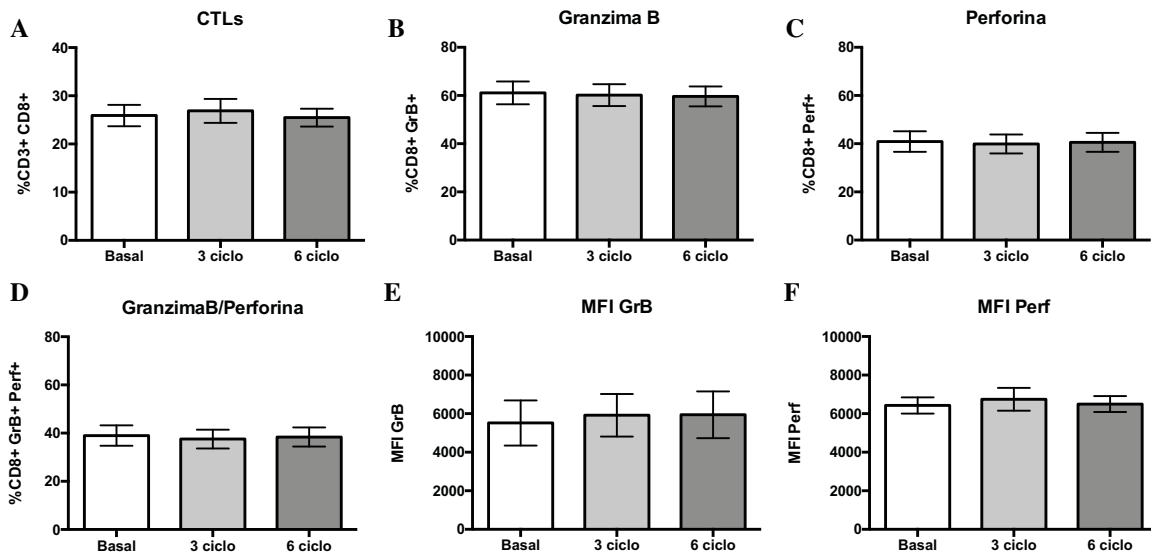


Figura 8. Porcentaje de linfocitos T CD8⁺ y proporción de CTLs que expresaron Granzima B y perforina en pacientes durante el tratamiento.

A. Linfocitos T CD8⁺. **B.** CTLs granzima B⁺. **C.** CTLs perforina⁺. **D.** CTLs granzima B⁺perforina⁺. **E.** MFI de granzima B. **F.** MFI de perforina. n = 28. Se grafica la media y el error estándar.

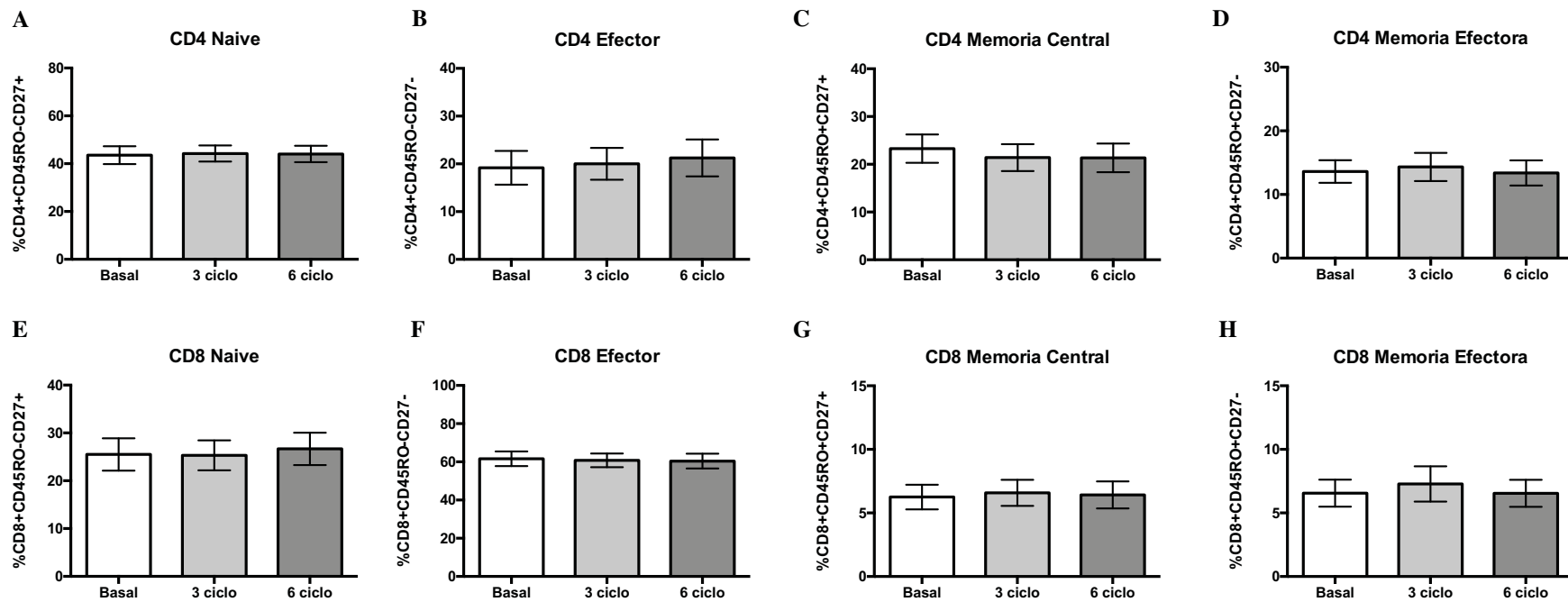


Figura 9. Porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ con fenotipo de memoria, naive y efector en pacientes durante el tratamiento.

Porcentaje de Linfocitos T CD4⁺ con fenotipo naive (A), efector (B), de memoria central (C) y de memoria efectora (D). Porcentaje de Linfocitos T CD8⁺ con fenotipo naive (E), efector (F), de memoria central (G) y de memoria efectora (H). Pacientes, n=28. Se grafica la media y el error estándar.

Resultados en el grupo de pacientes de acuerdo a la sobrevida media de los pacientes

Debido a que, durante el tratamiento, los distintos parámetros evaluados no mostraron diferencias significativas, se analizó la concentración de las citocinas, así como los porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos T con base a la sobrevida media del grupo de pacientes. La sobrevida media fue de 12 meses y el grupo de pacientes se dividió en pacientes con sobrevida mayor a 12 meses y pacientes con sobrevida menor a 12 meses. Se analizaron los parámetros antes mencionados a nivel basal y antes del sexto ciclo de tratamiento en ambos grupos de pacientes.

Concentración de citocinas en plasma

En el grupo de pacientes con sobrevida mayor a 12 meses, la concentración de IL-6 e IL-10 antes del sexto ciclo fue similar a la concentración basal, mientras que la concentración de IL-2, IL-4, IL-17, TNF- α e IFN- γ tendió a incrementar antes del sexto ciclo con respecto al basal, así mismo la concentración de TGF- β tendió a disminuir antes del sexto ciclo con respecto al basal.

Por otra parte, en el grupo de pacientes con sobrevida menor a 12 meses, la concentración de TGF- β , IL-2 antes del sexto ciclo fue similar a la concentración basal, la concentración de TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-10 tendió a disminuir, mientras que la concentración de IL-17 fue significativamente menor antes del sexto ciclo con respecto a la concentración basal. Finalmente, la concentración de IL-6 incrementó significativamente antes del sexto ciclo con respecto al basal. Además, la concentración de IL-6 antes del sexto ciclo de los pacientes con sobrevida menor a 12 meses, fue significativamente mayor a la concentración de IL-6 antes del sexto ciclo de los pacientes con sobrevida mayor a 12 meses (figura 10).

Porcentaje de linfocitos Th1, Th2, Th17 y Treg

En el grupo de pacientes con sobrevida menor a 12 meses, el porcentaje de linfocitos Th1, Th2, Th17 y Treg antes del sexto ciclo fue similar al porcentaje basal. En el grupo de pacientes con sobrevida mayor a 12 meses, el porcentaje de linfocitos Th1, Th17 y Treg antes del sexto ciclo fue similar al porcentaje basal, mientras que el porcentaje de linfocitos Th2 tendió a disminuir antes del sexto ciclo. Además, el porcentaje de linfocitos Th2, Th17 y Treg fue similar entre ambos grupos de pacientes, mientras que el porcentaje de linfocitos Th1 tendió a ser menor en el grupo de pacientes con sobrevida menor a 12 meses con respecto al grupo de pacientes con sobrevida mayor a 12 meses (figura 11).

Porcentaje de linfocitos T CD8⁺ y proporción de CTLs que expresan granzima B y perforina

En el grupo de pacientes con sobrevida menor a 12 meses, el porcentaje de CTLs antes del sexto ciclo fue similar al porcentaje basal. La proporción de CTLs que expresaron granzima B y perforina antes del sexto ciclo fue similar a la proporción basal. Además, la MFI de estas moléculas antes del sexto ciclo fue similar a la MFI basal. En el grupo de pacientes con sobrevida mayor a 12 meses, el porcentaje de CTLs, la proporción de estos que expresaba granzima B y perforina, así como la MFI de estas moléculas fue similar antes del sexto ciclo y el nivel basal.

Por otra parte, el porcentaje de CTLs fue significativamente menor en el grupo de pacientes con sobrevida menor a 12 meses tanto a nivel basal como antes del sexto ciclo comparado con el porcentaje de CTLs del grupo de pacientes con sobrevida mayor a 12 meses. Además, el porcentaje de CTLs que expresaron granzima B, perforina o ambas moléculas fue significativamente menor antes del sexto ciclo con respecto al porcentaje basal y antes del sexto ciclo del grupo de pacientes con sobrevida mayor a 12 meses. Finalmente, la MFI de la perforina fue similar en ambos grupos de pacientes, mientras que la MFI de la granzima B tendió a ser

menor en el grupo de pacientes con sobrevida menor a 12 meses con respecto al grupo de pacientes con sobrevida mayor a 12 meses (figura 12)

Porcentajes de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ con fenotipo naive, efector, de memoria central y de memoria efectora

Los porcentajes de linfocitos T CD4⁺ con fenotipo naive, efector, de memoria central y de memoria efectora fueron similares cuando se compararon antes del sexto ciclo y a nivel basal tanto en el grupo de pacientes con sobrevida menor a 12 meses como en el grupo de pacientes con sobrevida mayor a 12 meses. Sin embargo, el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ con fenotipo naive tendió a ser mayor en el grupo de pacientes con sobrevida menor a 12 meses con respecto al grupo de pacientes con sobrevida mayor a 12 meses. El porcentaje de linfocitos T CD4⁺ con fenotipo efector y fenotipo de memoria central tendió a ser menor en el grupo de pacientes con sobrevida menor a 12 meses con respecto al grupo de pacientes con sobrevida mayor a 12 meses (figura 13).

Con respecto a los porcentajes de linfocitos T CD8⁺ con fenotipo naive, efector, de memoria central y de memoria efectora fueron similares cuando se compararon antes del sexto ciclo y a nivel basal tanto en el grupo de pacientes con sobrevida menor a 12 meses como en el grupo de pacientes con sobrevida mayor a 12 meses. El porcentaje de linfocitos T CD8⁺ con fenotipo de memoria central en el grupo de pacientes con sobrevida menor a 12 meses y en el grupo de pacientes con sobrevida mayor a 12 meses fue similar. Mientras que el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ con fenotipo de memoria efectora tendió a ser menor en el grupo de pacientes con sobrevida menor a 12 meses con respecto al grupo de pacientes con sobrevida mayor a 12 meses. Además, los porcentajes de linfocitos T CD8⁺ con fenotipo efector y fenotipo naive fueron significativamente menores y significativamente mayor respectivamente, antes del sexto ciclo con respecto al nivel basal y antes del sexto ciclo del grupo de pacientes con sobrevida mayor a 12 meses (figura 13).

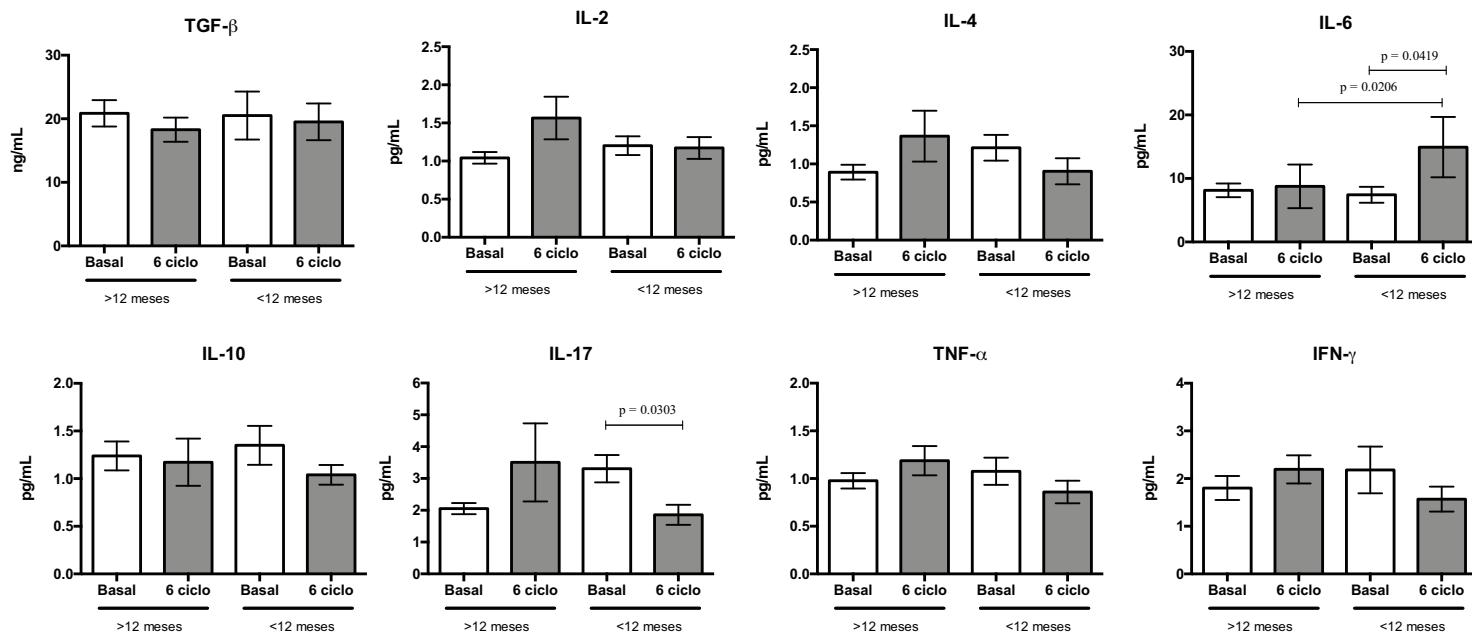


Figura 10. Concentración plasmática de las citocinas estudiadas en pacientes de acuerdo a la sobrevida media.

Pacientes con sobrevida >12 meses n= 25, pacientes con sobrevida <12 meses n=14. Se gráfica la media y el error estándar.

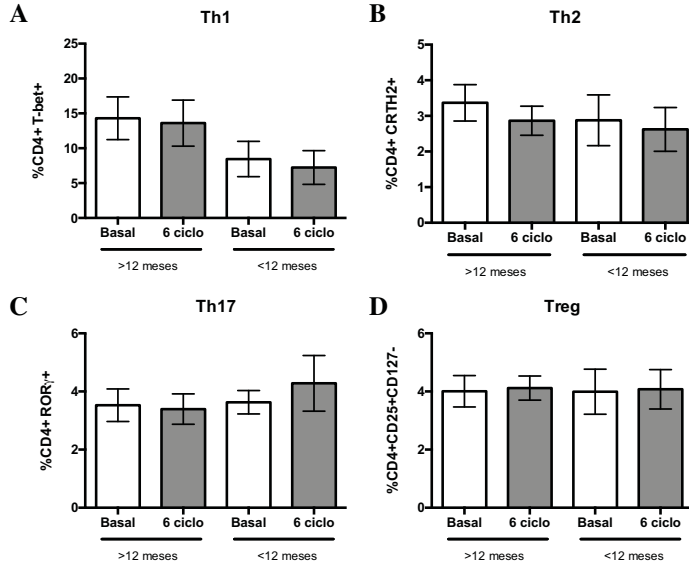


Figura 11. Porcentaje de las subpoblaciones de linfocitos T CD3⁺CD4⁺ en pacientes de acuerdo a la sobrevida media.

A. Linfocitos Th1 (CD4⁺T-bet⁺). **B.** Linfocitos Th2 (CD4⁺CRTH2⁺). **C.** Linfocitos Th17 (CD4⁺ROR-γ⁺). **D.** Linfocitos Treg (CD4⁺CD127⁻CD25⁺). Pacientes con sobrevida >12 meses n= 18, pacientes con sobrevida <12 meses n=10. Se grafica la media y el error estándar.

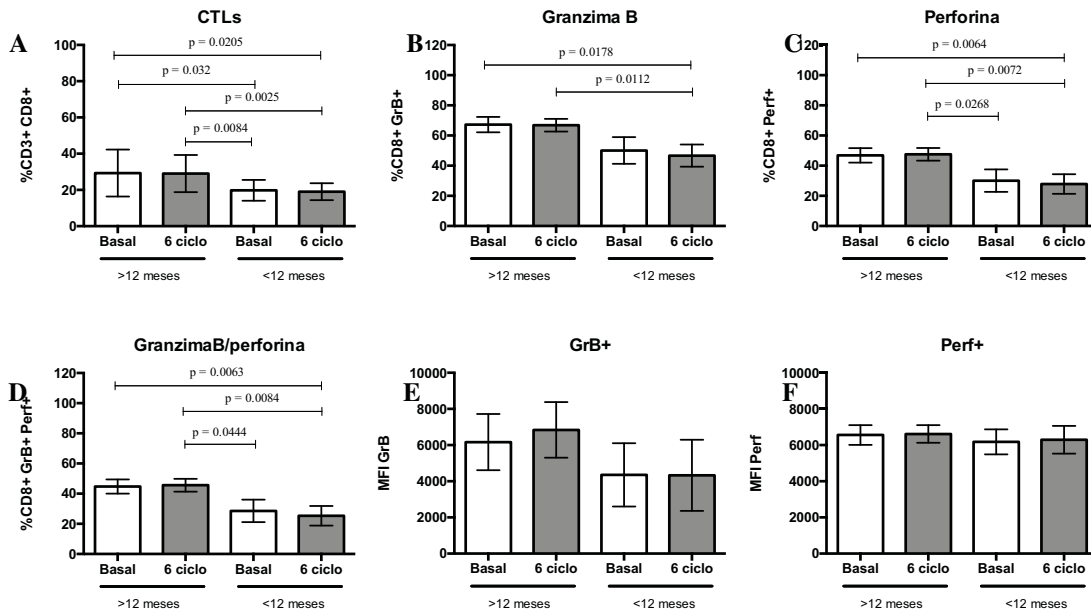


Figura 12. Porcentaje de linfocitos T CD3⁺CD8⁺ (CTLs) y expresión de granzima B y perforina en pacientes de acuerdo a la sobrevida media.

A. Linfocitos T CD8⁺. **B.** CTLs granzima B⁺. **C.** CTLs perforina⁺. **D.** CTLs granzima B⁺perforina⁺. **E.** MFI de granzima B. **F.** MFI de perforina. Pacientes con sobrevida >12 meses n= 18, pacientes con sobrevida <12 meses n=10. Se grafica la media y el error estándar.

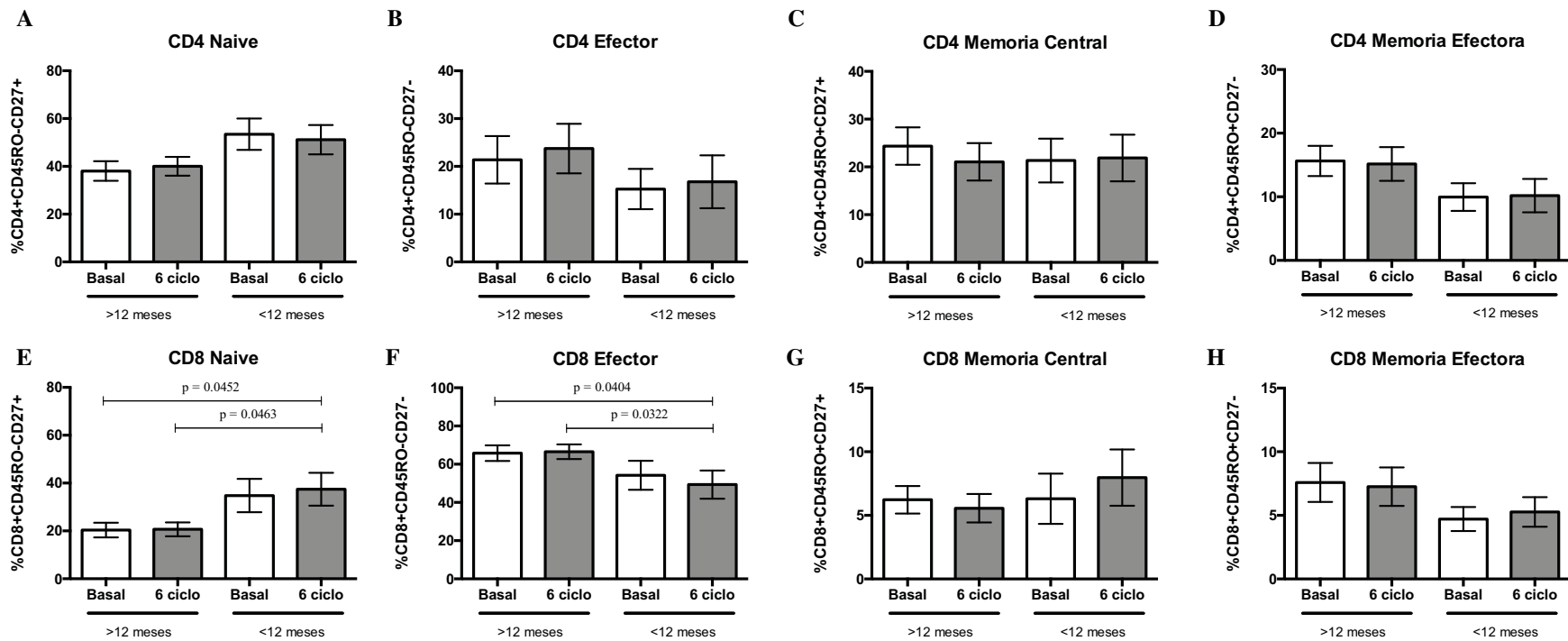


Figura 13. Porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ con fenotipo de memoria, naive y efector en pacientes de acuerdo a la sobrevida media.

Porcentaje de Linfocitos T CD4⁺ con fenotipo naive (A), efector (B), de memoria central (C) y memoria efectora (D). Porcentaje de Linfocitos T CD8⁺ con fenotipo naive (E), efector (F), de memoria central (G) y memoria efectora (H). Pacientes con sobrevida >12 meses n= 18, pacientes con sobrevida <12 meses n=10. Se grafica la media y el error estándar.

Curvas ROC para la determinación del valor de corte y análisis de sobrevida

Finalmente, para definir si la concentración de las citocinas estudiadas, los porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos T, la proporción de CTLs que expresaban granzima B y perforina, así como el fenotipo naive, efector, de memoria central y de memoria efectora, eran factores que se asociaban con la sobrevida de los pacientes, se emplearon las curvas ROC para establecer el valor de corte para cada parámetro estudiado con base a la mejor especificidad y sensibilidad (tabla 1). El grupo de pacientes se dividió en pacientes con valores mayores al valor de corte y pacientes con valores menores al valor de corte y se realizaron las curvas de sobrevida por el método de Kaplan-Meier.

Tabla 1. Valores de corte para cada uno de los parámetros estudiados

Parámetro	Valor de Corte	Especificidad /Sensibilidad	Parámetro	Valor de Corte	Especificidad /Sensibilidad
TGF-b	16.96	100 / 64.1	Granzima B	63.75	71.43 / 57.14
IL-2	0.89	75 / 66.67	Perforina	42.6	57.14 / 57.14
IL-4	0.56	83.33 / 74.36	Granzima B/perforina	39.55	57.14 / 57.14
IL-6	2.35	100 / 92.31	MFI Granzima B	3432	71.43 / 53.57
IL-10	0.68	75 / 79.49	MFI perforina	5646	57.14 / 42.81
IL-17	1.84	62.5 / 61.9	CD4 Naive	52.1	71.43 / 71.43
TNF-a	0.885	60 / 43.59	CD4 Efector	8.7	71.43 / 71.43
IFN-g	0.95	75 / 74.36	CD4 Memoria central	19.95	100 / 50
Th1	8.49	85.71 / 50	CD4 Memoria efectora	14.7	57.19 / 35.7
Th2	3.59	85.71 / 46.43	CD8 Naive	34.75	42.86 / 75
Th17	3.2	100 / 53.57	CD8 Efector	47.8	42.86 / 42.86
Treg	3.45	100 / 46.43	CD8 Memoria central	5.92	71.43 / 57.14
CTLs	25.55	57.14 / 57.14	CD8 Memoria efectora	4.53	57.14 / 53.57

En el caso de las citocinas, la sobrevida tendió a ser mayor en el grupo de pacientes con valores superiores al valor de corte para IL-2, mientras que para TGF- β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ la sobrevida fue similar en ambos grupos de pacientes (figura 14).

Para los porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos Th1, Th2, Th17 y Treg, la sobrevida fue similar en ambos grupos de pacientes (figura 15).

En el grupo de pacientes con valores mayores al valor de corte para el porcentaje de CTLs y el porcentaje de CTLs que expresaban granzima B, la sobrevida tendió a ser mayor, mientras que para el porcentaje de CTLs que expresaban perforina o ambas moléculas, la sobrevida fue significativamente mayor (figura 16).

Finalmente, para los porcentajes de linfocitos T CD4⁺ con fenotipo naive, efector, de memoria central y de memoria efectora, la sobrevida fue similar en ambos grupos de pacientes. En cuanto a los linfocitos T CD8⁺, en el grupo de pacientes con valores mayores al valor de corte para el porcentaje con fenotipo efector y de memoria efectora la sobrevida tendió a ser mayor, mientras que para el porcentaje con fenotipo naive la sobrevida fue significativamente menor (figura 17).

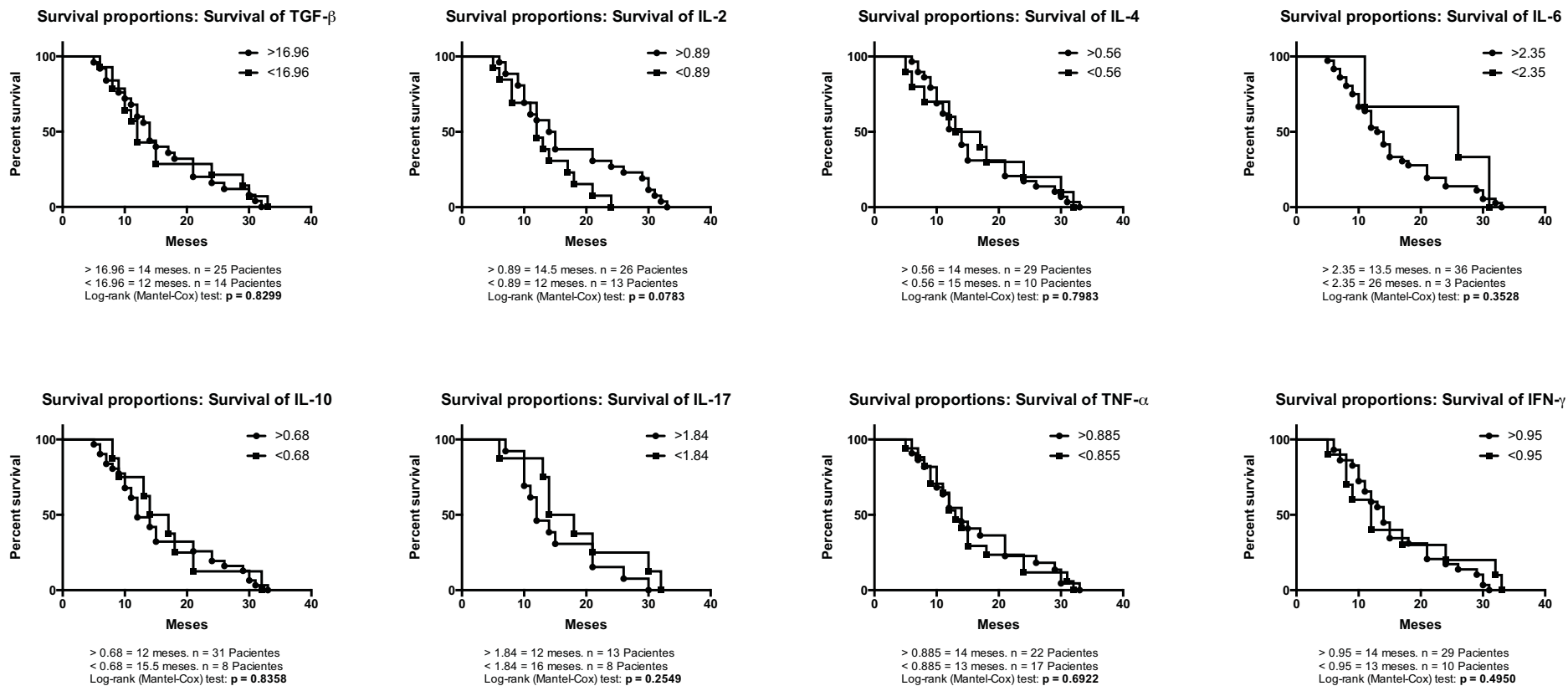


Figura 14. Curvas de Kaplan-Meier para la concentración plasmática de las citocinas estudiadas en el grupo de pacientes.

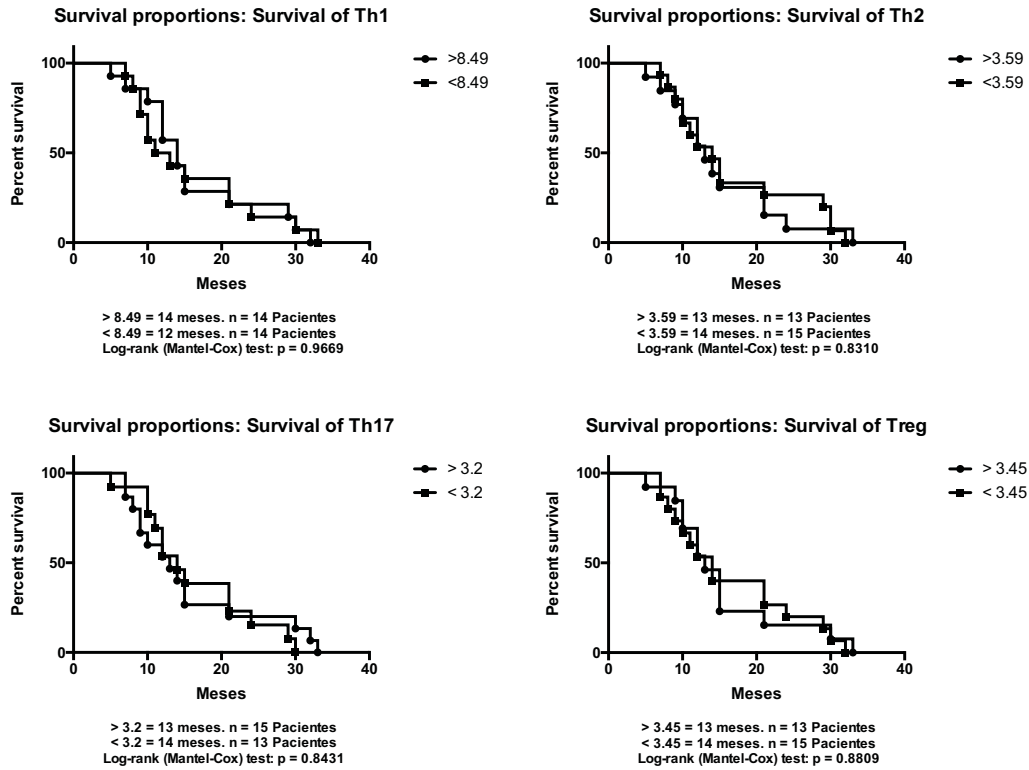


Figura 15. Curvas de Kaplan-Meier para el porcentaje de linfocitos Th1, Th2, Th17 y Treg.

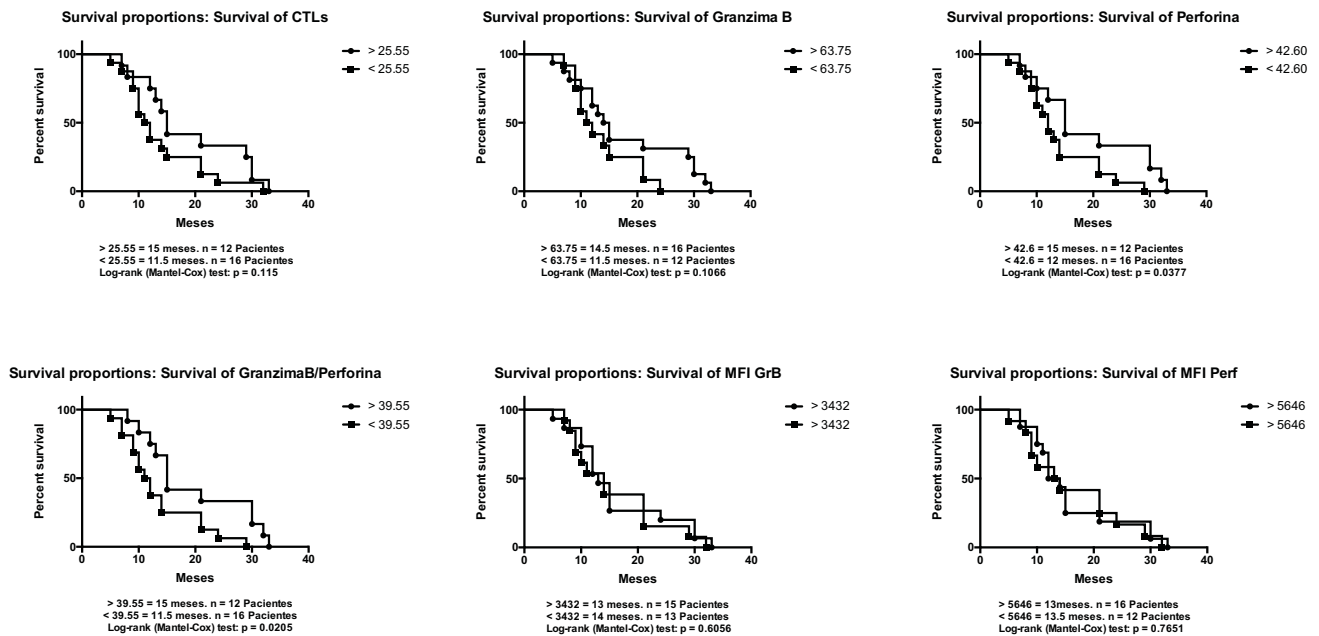


Figura 16. Curvas de Kaplan-Meier para el porcentaje de linfocitos T CD8+ y expresión de granzima B y perforina.

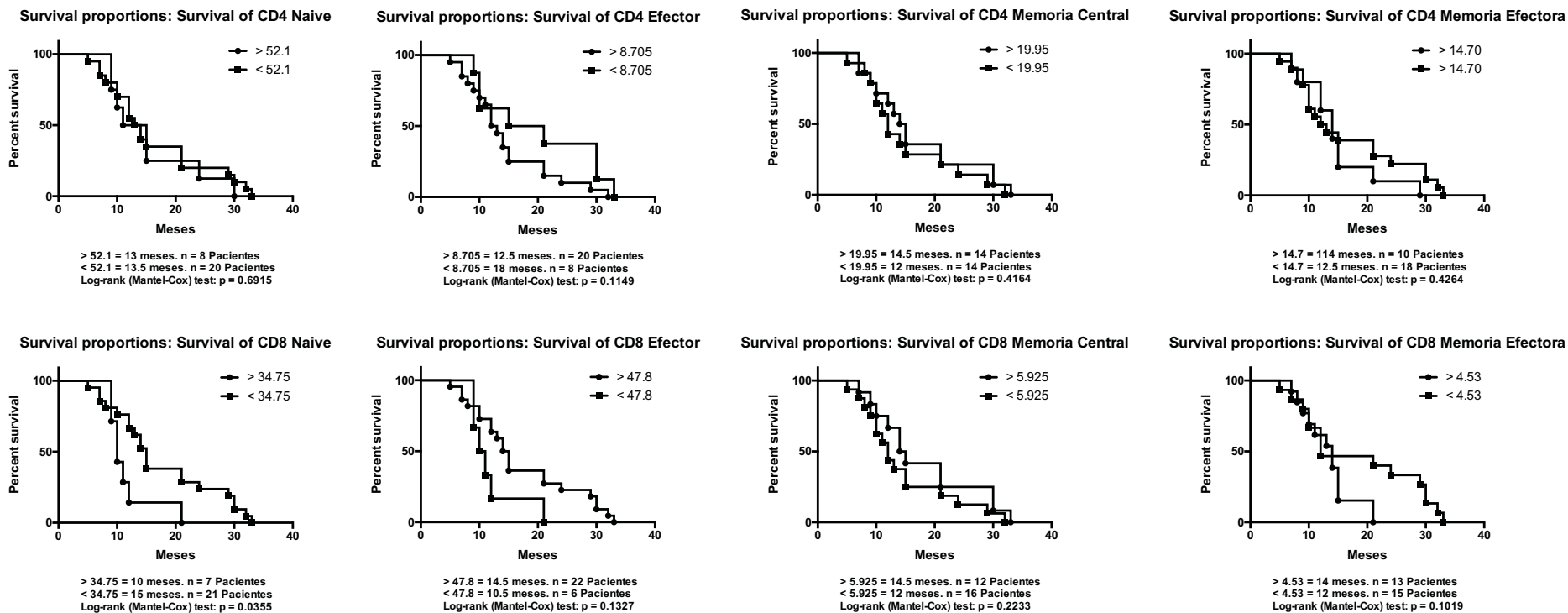


Figura 17. Curvas de Kaplan-Meier para el porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+ con fenotipo naive, efector, de memoria central y de memoria efectora.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo, evaluamos la concentración de citocinas solubles, así como subpoblaciones de linfocitos T en pacientes con adenocarcinoma pulmonar y los comparamos con sujetos sanos fumadores y sujetos sanos no fumadores. Decidimos incluir el grupo de sujetos sanos fumadores, debido a que el hábito tabáquico se considera factor de riesgo para el desarrollo de cáncer pulmonar^{7, 8}. A pesar de que se ha reportado que el hábito tabáquico se asocia a un proceso inflamatorio crónico⁸, no encontramos diferencias entre las concentraciones de citocinas como la IL-17 o IL-6 entre sujetos sanos fumadores y no fumadores, sin embargo, nuestros resultados muestran un ligero incremento en el porcentaje de linfocitos Th17, así como mayor producción de IL-17 intracelular. Estas células podrían favorecer un estado de inflamación crónica que afecta la proporción de linfocitos T CD8⁺ con fenotipo efector, lo que se ve reflejado en una mayor proporción de linfocitos T CD8⁺ con fenotipo de memoria en los sujetos sanos fumadores.

Por otra parte, estudios previos en pacientes con cáncer pulmonar han evaluado citocinas pro y anti-inflamatorias, así como algunas subpoblaciones de linfocitos T (principalmente Th17 y Treg)^{90, 91, 139, 140, 141, 142}. Nuestros resultados mostraron incremento significativo tanto de citocinas pro inflamatorias (IL-2 e IL-6) como citocinas anti inflamatorias (TGF- β , IL-4 e IL10), con respecto a los grupos de sujetos sanos fumadores y no fumadores. La IL-6 se ha asociado generalmente a una respuesta inflamatoria²³, sin embargo, el incremento de esta citocina en NSCLC se ha asociado con progresión tumoral y pobre pronóstico^{54, 143}. En cuanto al TGF- β , esta molécula se considera el principal factor inmunosupresor de la respuesta inmunológica³⁵ y su incremento se ha asociado a un pobre pronóstico en distintos tipos de cáncer, incluido el cáncer pulmonar³⁷. Además, la IL-6 y TGF- β son factores solubles que promueven la diferenciación de linfocitos Th17^{60, 85}, y podrían ser los responsables del incremento tanto del porcentaje de esta subpoblación como la producción de IL-17 intracelular detectados en este estudio. El incremento de esta

subpoblación podría favorecer el mantenimiento de un estado de inflamación crónica que afecte a distintas poblaciones de células de la respuesta inmunológica o bien favorezca la progresión tumoral.

Asimismo, en el grupo de pacientes detectamos un incremento en el porcentaje de linfocitos Treg, este incremento puede ser debido a que, por una parte se ha reportado que la IL-2 en presencia de TGF- β puede promover la generación y diferenciación de células Treg en cáncer pulmonar¹⁴⁴ y el incremento de IL-4 e IL-10 detectado también pueden favorecer la presencia de los linfocitos Treg^{53, 95}. Observamos que estos linfocitos Treg no expresaron IL-10 en nuestras condiciones de estímulo, pero la expresión de LAP TGF- β , una molécula de membrana con una potente actividad inhibitoria^{145, 146} podría ser un mecanismo importante para llevar a cabo su función efectora y de esta manera inhibir la respuesta inmunológica anti-tumoral en los pacientes con cáncer de pulmón por lo que es necesario estudiar si esta población de células Treg tienen la capacidad de bloquear a los linfocitos efectores.

A pesar del perfil de citocinas tipo Th2 (IL-4, IL-6, IL-10), el incremento de linfocitos Th17 y linfocitos Treg detectados en los pacientes con adenocarcinoma pulmonar, observamos que el porcentaje de linfocitos Th1 tendió a incrementar y los linfocitos T CD4⁺ presentaron un alto porcentaje con fenotipo efector. Además, el porcentaje de linfocitos T CD8⁺, así como la expresión de granzima B y perforina fue similar al de los sujetos sanos no fumadores. Estos resultados podrían sugerir que los pacientes mantienen la capacidad de montar una respuesta inmunológica. Son necesarios estudios para demostrar si estos linfocitos son capaces de responder a antígenos asociados a tumor.

Tratamiento, sistema inmunológico y sobrevida

Como se mencionó anteriormente, además de la inducción de ICD, varios fármacos quimioterapéuticos pueden favorecer la participación de la respuesta inmunológica

incrementando la expresión de moléculas de clase I del HLA¹²⁰, induciendo la producción de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas^{108, 123, 124}, o bien, disminuyendo la proporción de poblaciones con características inmunosupresoras^{122, 127, 128, 131}, por lo que diversos grupos de investigación han evaluado algunos parámetros de la respuesta inmunológica durante el tratamiento por quimioterapia, asociándolos con respuesta al tratamiento e incremento en la sobrevida total^{147, 148, 149}.

En nuestro estudio, evaluamos tanto la concentración de citocinas pro y anti-inflamatorias, así como subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y su fenotipo naive, efector y de memoria a lo largo del tratamiento a base de compuestos platinados (cisplatino/carboplatino) y taxanos (paclitaxel/docetaxel), a fin de evaluar si el tratamiento inducía cambios en alguno de estos parámetros y finalmente evaluar si estos se asociaban o no a la sobrevida de los pacientes.

Observamos que, en el caso de las citocinas estudiadas, la IL-2 e IL-6 mostraron una ligera tendencia a incrementar su concentración al sexto ciclo. En el caso de la IL-2 se ha reportado que puede ser un posible marcador de respuesta al tratamiento¹⁵⁰, mientras que la IL-6 se asocia a un mal pronóstico³⁷. A pesar de que se ha reportado que en NSCLC el tratamiento con cisplatino y paclitaxel disminuyen la proporción de células Treg^{128, 131}, no observamos diferencias entre los porcentajes de esta subpoblación a lo largo del tratamiento. Además, tampoco observamos diferencias entre los porcentajes de las demás subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺, así como tampoco encontramos diferencias en el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ y la proporción de los fenotipos naive, efector y de memoria. Debido a lo anterior, se realizó el análisis considerando la sobrevida media del grupo de pacientes, la cual fue de 12 meses.

Observamos que los pacientes con sobrevida mayor a 12 meses tendieron a incrementar la concentración de IL-2, IL-4, IL-17, TNF- α e IFN- γ al sexto ciclo de

tratamiento, mientras que el grupo con menor sobrevida incremento la concentración de IL-6 y tendió a disminuir la concentración de TNF- α e IFN- γ . La diferencia en el perfil de citocinas entre los grupos de pacientes podría explicar el mayor porcentaje de linfocitos Th1, y la mayor proporción de linfocitos T CD4⁺ con fenotipo efector detectado en el grupo de pacientes con mayor sobrevida.

Observamos que, en los pacientes con sobrevida mayor a 12 meses, los porcentajes de linfocitos T CD8⁺, la proporción de CTLs que expresaba granzima B y perforina, así como la proporción de linfocitos T CD8⁺ con fenotipo efector, fueron significativamente mayores con respecto a los pacientes con sobrevida menor a 12 meses, esta diferencia se observó tanto a nivel basal como antes del sexto ciclo de tratamiento, por lo que podemos sugerir que la presencia de linfocitos Th1 y el perfil de citocinas pro inflamatorio podría estar favoreciendo la presencia y activación de linfocitos T CD8⁺, así como la producción de granzima B y perforinas. En el caso de la IL-17 detectada, esta citocina podría estar llevando a cabo una función anti-tumoral favoreciendo la activación de los linfocitos T CD8⁺. Además, la IL-4 puede incrementar la citotoxicidad de los linfocitos T CD8⁺¹⁴² y en presencia de TNF- α favorecer la activación del endotelio, incrementando su permeabilidad y facilitando la infiltración por parte de las células del sistema inmunológico¹⁴².

Finalmente, para definir si los parámetros estudiados se asociaban o no a la sobrevida total de los pacientes, empleamos el método de Kaplan-Meier para el análisis de sobrevida. Como se mencionó anteriormente, la IL-2 se ha propuesto como un posible marcador de respuesta al tratamiento¹⁵⁰, sin embargo, no fue un factor que se asociará a la sobrevida total de nuestro grupo de pacientes. A pesar de que, como ya se ha mencionado, la IL-6 es un marcador asociado a mal pronóstico³⁷, nuestro análisis no mostró asociación con la sobrevida. Esto puede ser debido a que al establecer el punto de corte empleando curvas ROC, el grupo con una baja concentración de IL-6 presentaba una n pequeña.

Por otra parte, el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ que expresaban granzima B y perforina, así como el fenotipo naive de los linfocitos T CD8⁺ fueron parámetros asociados a la sobrevida total de los pacientes, por lo que estos parámetros pueden ser considerados marcadores pronósticos.

En conclusión, con los resultados obtenidos podemos sugerir que los pacientes que presentaron una sobrevida mayor a la media, presentan una mejor “calidad” en su sistema inmunológico antes de iniciar el tratamiento, por lo que podrían estar respondiendo mejor a dicho tratamiento.

CONCLUSIONES

Previo al tratamiento, el grupo de pacientes estudiados presenta un perfil de citocinas tipo Th2. El fenotipo de los linfocitos T CD4⁺ fue principalmente efector y las subpoblaciones de linfocitos Th17 y Treg incrementaron con respecto a los sujetos sanos no fumadores. El porcentaje de linfocitos T CD8⁺ y la proporción de CTLs que expresaron granzima B y perforina mantuvieron una proporción similar a la de los sujetos sanos no fumadores.

El tratamiento por quimioterapia convencional a base de cisplatino y paclitaxel no modificó los parámetros evaluados a lo largo del tratamiento en el grupo total de pacientes.

Los pacientes con sobrevida menor a 12 meses presentaron un incremento en la concentración de IL-6, mientras que los pacientes con sobrevida mayor a 12 meses tendieron a modificar el perfil de citocinas hacia un perfil pro-inflamatorio.

Los pacientes con sobrevida mayor a 12 meses presentaron un porcentaje mayor de linfocitos T CD8⁺, así como una mayor proporción de CTLs que expresaron granzima B y perforina con respecto a los pacientes con sobrevida menor a 12 meses desde condiciones basales.

La proporción de linfocitos T CD8⁺ con fenotipo naive y con fenotipo efector fue mayor y menor, respectivamente, en el grupo de pacientes con sobrevida menor a 12 meses con respecto al grupo de pacientes con sobrevida mayor a 12 meses.

Con base a los valores de corte calculados para nuestro estudio, la expresión de perforina, la co-expresión de granzima B y perforina en los CTLs, así como el fenotipo naive de los linfocitos T CD8⁺ fueron parámetros que se asociaron con la sobrevida total.

LITERATURA CITADA

1. Siegel, R., Ma, J., Zou, Z. & Jemal, A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* **64**, 9-29 (2014).
2. Lazcano Ponce, E.C., Tovar Guzman, V., Meneses Gonzalez, F., Rascon Pacheco, R.A. & Hernandez Avila, M. Trends of lung cancer mortality in Mexico. *Arch Med Res* **28**, 565-570 (1997).
3. Medina, F.M. *et al.* Primary lung cancer in Mexico city: a report of 1019 cases. *Lung Cancer* **14**, 185-193 (1996).
4. Ruiz-Godoy, L. *et al.* Mortality due to lung cancer in Mexico. *Lung Cancer* **58**, 184-190 (2007).
5. Aldaco-Sarvide, F., Perez-Perez, P., Cervantes-Sanchez, G., Torrecillas-Torres, L. & Erazo-V, A.E. Mortalidad por cáncer en México 2000-2010: el recuento de los daños. *GAMO* **11**, 371-379 (2012).
6. Brambilla, E., Travis, W.D., Colby, T.V., Corrin, B. & Shimosato, Y. The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J* **18**, 1059-1068 (2001).
7. Malhotra, J., Malvezzi, M., Negri, E., La Vecchia, C. & Boffetta, P. Risk factors for lung cancer worldwide. *Eur Respir J* **48**, 889-902 (2016).
8. Walser, T. *et al.* Smoking and lung cancer: the role of inflammation. *Proc Am Thorac Soc* **5**, 811-815 (2008).
9. Davila, D.G. & Williams, D.E. The etiology of lung cancer. *Mayo Clin Proc* **68**, 170-182 (1993).
10. Hecht, S.S. Smoking and lung cancer--a new role for an old toxicant? *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15725-15726 (2006).
11. Gazdar, A.F. & Minna, J.D. Cigarettes, sex, and lung adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* **89**, 1563-1565 (1997).
12. Zochbauer-Muller, S., Gazdar, A.F. & Minna, J.D. Molecular pathogenesis of lung cancer. *Annu Rev Physiol* **64**, 681-708 (2002).
13. Berman, D.W. & Crump, K.S. A meta-analysis of asbestos-related cancer risk that addresses fiber size and mineral type. *Crit Rev Toxicol* **38 Suppl 1**, 49-73 (2008).
14. Spyrtatos, D. *et al.* Occupational exposure and lung cancer. *J Thorac Dis* **5 Suppl 4**, S440-445 (2013).
15. Minna, J.D., Roth, J.A. & Gazdar, A.F. Focus on lung cancer. *Cancer Cell* **1**, 49-52 (2002).
16. Weinberg, R.A. How cancer arises. *Sci Am* **275**, 62-70 (1996).
17. Barrett, J.C. Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environ Health Perspect* **100**, 9-20 (1993).
18. Gatenby, R.A. & Gillies, R.J. A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* **8**, 56-61 (2008).
19. Lantuejoul, S., Salameire, D., Salon, C. & Brambilla, E. Pulmonary preneoplasia--sequential molecular carcinogenetic events. *Histopathology* **54**, 43-54 (2009).
20. Coussens, L.M. & Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860-867 (2002).
21. Balkwill, F. & Mantovani, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* **357**, 539-545 (2001).
22. Aggarwal, B.B., Shishodia, S., Sandur, S.K., Pandey, M.K. & Sethi, G. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol* **72**, 1605-1621 (2006).
23. Landskron, G., De la Fuente, M., Thuwajit, P., Thuwajit, C. & Hermoso, M.A. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res* **2014**, 149185 (2014).
24. de Visser, K.E., Eichten, A. & Coussens, L.M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* **6**, 24-37 (2006).
25. Lakshmi Narendra, B., Eshvendar Reddy, K., Shantikumar, S. & Ramakrishna, S. Immune system: a double-edged sword in cancer. *Inflamm Res* **62**, 823-834 (2013).

26. Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J. & Schreiber, R.D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* **3**, 991-998 (2002).
27. Dunn, G.P., Old, L.J. & Schreiber, R.D. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* **22**, 329-360 (2004).
28. Swann, J.B. & Smyth, M.J. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest* **117**, 1137-1146 (2007).
29. Kim, R., Emi, M. & Tanabe, K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* **121**, 1-14 (2007).
30. Ostrand-Rosenberg, S. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Curr Opin Genet Dev* **18**, 11-18 (2008).
31. Mittal, D., Gubin, M.M., Schreiber, R.D. & Smyth, M.J. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol* **27**, 16-25 (2014).
32. Zamai, L. *et al.* NK cells and cancer. *J Immunol* **178**, 4011-4016 (2007).
33. Stewart, T.J. & Abrams, S.I. How tumours escape mass destruction. *Oncogene* **27**, 5894-5903 (2008).
34. Kim, R., Emi, M. & Tanabe, K. Cancer immunosuppression and autoimmune disease: beyond immunosuppressive networks for tumour immunity. *Immunology* **119**, 254-264 (2006).
35. Rabinovich, G.A., Gabrilovich, D. & Sotomayor, E.M. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* **25**, 267-296 (2007).
36. Akdis, M. *et al.* Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol* **127**, 701-721 e701-770 (2011).
37. Lippitz, B.E. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *Lancet Oncol* **14**, e218-228 (2013).
38. Hodge, G. *et al.* Lung cancer is associated with decreased expression of perforin, granzyme B and interferon (IFN)-gamma by infiltrating lung tissue T cells, natural killer (NK) T-like and NK cells. *Clin Exp Immunol* **178**, 79-85 (2014).
39. Matanic, D. *et al.* Cytokines in patients with lung cancer. *Scand J Immunol* **57**, 173-178 (2003).
40. Lopez-Gonzalez, J.S. *et al.* Lung carcinomas decrease the number of monocytes/macrophages (CD14+ cells) that produce TNF-alpha. *Clin Immunol* **122**, 323-329 (2007).
41. Stathopoulos, G.T. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha promotes malignant pleural effusion. *Cancer Res* **67**, 9825-9834 (2007).
42. Hao, N.B. *et al.* Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol* **2012**, 948098 (2012).
43. Jaillon, S. *et al.* Neutrophils in innate and adaptive immunity. *Semin Immunopathol* **35**, 377-394 (2013).
44. Holmstrom, K.M. & Finkel, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 411-421 (2014).
45. Kono, H., Onda, A. & Yanagida, T. Molecular determinants of sterile inflammation. *Curr Opin Immunol* **26**, 147-156 (2014).
46. Sansone, P. & Bromberg, J. Environment, inflammation, and cancer. *Curr Opin Genet Dev* **21**, 80-85 (2011).
47. Hallett, W.H. & Murphy, W.J. Natural killer cells: biology and clinical use in cancer therapy. *Cell Mol Immunol* **1**, 12-21 (2004).
48. Andersen, M.H., Schrama, D., Thor Straten, P. & Becker, J.C. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol* **126**, 32-41 (2006).
49. Nelson, B.H. IL-2, regulatory T cells, and tolerance. *J Immunol* **172**, 3983-3988 (2004).

50. Schmidt, A., Oberle, N. & Krammer, P.H. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Front Immunol* **3**, 51 (2012).
51. Burkholder, B. *et al.* Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. *Biochim Biophys Acta* **1845**, 182-201 (2014).
52. Annunziato, F. & Romagnani, S. Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. *Arthritis Res Ther* **11**, 257 (2009).
53. Skapenko, A., Kalden, J.R., Lipsky, P.E. & Schulze-Koops, H. The IL-4 receptor alpha-chain-binding cytokines, IL-4 and IL-13, induce forkhead box P3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells from CD25-CD4+ precursors. *J Immunol* **175**, 6107-6116 (2005).
54. Chang, Q., Daly, L. & Bromberg, J. The IL-6 feed-forward loop: a driver of tumorigenesis. *Semin Immunol* **26**, 48-53 (2014).
55. Waugh, D.J. & Wilson, C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* **14**, 6735-6741 (2008).
56. Jiang, S. & Dong, C. A complex issue on CD4(+) T-cell subsets. *Immunol Rev* **252**, 5-11 (2013).
57. Zeng, L., O'Connor, C., Zhang, J., Kaplan, A.M. & Cohen, D.A. IL-10 promotes resistance to apoptosis and metastatic potential in lung tumor cell lines. *Cytokine* **49**, 294-302 (2010).
58. Llanes-Fernandez, L. *et al.* Relationship between IL-10 and tumor markers in breast cancer patients. *Breast* **15**, 482-489 (2006).
59. Reynolds, J.M., Angkasekwinai, P. & Dong, C. IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* **21**, 413-423 (2010).
60. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V.K. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* **27**, 485-517 (2009).
61. Murugaiyan, G. & Saha, B. Protumor vs antitumor functions of IL-17. *J Immunol* **183**, 4169-4175 (2009).
62. Tirado-Rodriguez, B., Ortega, E., Segura-Medina, P. & Huerta-Yepez, S. TGF- beta: an important mediator of allergic disease and a molecule with dual activity in cancer development. *J Immunol Res* **2014**, 318481 (2014).
63. Khalil, N. TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect* **1**, 1255-1263 (1999).
64. Han, G., Li, F., Singh, T.P., Wolf, P. & Wang, X.J. The pro-inflammatory role of TGFbeta1: a paradox? *Int J Biol Sci* **8**, 228-235 (2012).
65. Peralta-Zaragoza, O., Lagunas-Martinez, A. & Madrid-Marina, V. [Transforming growth factor beta-1: structure, function, and regulation mechanisms in cancer]. *Salud Publica Mex* **43**, 340-351 (2001).
66. Lee, Y.K., Mukasa, R., Hatton, R.D. & Weaver, C.T. Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. *Curr Opin Immunol* **21**, 274-280 (2009).
67. Alevizakos, M., Kaltsas, S. & Syrigos, K.N. The VEGF pathway in lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* **72**, 1169-1181 (2013).
68. Zhang, Y. *et al.* Detection of circulating vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9 in non-small cell lung cancer using Luminex multiplex technology. *Oncol Lett* **7**, 499-506 (2014).
69. Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S.H., Zitvogel, L. & Vivier, E. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* **106**, 2252-2258 (2005).
70. Al Omar, S.Y., Marshall, E., Middleton, D. & Christmas, S.E. Increased killer immunoglobulin-like receptor expression and functional defects in natural killer cells in lung cancer. *Immunology* **133**, 94-104 (2011).
71. Fridlender, Z.G. & Albelda, S.M. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis* **33**, 949-955 (2012).

72. Almatroodi, S.A., McDonald, C.F., Darby, I.A. & Pouniotis, D.S. Characterization of M1/M2 Tumour-Associated Macrophages (TAMs) and Th1/Th2 Cytokine Profiles in Patients with NSCLC. *Cancer Microenviron* **9**, 1-11 (2016).
73. Quatromoni, J.G. & Eruslanov, E. Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. *Am J Transl Res* **4**, 376-389 (2012).
74. Mantovani, A. & Sica, A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol* **22**, 231-237 (2010).
75. Banchereau, J. *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**, 767-811 (2000).
76. Radford, K.J., Tullett, K.M. & Lahoud, M.H. Dendritic cells and cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* **27**, 26-32 (2014).
77. Bennaceur, K., Chapman, J.A., Touraine, J.L. & Portoukalian, J. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their effect in dendritic cells. *Biochim Biophys Acta* **1795**, 16-24 (2009).
78. Fricke, I. & Gabrilovich, D.I. Dendritic cells and tumor microenvironment: a dangerous liaison. *Immunol Invest* **35**, 459-483 (2006).
79. Zamarron, B.F. & Chen, W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *Int J Biol Sci* **7**, 651-658 (2011).
80. Huang, B. *et al.* Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res* **66**, 1123-1131 (2006).
81. Zhou, L., Chong, M.M. & Littman, D.R. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* **30**, 646-655 (2009).
82. Kolls, J.K. CD4(+) T-cell subsets and host defense in the lung. *Immunol Rev* **252**, 156-163 (2013).
83. Lai, Y.-P., Jeng, C.-J. & Chen, S.-C. The Roles of CD4+ T Cells in Tumor Immunity. *ISRN Immunology* **2011**, 6 (2011).
84. Okamoto, M. *et al.* T-helper type 1/T-helper type 2 balance in malignant pleural effusions compared to tuberculous pleural effusions. *Chest* **128**, 4030-4035 (2005).
85. Zou, W. & Restifo, N.P. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **10**, 248-256 (2010).
86. Wilke, C.M. *et al.* Th17 cells in cancer: help or hindrance? *Carcinogenesis* **32**, 643-649 (2011).
87. Hamai, A. *et al.* Human T(H)17 immune cells specific for the tumor antigen MAGE-A3 convert to IFN-gamma-secreting cells as they differentiate into effector T cells in vivo. *Cancer Res* **72**, 1059-1063 (2012).
88. Martin-Orozco, N. *et al.* T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity* **31**, 787-798 (2009).
89. Chen, X. *et al.* Increased IL-17-producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients. *Lung Cancer* **69**, 348-354 (2010).
90. Woo, E.Y. *et al.* Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* **61**, 4766-4772 (2001).
91. Wolf, A.M. *et al.* Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res* **9**, 606-612 (2003).
92. Duan, M.C., Zhong, X.N., Liu, G.N. & Wei, J.R. The Treg/Th17 paradigm in lung cancer. *J Immunol Res* **2014**, 730380 (2014).
93. Ha, T.Y. The role of regulatory T cells in cancer. *Immune Netw* **9**, 209-235 (2009).
94. Facciabene, A., Motz, G.T. & Coukos, G. T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer Res* **72**, 2162-2171 (2012).
95. Hsu, P. *et al.* IL-10 Potentiates Differentiation of Human Induced Regulatory T Cells via STAT3 and Foxo1. *J Immunol* **195**, 3665-3674 (2015).

96. Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C.M. & Hafler, D.A. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* **10**, 490-500 (2010).
97. Vignali, D.A., Collison, L.W. & Workman, C.J. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* **8**, 523-532 (2008).
98. Whiteside, T.L. The role of regulatory T cells in cancer immunology. *Immunotargets Ther* **4**, 159-171 (2015).
99. Russell, J.H. & Ley, T.J. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* **20**, 323-370 (2002).
100. Prado-Garcia, H., Romero-Garcia, S., Aguilar-Cazares, D., Meneses-Flores, M. & Lopez-Gonzalez, J.S. Tumor-induced CD8+ T-cell dysfunction in lung cancer patients. *Clin Dev Immunol* **2012**, 741741 (2012).
101. Domagala-Kulawik, J. The role of the immune system in non-small cell lung carcinoma and potential for therapeutic intervention. *Transl Lung Cancer Res* **4**, 177-190 (2015).
102. Prado-Garcia, H., Aguilar-Cazares, D., Meneses-Flores, M., Morales-Fuentes, J. & Lopez-Gonzalez, J.S. Lung carcinomas do not induce T-cell apoptosis via the Fas/Fas ligand pathway but down-regulate CD3 epsilon expression. *Cancer Immunol Immunother* **57**, 325-336 (2008).
103. Collins, L.G., Haines, C., Perkel, R. & Enck, R.E. Lung cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician* **75**, 56-63 (2007).
104. Zarogoulidis, K. *et al.* Treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Thorac Dis* **5 Suppl 4**, S389-396 (2013).
105. Molina, J.R., Yang, P., Cassivi, S.D., Schild, S.E. & Adjei, A.A. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc* **83**, 584-594 (2008).
106. Zappa, C. & Mousa, S.A. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res* **5**, 288-300 (2016).
107. Rossi, A. & Di Maio, M. Platinum-based chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: optimal number of treatment cycles. *Expert Rev Anticancer Ther* **16**, 653-660 (2016).
108. Javeed, A. *et al.* Paclitaxel and immune system. *Eur J Pharm Sci* **38**, 283-290 (2009).
109. Dasari, S. & Tchounwou, P.B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* **740**, 364-378 (2014).
110. Fennell, D.A. *et al.* Cisplatin in the modern era: The backbone of first-line chemotherapy for non-small cell lung cancer. *Cancer Treat Rev* **44**, 42-50 (2016).
111. Jordan, M.A. & Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* **4**, 253-265 (2004).
112. Markman, M. Managing taxane toxicities. *Support Care Cancer* **11**, 144-147 (2003).
113. Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O. & Zitvogel, L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol* **31**, 51-72 (2013).
114. Garg, A.D. *et al.* Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochim Biophys Acta* **1805**, 53-71 (2010).
115. Bianchi, M.E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* **81**, 1-5 (2007).
116. Krysko, O., Love Aaes, T., Bachert, C., Vandenabeele, P. & Krysko, D.V. Many faces of DAMPs in cancer therapy. *Cell Death Dis* **4**, e631 (2013).
117. Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F. & Kroemer, G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol* **8**, 59-73 (2008).
118. Galluzzi, L., Senovilla, L., Zitvogel, L. & Kroemer, G. The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* **11**, 215-233 (2012).

119. Galluzzi, L., Buque, A., Kepp, O., Zitvogel, L. & Kroemer, G. Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. *Cancer Cell* **28**, 690-714 (2015).
120. Liu, W.M., Fowler, D.W., Smith, P. & Dalgleish, A.G. Pre-treatment with chemotherapy can enhance the antigenicity and immunogenicity of tumours by promoting adaptive immune responses. *Br J Cancer* **102**, 115-123 (2010).
121. Nowak, A.K. *et al.* Induction of tumor cell apoptosis in vivo increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor-specific CD8 T cells. *J Immunol* **170**, 4905-4913 (2003).
122. Vincent, J. *et al.* 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res* **70**, 3052-3061 (2010).
123. Niiya, M. *et al.* Induction of TNF-alpha, uPA, IL-8 and MCP-1 by doxorubicin in human lung carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* **52**, 391-398 (2003).
124. Geller, M.A., Bui-Nguyen, T.M., Rogers, L.M. & Ramakrishnan, S. Chemotherapy induces macrophage chemoattractant protein-1 production in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* **20**, 918-925 (2010).
125. Ghiringhelli, F. *et al.* Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* **56**, 641-648 (2007).
126. Medina-Echeverez, J. *et al.* Successful colon cancer eradication after chemoimmunotherapy is associated with profound phenotypic change of intratumoral myeloid cells. *J Immunol* **186**, 807-815 (2011).
127. Kodumudi, K.N. *et al.* A novel chemoimmunomodulating property of docetaxel: suppression of myeloid-derived suppressor cells in tumor bearers. *Clin Cancer Res* **16**, 4583-4594 (2010).
128. Zhu, Y., Liu, N., Xiong, S.D., Zheng, Y.J. & Chu, Y.W. CD4+Foxp3+ regulatory T-cell impairment by paclitaxel is independent of toll-like receptor 4. *Scand J Immunol* **73**, 301-308 (2011).
129. Lesterhuis, W.J. *et al.* Platinum-based drugs disrupt STAT6-mediated suppression of immune responses against cancer in humans and mice. *J Clin Invest* **121**, 3100-3108 (2011).
130. Merritt, R.E., Mahtabifard, A., Yamada, R.E., Crystal, R.G. & Korst, R.J. Cisplatin augments cytotoxic T-lymphocyte-mediated antitumor immunity in poorly immunogenic murine lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* **126**, 1609-1617 (2003).
131. Chen, C. *et al.* Suppressive effects of gemcitabine plus cisplatin chemotherapy on regulatory T cells in nonsmall-cell lung cancer. *J Int Med Res* **43**, 180-187 (2015).
132. Ramakrishnan, R. *et al.* Chemotherapy enhances tumor cell susceptibility to CTL-mediated killing during cancer immunotherapy in mice. *J Clin Invest* **120**, 1111-1124 (2010).
133. Prado-Garcia, H., Aguilar-Cazares, D., Flores-Vergara, H., Mandoki, J.J. & Lopez-Gonzalez, J.S. Effector, memory and naive CD8+ T cells in peripheral blood and pleural effusion from lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer* **47**, 361-371 (2005).
134. Prado-Garcia, H., Romero-Garcia, S., Morales-Fuentes, J., Aguilar-Cazares, D. & Lopez-Gonzalez, J.S. 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* **61**, 1065-1080 (2012).
135. Lopez-Gonzalez, J.S. *et al.* Lack of correlation between growth inhibition by TGF-beta and the percentage of cells expressing type II TGF-beta receptor in human non-small cell lung carcinoma cell lines. *Lung Cancer* **38**, 149-158 (2002).
136. Avila-Moreno, F. *et al.* Lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma cell lines use different mediators to induce comparable phenotypic and functional changes in human monocyte-derived dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* **55**, 598-611 (2006).

137. Prado-Garcia, H., Romero-Garcia, S., Rumbo-Nava, U. & Lopez-Gonzalez, J.S. Predominance of Th17 over regulatory T-cells in pleural effusions of patients with lung cancer implicates a proinflammatory profile. *Anticancer Res* **35**, 1529-1535 (2015).
138. Aguilar-Cazares, D. *et al.* Relationship of dendritic cell density, HMGB1 expression, and tumor-infiltrating lymphocytes in non-small cell lung carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **22**, 105-113 (2014).
139. Zhao, L., Yang, J., Wang, H.P. & Liu, R.Y. Imbalance in the Th17/Treg and cytokine environment in peripheral blood of patients with adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Med Oncol* **30**, 461 (2013).
140. Meloni, F. *et al.* Foxp3 expressing CD4+ CD25+ and CD8+CD28- T regulatory cells in the peripheral blood of patients with lung cancer and pleural mesothelioma. *Human immunology* **67**, 1-12 (2006).
141. Shigematsu, Y. *et al.* Immunosuppressive effect of regulatory T lymphocytes in lung cancer, with special reference to their effects on the induction of autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Oncology letters* **4**, 625-630 (2012).
142. Li, R., Ruttinger, D., Li, R., Si, L.S. & Wang, Y.L. Analysis of the immunological microenvironment at the tumor site in patients with non-small cell lung cancer. *Langenbecks Arch Surg* **388**, 406-412 (2003).
143. Liao, C. *et al.* Prognostic value of circulating inflammatory factors in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers* **14**, 469-481 (2014).
144. Carpagnano, G.E. *et al.* IL-2, TNF-alpha, and leptin: local versus systemic concentrations in NSCLC patients. *Oncol Res* **16**, 375-381 (2007).
145. Mahalingam, J. *et al.* CD4(+) T cells expressing latency-associated peptide and Foxp3 are an activated subgroup of regulatory T cells enriched in patients with colorectal cancer. *PLoS One* **9**, e108554 (2014).
146. Scurr, M. *et al.* Highly prevalent colorectal cancer-infiltrating LAP(+) Foxp3(-) T cells exhibit more potent immunosuppressive activity than Foxp3(+) regulatory T cells. *Mucosal Immunol* **7**, 428-439 (2014).
147. Yang, D. *et al.* Serum chemokine network correlates with chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* **365**, 57-67 (2015).
148. Chen, J. & Chen, Z. The effect of immune microenvironment on the progression and prognosis of colorectal cancer. *Med Oncol* **31**, 82 (2014).
149. Liu, H. *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to chemotherapy in patients with advance non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* **61**, 1849-1856 (2012).
150. Orditura, M. *et al.* Behaviour of interleukin-2 serum levels in advanced non-small-cell lung cancer patients: relationship with response to therapy and survival. *Cancer Immunol Immunother* **49**, 530-536 (2000).

ARTÍCULO DE REQUISITO

Anexo: "LAP TGF-Beta Subset of CD4 CD25 CD127 Treg Cells is Increased and Overexpresses LAP TGF-Beta in Lung Adenocarcinoma Patients".

Research Article

LAP TGF-Beta Subset of CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg Cells is Increased and Overexpresses LAP TGF-Beta in Lung Adenocarcinoma Patients

Lorenzo Islas-Vazquez,^{1,2} Heriberto Prado-Garcia,¹ Dolores Aguilar-Cazares,¹ Manuel Meneses-Flores,¹ Miriam Galicia-Velasco,¹ Susana Romero-Garcia,¹ Catalina Camacho-Mendoza,³ and Jose Sullivan Lopez-Gonzalez¹

¹Departamento de Enfermedades Crónico-Degenerativas, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Tlalpan 4502, Colonia Sección XVI, 14080 Mexico, DF, Mexico

²Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Ciudad Universitaria 3000, 04510 Mexico, DF, Mexico

³Clinica de Neumo-Oncología, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Tlalpan 4502, Colonia Sección XVI, 14080 Mexico, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to Jose Sullivan Lopez-Gonzalez; slopezgonzalez@yahoo.com

Received 19 March 2015; Accepted 17 May 2015

Academic Editor: Nicolas Larmonier

Copyright © 2015 Lorenzo Islas-Vazquez et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Lung cancer is the leading cause of cancer death worldwide. Adenocarcinoma, the most commonly diagnosed histologic type of lung cancer, is associated with smoking. Cigarette smoke promotes inflammation on the airways, which might be mediated by Th17 cells. This inflammatory environment may contribute to tumor development. In contrast, some reports indicate that tumors may induce immunosuppressive Treg cells to dampen immune reactivity, supporting tumor growth and progression. Thus, we aimed to analyze whether chronic inflammation or immunosuppression predominates at the systemic level in lung adenocarcinoma patients, and several cytokines and Th17 and Treg cells were studied. Higher proportions of IL-17-producing CD4⁺ T-cells were found in smoking control subjects and in lung adenocarcinoma patients compared to nonsmoking control subjects. In addition, lung adenocarcinoma patients increased both plasma concentrations of IL-2, IL-4, IL-6, and IL-10, and proportions of Latency Associated Peptide (LAP) TGF- β subset of CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg cells, which overexpressed LAP TGF- β . This knowledge may lead to the development of immunotherapies that could inhibit the suppressor activity mediated by the LAP TGF- β subset of CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg cells to promote reactivity of immune cells against lung adenocarcinoma cells.

1. Introduction

Lung cancer is the leading cause of cancer death worldwide. Non-small cell lung carcinoma (NSCLC) is the most common type of lung cancer. Adenocarcinoma is the most frequently diagnosed histologic type of NSCLC and is associated with passive and active smoking. The substantial doses of carcinogens and toxins contained in cigarette smoke favor chronic inflammation of the respiratory tract, which is a risk factor for the development of nonmalignant and malignant diseases [1]. Currently, accumulating evidence has shown

that inflammation is associated with the pathogenesis of lung cancer, especially inflammation induced by cigarette smoke [2, 3]. Several authors have proposed that tumor cells induce and maintain an inflammatory reaction. A tumor-associated inflammatory response can contribute to multiple capacities associated with the development and progression of cancers [4–6].

In chronic inflammation, the participation of the Th17 cell subpopulation is of primary importance. Th17 cells are induced by transforming growth factor beta (TGF- β) and interleukin- (IL-) 6 or IL-23. These cells express the retinoic

orphan receptor gamma (ROR- γ t) and present a potent proinflammatory activity, which is mediated predominantly by their effector cytokines IL-17A/F, IL-21, IL-22, and IL-23 [7]. In cancer, Th17 cells have been reported to show pro- and antitumoral effects. The protumoral role of Th17 cells is based on their capacity to recruit neutrophils through IL-8 production. In addition, IL-17A induces that stromal cells and fibroblast produce angiogenic factors such as VEGF. Also, IL-17 induces production of IL-6 by malignant cells, which activate Stat3 signaling pathway. However, Th17 cells might have an antitumoral activity mediated indirectly through dendritic cells (DCs) recruitment and activation of cytotoxic CD8⁺ T-cells activity [8–10].

On the other hand, tumor cells develop several strategies to hamper the activity of the distinct types of cells participating in the immune response, and there is evidence that regulatory T-cells (Treg cells) play an important role in suppressing antitumoral functions [11, 12]. Treg cells are a subset of CD4⁺ T-cells that are specialized for suppressive function. Treg cells differentiate from naïve CD4⁺ T-cells in presence of soluble factors such as IL-10 and TGF- β [13, 14]. The transcription factor FOXP3 has been shown to play a key role in regulatory T-cell function and is a characteristic marker for these cells [14]. However, FOXP3 is a nuclear protein that has a limited value in the isolation of Treg cells for functional assays. Recently, low levels of the IL-7 receptor α -chain (CD127) have been shown to be expressed on Treg cell surface and are inversely correlated with FOXP3 expression [15]. Thus, the more reliable phenotype for identifying Treg cells is CD4⁺CD25⁺CD127⁻.

Treg cells mediate immunosuppression via cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4), IL-10, and cell surface expression of TGF- β binds to membrane through Latency Associated Peptide (LAP) [14, 16–19]. LAP is the N-terminal propeptide of the TGF- β precursor that noncovalently binds to TGF- β , forming a latent TGF- β complex and favoring the release of TGF- β into the extracellular milieu. Recently, a subset of inducible LAP⁺ Treg subset has been reported; this subset suppresses proliferation of conventional T-cells *in vitro* via IL-10 and TGF- β [20–22].

Several studies have shown that Th17 and Treg cells are found in peripheral blood of lung cancer patients [23, 24]; however, the possible interrelation between these subsets remains to be elucidated. The objective of the present study is to clarify to what extent smoking-associated chronic inflammation versus tumor induced suppression contributes in advanced-stage lung adenocarcinoma patients; thus, several cytokines, Th17, and Treg cells were quantified and compared with smoking and nonsmoking controls subjects. Our data indicate that cigarette smoke induced a proinflammatory profile; nevertheless, lung tumors favored suppression rather than inflammation and lead to increased levels of immunosuppressive cytokines and upregulation of LAP-TGF- β in the CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg cells. This Treg cell subset might mediate the local and systemic suppression in lung adenocarcinoma patients. Targeting Th17/Treg balance for therapeutic purposes may represent a useful tool for lung cancer treatment in the future.

2. Materials and Methods

2.1. Population Studied. The population consisted of a total of 28 patients with clinical stage IV lung adenocarcinoma. The diagnosis was established according to WHO criteria [25] by histological examination of biopsy specimens or cytological observation of malignant cells in pleural effusion. Only patients who were classified as heavy smokers were included in the study. According to gender they were 16 males and 12 females. The median age of the group was 59 years (range = 41–78 years). None of the patients had received any type of anticancer therapy before the study.

As controls, 13 healthy nonsmoking (9 males and 4 females) and 15 heavy-smoking (10 males and 5 females) volunteers were included. The median age was 56 years in the nonsmoking group (range = 43–83 years) and 52 years in the smoking group (range = 45–63 years). Subjects from the control groups had normal values for lung function tests as measured by spirometry. The Committee of Science and Bioethics of the National Institute of Respiratory Diseases approved the protocol for the collection of biological samples. Written informed consent was obtained from each subject.

2.2. Plasma Collection and Isolation of Mononuclear Cells from Blood Samples. Blood samples in EDTA-containing tubes were centrifuged, and plasma was immediately collected and stored at -80°C . Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated on Lymphoprep (Axis-Shield, Oslo, Norway) by centrifugation at $150 \times g$ for 45 min. Recuprated PBMCs were washed, suspended in freezing medium, and cryopreserved in liquid nitrogen.

2.3. Quantification of Plasma Th1, Th2, and Th17 Cytokines. Plasma IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF- α , and IFN- γ cytokines from lung adenocarcinoma patients and smoking and nonsmoking control subjects were measured simultaneously using the Cytometric Bead Array Human Th1/Th2/Th17 Cytokine kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) according to the manufacturer's procedure. Data were analyzed using FCAP Array software version 1.0.1 (BD Biosciences).

2.4. Quantification of Plasma TGF- β 1 by ELISA. TGF- β 1 in plasma from the lung adenocarcinoma patients and smoking and nonsmoking control groups was quantified using the Quantikine Human TGF- β 1 immunoassay (R&D system Inc., MN, USA) according to the manufacturer's procedure.

2.5. Percentage of IL-17A-Producing CD4⁺ T-Cells. PBMCs were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics (complete medium) and stimulated with bead particles coated with anti-CD2, anti-CD3, and anti-CD28 antibodies using the T-Cell Activation/Expansion kit (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) following the manufacturer's instructions for a period of 72 h. Five hours before completing the total incubation time, the PBMCs were further stimulated with

phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (25 ng/mL), ionomycin (1 μ g/mL), and brefeldin A (10 μ g/mL) (all from Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Cell stimulation was confirmed by membrane expression of CD69 molecule using an FITC anti-CD69 antibody (FN50 clone, BioLegend, San Diego, CA, USA) and flow cytometric analysis.

For intracellular detection of IL-17A, PBMCs previously stimulated and incubated with PE-Cy5 anti-CD4 antibody (RPA-T4 clone, BioLegend) were washed, permeabilized with FACS Permeabilizing Solution (BD Pharmingen), and fixed. Permeabilized cells were stained with PE anti-IL-17A (BL168 clone, BioLegend) and Alexa Fluor 488 anti-IFN- γ (4S.B3 clone, BioLegend) antibodies.

2.6. Purification of CD4⁺ T-Cells. CD4⁺ T-cells were isolated from PBMCs by negative selection with the CD4⁺ T-cell isolation kit II (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Cell viability determined by trypan blue exclusion was always higher than 92%. The purity of the CD4⁺ T-cells was always higher than 94%, as detected by a mixture of FITC anti-CD3 (HIT3a clone), PE-Cy5 anti-CD8 (HIT8a clone), and PE anti-CD4 (RPA-T4 clone) antibodies (all from BioLegend) and flow cytometric analysis.

2.7. Th17 and Treg Phenotyping by Flow Cytometry. For Th17 cell immunostaining, purified CD4⁺ T-cells were identified using labeled monoclonal antibodies against the following molecules: Alexa Fluor 700 anti-CD4 and PE anti-ROR- γ t (AFKJS-9 clone, eBioscience, San Diego, CA, USA).

For Treg immunostaining, purified CD4⁺ T-cells were identified using labeled monoclonal antibodies against the following molecules: Alexa Fluor 700 anti-CD4 (RPA-T4 clone, BD Pharmingen), PE-Cy5 anti-CD25 (M-A251 clone, BD Pharmingen), Alexa Fluor 647 anti-CD127 (HCD127 clone, BioLegend), and Alexa Fluor 488 anti-FOXP3 (150D clone, BioLegend).

To analyze CTLA-4 expression in Treg cells, PE anti-CTLA-4 antibody (BNI3 clone, BD Pharmingen) was added. The integrated mean fluorescence intensity (iMFI) was calculated by multiplying the percentage of CTLA-4 by their corresponding mean fluorescence intensity (MFI), as described previously [26].

Intracellular staining for FOXP3 and ROR- γ t CD4⁺ T-cells was performed using a commercially available kit (BioLegend) following the manufacturer's instructions. Appropriate isotype controls were used to allow identification of positive and negative cell populations. To rule out non-specific antibody binding and autofluorescence, quadrants were set according to isotype controls. Positive and negative gates for each molecule were also verified on the basis of "fluorescence-minus-one" controls.

2.8. Percentages of IL-10- or LAP TGF- β 1-Producing Treg Cells. Purified CD4⁺ T-cells from patients and control groups were cultured in complete RPMI 1640 media and stimulated with PMA (25 ng/mL), ionomycin (1 μ g/mL), and brefeldin A (10 μ g/mL) for 5 h. Cell stimulation was confirmed by

membrane expression of CD69 molecule using an FITC anti-CD69 antibody. After stimulation, LAP TGF- β surface expression was detected using PE-LAP TGF- β 1 monoclonal antibody (TW4-6H10 clone, BioLegend) or intracellular IL-10 using PE anti-IL-10 monoclonal antibody (JES3-19F1 clone, BioLegend). The cells were analyzed by flow cytometry. The percentage of positive cells, the MFI, and the iMFI was determined.

Data acquisition was performed using FACSCanto II (Becton Dickinson). Flow cytometric analysis was conducted using FlowJo software (TreeStar Inc., Ashland, OR, USA).

2.9. Statistical Analysis. All values are expressed as the mean \pm SEM. The Mann-Whitney *U* test and Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison tests were used for a significance level of 0.05. Statistical analyses were performed with Graph Pad Prism software version 5.0 (La Jolla, CA, USA).

3. Results

3.1. Quantification of Cytokines in Control Groups and in Lung Adenocarcinoma Patients. Cytokines associated with Treg cells or Th17 cells were quantified in the plasma of the control groups and advanced-stage lung adenocarcinoma patients. In the smoking and nonsmoking groups, the plasma concentrations of IL-2, IFN- γ , IL-6, IL-17A, IL-4, and IL-10 were similar. A tendency to increase the levels of TGF- β 1 and TNF- α was found in the smoking group. See Figure 1.

In the lung adenocarcinoma patients, significant increases in TGF- β 1 were detected compared with nonsmoking subjects. Significant increases in IL-2, IL-4, IL-6, and IL-10 cytokines were found compared with the smoking and nonsmoking groups. Plasma concentrations of IFN- γ tended to increase, whereas TNF- α tended to decrease compared with both control groups. See Figure 1.

3.2. Percentages of IL-17A-Producing CD4⁺ T-Cells in Control Groups and Lung Adenocarcinoma Patients. IL-17A-producing CD4⁺ T-cells were quantified from stimulated PBMCs. It is known that Th1 cells produce IL-17 in addition to IFN- γ . Thus, IL-17A/IFN- γ double-positive cells were detected to rigorously identify IL-17-producing CD4⁺ (Th17) T-cells.

The percentage of Th17 cells in the smoking group significantly increased 1.95-fold compared with the percentage in the nonsmoking group. In lung adenocarcinoma patients, the percentage of Th17 cells was similar to the smoking group and significantly increased by 2.2-fold compared with the percentage in the nonsmoking group. See Figures 2(a) and 2(b).

In the smoking group, the expression of IL-17A, as detected by the MFI value, showed a tendency to increase compared with the nonsmoking group. In lung adenocarcinoma patients, significant increases were found in the MFI values of IL-17A compared with the nonsmoking group (data not shown). The iMFI reflects the total functional response in

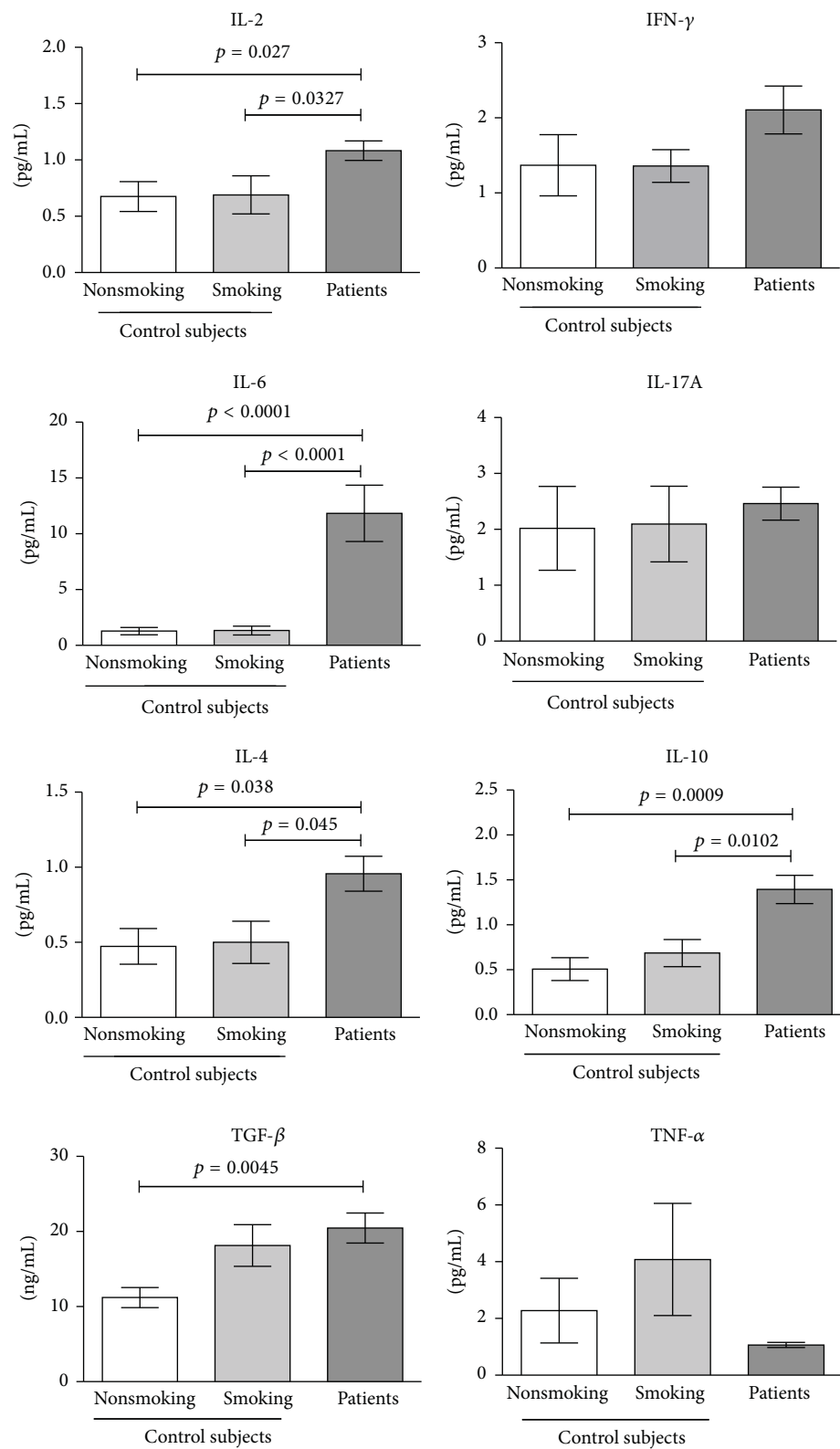
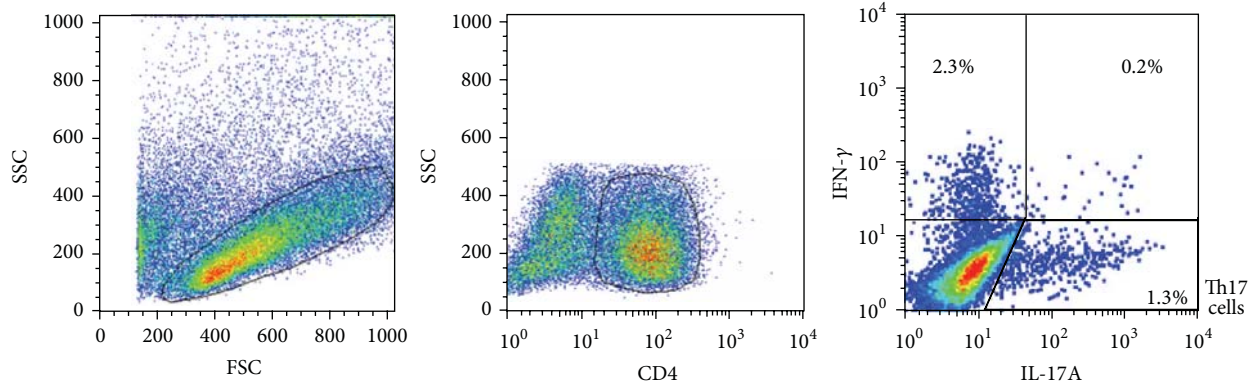
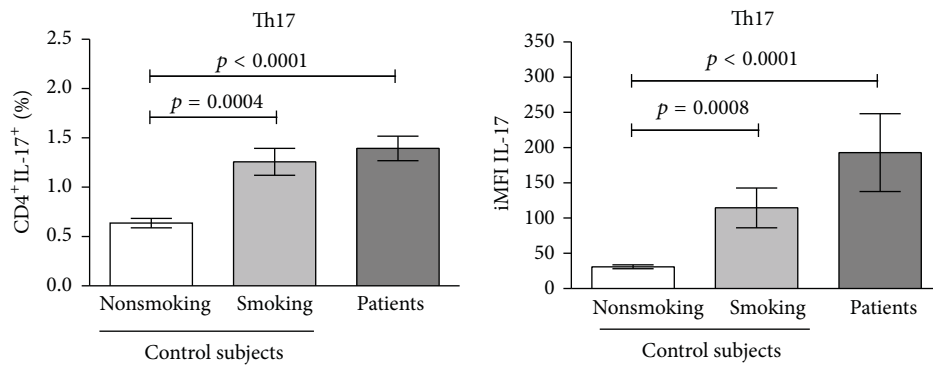


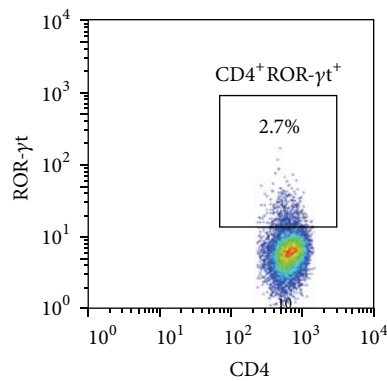
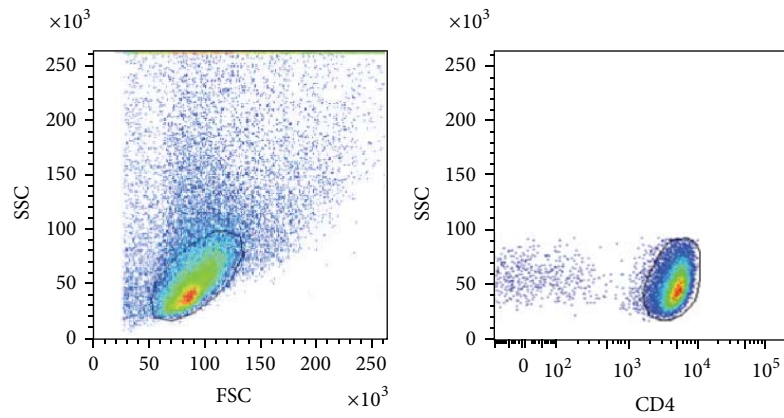
FIGURE 1: Plasma levels of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF- α , IFN- γ , and TGF- β 1 cytokines in lung adenocarcinoma patients and smoking and nonsmoking control subjects. Plasma concentrations of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF- α , and IFN- γ were measured simultaneously using a cytometric bead array. TGF- β 1 was measured by ELISA. The results are reported as mean \pm SEM.



(a)



(b)



(c)

FIGURE 2: Continued.

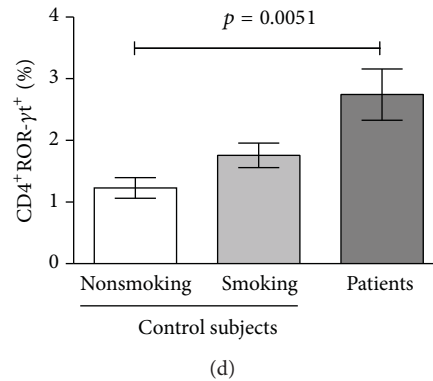


FIGURE 2: Percentages of Th17 cells were identified according the membrane expression of ROR-γt or intracellular IL-17 in lung adenocarcinoma patients and smoking and nonsmoking control subjects. (a) Distribution of stimulated PBMCs according to forward scatter (FSC) and sideward scatter (SSC) dot plot. A gating was set for CD4⁺ T-cells. From gated CD4⁺ T-cells, cells producing IL-17, IFN-γ, or both cytokines were detected. A representative cytometric analysis from a lung adenocarcinoma patient is shown. (b) Percentages and expression levels (measure by iMFI values) of IL-17 from CD4⁺IL-17⁺ (Th17) T-cells are shown and compared among the studied groups. The results are reported as mean ± SEM. (c) Distribution of purified CD4⁺ T-cell in a FSC and SSC dot plot. A gating was set for CD4⁺ T-cells. From gated CD4⁺ T-cells, the percentage of ROR-γt⁺ cells was detected. A representative cytometric analysis from a lung adenocarcinoma patient is shown. (d) Percentages of CD4⁺ROR-γt⁺ T-cells from lung adenocarcinoma patients and smoking and nonsmoking control subjects are shown. The results are reported as mean ± SEM.

terms of quality (MFI) and magnitude (percentage) as previously described [26]. A significant increase of the iMFI values of IL-17A was detected in the smoking group compared with the nonsmoking group. In summary, Th17 cells from lung adenocarcinoma patients, compared with the control groups, expressed high levels of IL-17A. These results indicate that Th17 cells from the studied groups are functional. Moreover, the Th17 cells from lung adenocarcinoma patients produced the highest levels of IL-17A. See Figure 2(b).

3.3. Percentages of ROR-γt CD4⁺ T-Cells in Control Groups and Lung Adenocarcinoma Patients. We determined the proportions of Th17 cells in peripheral blood identifying this subset as CD4⁺ROR-γt⁺ T-cells. In nonsmoking and smoking control subjects, similar percentages of CD4⁺ROR-γt⁺ T-cells (1.22 versus 1.75%) were detected. In lung adenocarcinoma patients, the percentage of CD4⁺ROR-γt⁺ T-cells was 2.75%. A significant increase of 2.2-fold was detected in the percentage of CD4⁺ROR-γt⁺ T-cells in lung adenocarcinoma patients compared with nonsmoking subjects. See Figures 2(c) and 2(d). Interestingly, in lung adenocarcinoma patients, percentages of ROR-γt⁺ CD4⁺ T-cells were higher compared to the percentages of IL-17A-producing CD4⁺ T-cells.

For the level of expression of ROR-γt, the MFI values were similar in the lung adenocarcinoma and control groups. The smoking group showed a tendency to increase iMFI values compared with the nonsmoking group. Lung adenocarcinoma patients showed increases in this parameter compared with the nonsmoking and smoking groups (data not shown). However, no significant differences were found when the three groups were compared.

3.4. Percentages of Treg Cells in Control Groups and Lung Adenocarcinoma Patients. We analyzed the frequency of Treg

cells identified as CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T-cells. In the present study, similar percentages of CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg cells were detected in the smoking and nonsmoking subjects. A significant increase in the percentage of Treg cells was detected in lung adenocarcinoma patients compared with nonsmoking subjects. See Figures 3(a) and 3(b). FOXP3 has been shown to be inversely correlated with the CD127 molecule [15]. Our results show that approximately 65–75% of CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg cells expressed FOXP3 in the studied groups. See Figure 3(c).

3.5. Treg Cells Producing IL-10 or Expressing CTLA-4. The expression of IL-10 and CTLA-4, molecules involved in the suppressor activity of Treg cells, were studied. CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg cells from the control groups and lung adenocarcinoma patients did not produce IL-10 (data not shown). Approximately 50–60% of the CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg cells expressed CTLA-4 in lung adenocarcinoma patients and the control groups. See Figure 3(c). In addition, CTLA-4 expression (determined by the MFI and iMFI values) was similar among all groups (data not shown). Thus, our results show that CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg cells from the smoking and nonsmoking groups and from lung adenocarcinoma patients did not mediate suppressor activity by IL-10 production; nevertheless, CTLA-4 may be involved in the suppressor function.

3.6. LAP TGF-β1 in Treg Cells from Control Groups and Lung Adenocarcinoma Patients. From among the CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T-cell population, LAP TGF-β1-producing cells in control groups and lung adenocarcinoma patients were quantified and compared. No significant differences between the control groups were found. However, a significant increase of 1.4-fold to 1.75-fold was detected in

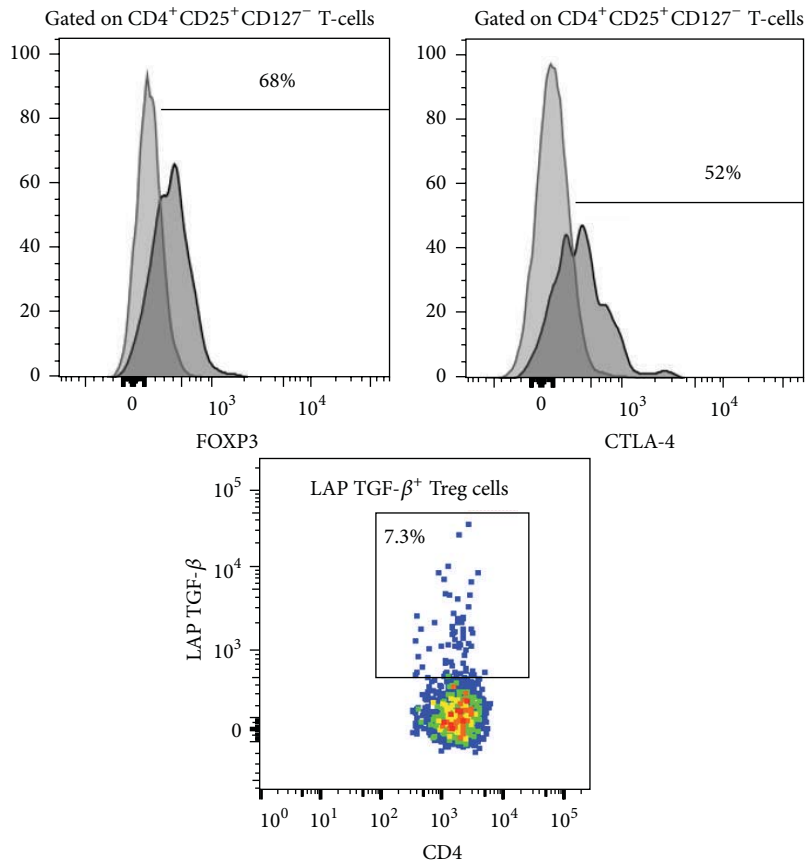
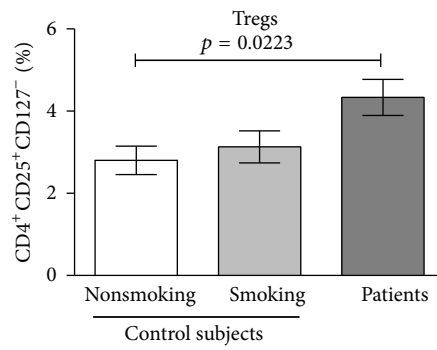
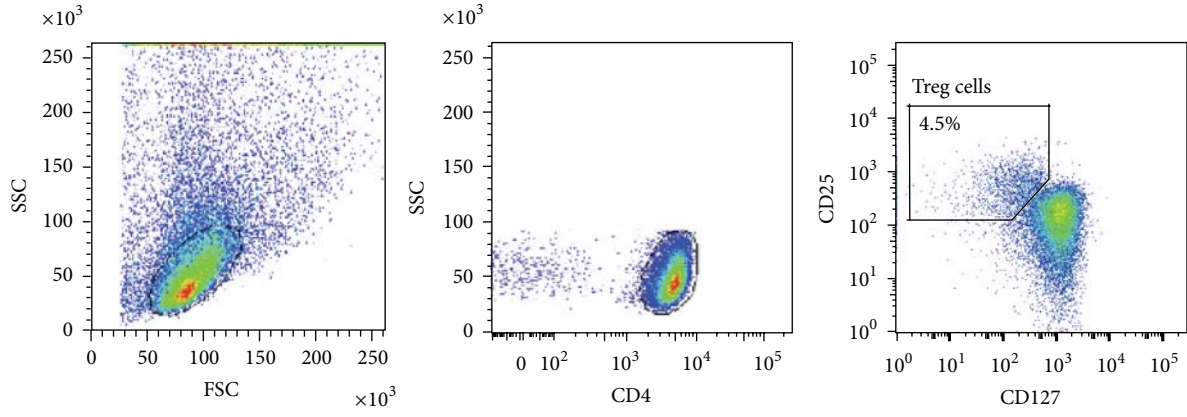


FIGURE 3: Continued.

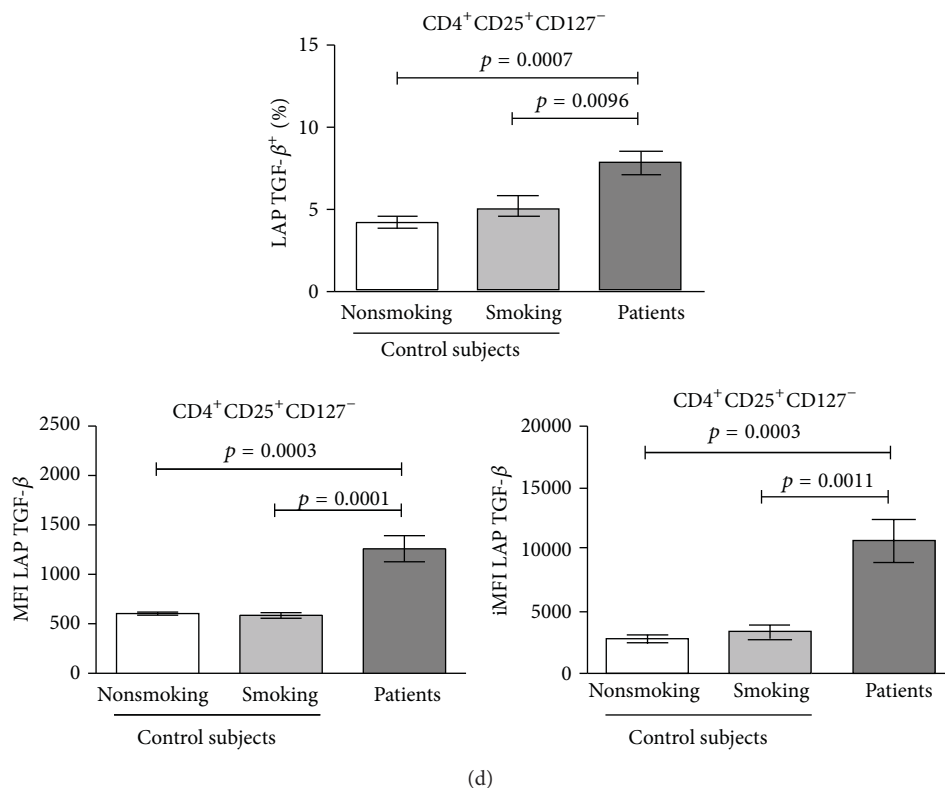


FIGURE 3: Percentages of Treg cells phenotyped as CD4⁺CD25⁺CD127⁻ and percentages and expression levels of LAP TGF-β in Treg cells from lung adenocarcinoma patients and smoking and nonsmoking subjects. (a) Distribution of purified CD4⁺ T-cell in a forward scatter (FSC) and sideward scatter (SSC) dot plot. A gating was set for CD4⁺ T-cells. From gated CD4⁺ T-cells, the percentage of CD25⁺CD127⁻ cells was detected. A representative cytometric analysis from a lung adenocarcinoma patient is shown. (b) Percentages of Treg cells from lung adenocarcinoma patients and smoking and nonsmoking control subjects are shown. The results are reported as mean ± SEM. (c) The histograms indicate the percentages of gated unstimulated Treg cells expressing FOXP3 or CTLA-4. From stimulated CD4⁺ T-cells, the percentage of LAP TGF-β⁺ cells from Treg cells was detected. A representative cytometric analysis from a lung adenocarcinoma patient is shown. (d) Percentages and expression levels (measure by MFI and iMFI values) of LAP TGF-β from CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T-cells are shown and compared among the studied groups. The results are reported as mean ± SEM.

the percentages of CD4⁺CD25⁺CD127⁻LAP TGF-β⁺ Treg cells in lung adenocarcinoma patients compared with the corresponding population in the smoking and nonsmoking control groups. See Figures 3(c) and 3(d).

When the expression levels of LAP TGF-β⁺ in the CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg cells from the groups were analyzed, similar MFI values were found in the smoking and nonsmoking groups. In contrast, the expression level of LAP TGF-β⁺ significantly increased more than 2-fold in lung adenocarcinoma patients in comparison with the smoking and nonsmoking groups. See Figure 3(d). With respect to iMFI values for LAP TGF-β⁺, lung adenocarcinoma patients showed an increase in the expression of LAP TGF-β⁺ that was 3.25-fold and 3.8-fold greater than the expression in the smoking and nonsmoking groups, respectively. See Figure 3(d).

3.7. Balance between IL-17-Producing CD4⁺ T-Cells and LAP TGF-β⁺ Treg Cells. The relationship between IL-17-producing CD4⁺ T-cells (Th17) and CD4⁺CD25⁺CD127⁻LAP

TGF-β⁺ Treg cells was explored in each group studied. In all groups, the percentage of LAP TGF-β⁺ Treg cells was higher than the percentage of IL-17⁺ Th17 cells. See Figure 4. To determinate the balance between Th17 and Treg cells the Th17/Treg ratio was calculated. The Th17/Treg ratios were 0.1587 ± 0.016, 0.2527 ± 0.03, and 0.2122 ± 0.03 in nonsmoking subjects, smoking subjects, and patients, respectively. These results indicate that, in smoking subjects, cigarette smoke promotes an inflammation and this is reflected by the increase of IL-17-producing CD4⁺ T-cells, whereas, in lung adenocarcinoma patients, who were classified as heavy smokers, the tumor might modify the balance to immunosuppression, mediated by the increase in the percentage of the LAP TGF-β⁺ subset of CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg cells.

In summary, our results show that, at the systemic level, the percentage of the LAP TGF-β⁺ subset of CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg cells was increased in advanced-stage lung adenocarcinoma patients. Overexpression of LAP TGF-β⁺, associated with this Treg subset, might suppress antitumoral responses.

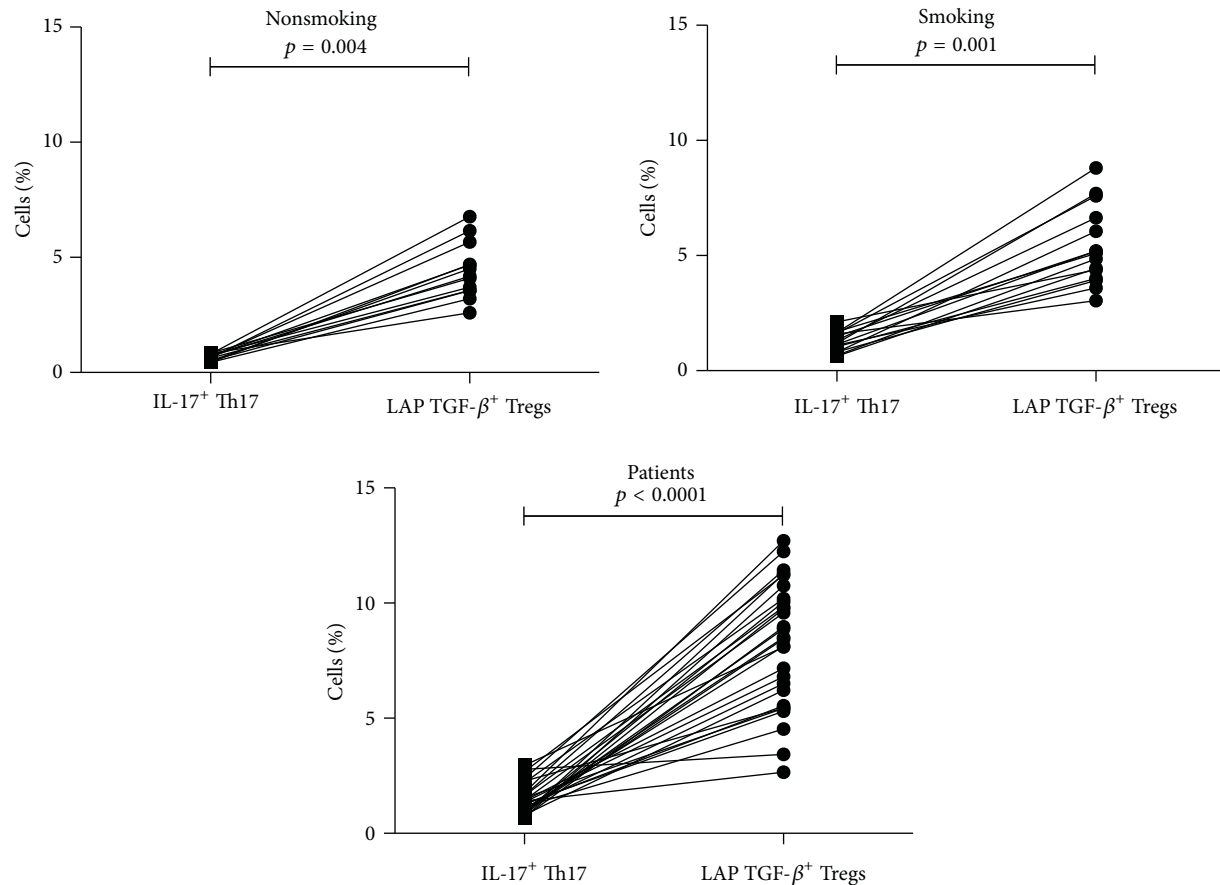


FIGURE 4: Relationship between IL-17-producing CD4⁺ T-cells (Th17 cells) and LAP TGF- β ⁺ Treg cells. Percentages of IL-17-producing CD4⁺ T-cells (Th17 cells) and percentages of LAP TGF- β from CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg cells are shown and compared in lung adenocarcinoma patients and smoking and nonsmoking subjects.

4. Discussion

Few studies have compared the cytokine profile and Th17/Treg balance between healthy subjects and healthy heavy smokers [27]. Thus, we studied the impact of the inflammatory response on cytokine concentrations and on the percentages of Th17 and Treg cells at the systemic level. Even when no differences were found in the cytokine profile between smoking and nonsmoking subjects, our results indicate that smoking is promoting inflammation by increasing IL-17-producing Th17 cells. These cells might promote an inflammatory response; however, as smoking control subjects showed no sign of smoking-related respiratory diseases and no increases of IL-6 and IL-17A were found, the slight increase in TGF- β levels in the smoking group may be participating in regulation of the inflammatory response. This mechanism would prevent the development of a pathological condition and maintain a transient inflammatory state in which the recovery of the homeostasis is still possible.

In lung cancer patients, previous studies have evaluated pro- and anti-inflammatory systemic cytokines and Th17 and Treg cells [18, 19, 23, 28–30]. In those studies, data were compared with healthy control subjects, which included both smoking and nonsmoking subjects. As smoking may affect

systemic cytokines and the relationship of Th17 and Treg cells; in this study, we decided to analyze the data obtained from lung adenocarcinoma patients and compare these data with those of smoking subjects. This knowledge can show us whether chronic inflammation or suppression predominates at the systemic level in lung adenocarcinoma patients.

Our results showed higher levels of proinflammatory (IL-2 and IL-6) and anti-inflammatory (IL-4 and IL-10) cytokines in lung adenocarcinoma patients compared with smoking subjects. With respect to IL-2, a previous report indicates that this cytokine increases in NSCLC patients at local and systemic levels [31], and our data agree with this report. IL-6 has primarily been associated with the inflammatory response [32]. Increases in this cytokine have been reported in lung cancer patients and have been associated with tumor progression and poor prognosis [33, 34]. IL-6 produced by lung tumors might explain the increase in plasma concentrations detected in lung adenocarcinoma patients. The increased production of IL-6 and TGF- β could promote the differentiation of Th17 cells to maintain a chronic inflammatory state.

With respect to Treg cells, Carpagnano et al. proposed that IL-2 in presence of TGF- β might promote the generation and differentiation of Treg cells in lung cancer [31].

The increased levels of these cytokines detected in our study might be supporting this phenomenon. In addition, IL-4 and IL-10 may also participate in the differentiation process to Treg cells, as higher levels of these cytokines were also detected in our study.

In NSCLC, increases in Treg cells, immunophenotyped as CD4⁺CD25⁺ or CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺, have been previously reported [18, 19, 28, 29]. In those studies, no distinction was made between activating T-cells, which temporarily express CD25 and FOXP3 and Treg cells. In recent studies, a more strict characterization of Treg cells has been achieved [23]. In some of these studies, the suppressor activity of Treg cells has been evaluated by examining the expression of IL-10, TGF- β , and/or CTLA-4 [19, 29, 35]. We found that, in lung adenocarcinoma patients, the suppressor function of Treg cells is not mediated by IL-10. However LAP TGF- β , a membrane molecule with inhibitory activity, is involved. Even though the effector function of the LAP TGF- β subset of the CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg cells was not directly evaluated in our study, Mahalingam et al. and Scurr et al. reported that peripheral blood and tumor-infiltrating LAP⁺ Treg cells exhibit potent suppressive activity in colorectal cancer [20, 21]. Thus, the LAP⁺ Treg cells detected in our study may be participating in the immunosuppression observed in lung cancer patients.

To clarify to what extent smoking-associated inflammation contributes to pathogenesis of lung adenocarcinoma, we analyzed Th17 cells. Some groups have reported that Th17 cells (detected as IL-17-producing CD4⁺ T-cells) are increased in peripheral blood of lung cancer patients [24]; our data agree with these previous reports. As ROR- γ t is the master transcription factor of Th17 cells, we analyzed CD4⁺ T-cells expressing this marker. We previously reported, in malignant pleural effusion from lung cancer patients, similar percentages of CD4⁺ROR- γ t⁺ T-cells and IL-17-producing Th17 cells [36]. In peripheral blood of lung adenocarcinoma patients, higher proportions of CD4⁺ROR- γ t⁺ T-cells compared with the IL-17-producing Th17 cells were found. These results might be related to the anatomical compartment rather than to the underlying pathology; another possibility is that the Th17 cells in peripheral blood are dysfunctional. The increase in Treg cells, acting by LAP TGF- β mechanism, might inhibit the effector function of Th17 cells. Further studies are required to study this possibility.

Th17 and Treg cells have opposite functions, whereas Th17 cells promote inflammation, Treg cells suppress immune response. In tumors associated with chronic infections, such as gastric cancer, the balance is favored toward to Th17 cells [37, 38]. In patients with NSCLC, Li et al. showed that FOXP3⁺ Treg cells and Th17 cells are positively correlated [24]; however, no distinction between Treg cells and activated T-cells, which transiently express FOXP3, was made. Recently, Zhao et al. found an inverse correlation between Treg cells and Th17 cells in peripheral blood of NSCLC patients, attributing this event to reduction of Th17 cells [23]. In that study, Th17 cells were identified as CD3⁺CD8⁻IL-17⁺ cells; perhaps, the presence of NKT cells affected the accuracy of IL-17⁺ cells quantification. Even though an inflammatory process occurs in smoking subjects, as evidenced by an

increased Th17/Treg ratio, our data indicate that in lung adenocarcinoma patients, this balance is reverted favoring increases of Treg cells at the systemic level. Maybe the array of immunosuppressive cytokines that are increased in lung adenocarcinoma patients supports the presence of Treg cells.

In conclusion, as similar increases in Th17 cells were found at the systemic level in smoking subjects and lung adenocarcinoma patients, smoking rather than the tumor caused inflammation. In lung adenocarcinoma patients, compared with smoking subjects, the concentrations of IL-2, IL-4, IL-6, and IL-10 were increased. A higher percentage of CD4⁺CD25⁺CD127⁻LAP TGF- β ⁺ Treg cells were found; this subset showed higher levels of LAP TGF- β , with respect to the corresponding subset from smoking and nonsmoking subjects.

This knowledge should lead to the development of immunotherapies that inhibit the suppressor activity mediated by LAP TGF- β from CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg cells. This approach alone, or in combination with immunotherapeutic agents targeting the immune checkpoints, would promote the reactivity of immune cells against lung adenocarcinoma cells to increase patient's overall survival rates.

Disclosure

This study was conducted as part of Lorenzo Islas-Vazquez doctoral thesis.

Conflict of Interests

The authors declares that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

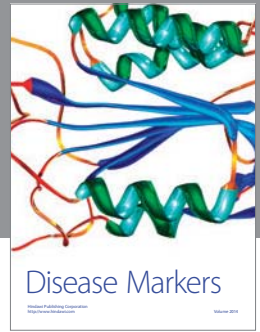
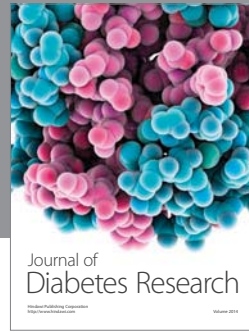
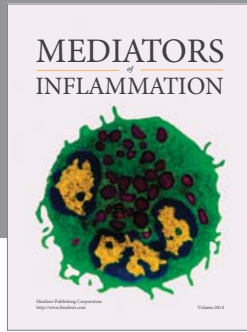
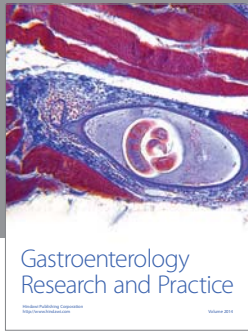
Acknowledgment

The first author is a Ph.D. student from the Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, and recipient of a fellowship from CONA-CyT (307085).

References

- [1] J. Lee, V. Taneja, and R. Vassallo, "Cigarette smoking and inflammation: cellular and molecular mechanisms," *Journal of Dental Research*, vol. 91, no. 2, pp. 142–149, 2012.
- [2] M. R. Spitz, W. K. Hong, C. I. Amos et al., "A risk model for prediction of lung cancer," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 99, no. 9, pp. 715–726, 2007.
- [3] M. R. Stämpfli and G. P. Anderson, "How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer," *Nature Reviews Immunology*, vol. 9, no. 5, pp. 377–384, 2009.
- [4] M. T. Chow, A. Möller, and M. J. Smyth, "Inflammation and immune surveillance in cancer," *Seminars in Cancer Biology*, vol. 22, no. 1, pp. 23–32, 2012.
- [5] A. Mantovani, P. Allavena, A. Sica, and F. Balkwill, "Cancer-related inflammation," *Nature*, vol. 454, no. 7203, pp. 436–444, 2008.

- [6] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: the next generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011.
- [7] T. Korn, E. Bettelli, M. Oukka, and V. K. Kuchroo, "IL-17 and Th17 cells," *Annual Review of Immunology*, vol. 27, pp. 485–517, 2009.
- [8] D. Alizadeh, E. Katsanis, and N. Larmonier, "The multifaceted role of Th17 lymphocytes and their associated cytokines in cancer," *Clinical and Developmental Immunology*, vol. 2013, Article ID 957878, 11 pages, 2013.
- [9] R. P. Singh, S. Hasan, S. Sharma et al., "Th17 cells in inflammation and autoimmunity," *Autoimmunity Reviews*, vol. 13, no. 12, pp. 1174–1181, 2014.
- [10] E. Maniati, R. Soper, and T. Hagemann, "Up for mischief? IL-17/Th17 in the tumour microenvironment," *Oncogene*, vol. 29, no. 42, pp. 5653–5662, 2010.
- [11] G. A. Rabinovich, D. Gabrilovich, and E. M. Sotomayor, "Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells," *Annual Review of Immunology*, vol. 25, pp. 267–296, 2007.
- [12] H. Nishikawa and S. Sakaguchi, "Regulatory T cells in tumor immunity," *International Journal of Cancer*, vol. 127, no. 4, pp. 759–767, 2010.
- [13] R. A. Peterson, "Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression," *Toxicologic Pathology*, vol. 40, no. 2, pp. 186–204, 2012.
- [14] E. M. Shevach and A. M. Thornton, "tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences," *Immunological Reviews*, vol. 259, no. 1, pp. 88–102, 2014.
- [15] W. Liu, A. L. Putnam, Z. Xu-yu et al., "CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 203, no. 7, pp. 1701–1711, 2006.
- [16] A. Schmidt, N. Oberle, and P. H. Krammer, "Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression," *Frontiers in Immunology*, vol. 3, article 51, 2012.
- [17] K. Nakamura, A. Kitani, and W. Strober, "Cell contact-dependent immunosuppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor β ," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 194, no. 5, pp. 629–644, 2001.
- [18] E. Y. Woo, C. S. Chu, T. J. Goletz et al., "Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer," *Cancer Research*, vol. 61, no. 12, pp. 4766–4772, 2001.
- [19] A. M. Wolf, D. Wolf, M. Steurer, G. Gastl, E. Gunsilius, and B. Grubeck-Loebenstein, "Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients," *Clinical Cancer Research*, vol. 9, no. 2, pp. 606–612, 2003.
- [20] J. Mahalingam, C. Lin, J. Chiang et al., "CD4⁺ T cells expressing latency-associated peptide and Foxp3 are an activated subgroup of regulatory T cells enriched in patients with colorectal cancer," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 9, Article ID e108554, 2014.
- [21] M. Scurr, K. Ladell, M. Besneux et al., "Highly prevalent colorectal cancer-infiltrating LAP⁺ Foxp3⁻ T cells exhibit more potent immunosuppressive activity than Foxp3⁺ regulatory T cells," *Mucosal Immunology*, vol. 7, no. 2, pp. 428–439, 2014.
- [22] Z.-J. Ye, Q. Zhou, J.-C. Zhang et al., "CD39⁺ regulatory T cells suppress generation and differentiation of Th17 cells in human malignant pleural effusion via a LAP-dependent mechanism," *Respiratory Research*, vol. 12, article 77, 2011.
- [23] L. Zhao, J. Yang, H.-P. Wang, and R.-Y. Liu, "Imbalance in the Th17/Treg and cytokine environment in peripheral blood of patients with adenocarcinoma and squamous cell carcinoma," *Medical Oncology*, vol. 30, no. 1, article 461, 2013.
- [24] S. Li, Y. Li, X. Qu, X. Liu, and J. Liang, "Detection and significance of TregFoxP3⁺ and Th17 cells in peripheral blood of non-small cell lung cancer patients," *Archives of Medical Science*, vol. 10, no. 2, pp. 232–239, 2014.
- [25] E. Brambilla, W. D. Travis, T. V. Colby, B. Corrin, and Y. Shimosato, "The new World Health Organization classification of lung tumours," *European Respiratory Journal*, vol. 18, no. 6, pp. 1059–1068, 2001.
- [26] P. A. Darrah, D. T. Patel, P. M. De Luca et al., "Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*," *Nature Medicine*, vol. 13, no. 7, pp. 843–850, 2007.
- [27] H. Wang, H. Ying, S. Wang et al., "Imbalance of peripheral blood Th17 and Treg responses in patients with chronic obstructive pulmonary disease," *The Clinical Respiratory Journal*, 2014.
- [28] F. Meloni, M. Morosini, N. Solari et al., "Foxp3 expressing CD4⁺CD25⁺ and CD8⁺CD28⁻ T regulatory cells in the peripheral blood of patients with lung cancer and pleural mesothelioma," *Human Immunology*, vol. 67, no. 1-2, pp. 1–12, 2006.
- [29] Y. Shigematsu, T. Hanagiri, H. Shiota et al., "Immunosuppressive effect of regulatory T lymphocytes in lung cancer, with special reference to their effects on the induction of autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes," *Oncology Letters*, vol. 4, no. 4, pp. 625–630, 2012.
- [30] R. Li, D. Rüttinger, R. Li, L.-S. Si, and Y.-L. Wang, "Analysis of the immunological microenvironment at the tumor site in patients with non-small cell lung cancer," *Langenbeck's Archives of Surgery*, vol. 388, no. 6, pp. 406–412, 2003.
- [31] G. E. Carpagnano, A. Spanevello, C. Curci et al., "IL-2, TNF- α , and leptin: local versus systemic concentrations in NSCLC patients," *Oncology Research*, vol. 16, no. 8, pp. 375–381, 2007.
- [32] G. Landskron, M. De La Fuente, P. Thuwajit, C. Thuwajit, and M. A. Hermoso, "Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment," *Journal of Immunology Research*, vol. 2014, Article ID 149185, 19 pages, 2014.
- [33] C. Liao, Z. Yu, W. Guo et al., "Prognostic value of circulating inflammatory factors in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis," *Cancer Biomarkers*, vol. 14, no. 6, pp. 469–481, 2014.
- [34] Q. Chang, L. Daly, and J. Bromberg, "The IL-6 feed-forward loop: a driver of tumorigenesis," *Seminars in Immunology*, vol. 26, no. 1, pp. 48–53, 2014.
- [35] N. Erfani, S. M. Mehrabadi, M. A. Ghayumi et al., "Increase of regulatory T cells in metastatic stage and CTLA-4 over expression in lymphocytes of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC)," *Lung Cancer*, vol. 77, no. 2, pp. 306–311, 2012.
- [36] H. Prado-Garcia, S. Romero-Garcia, U. Rumbo-Nava, and J. S. Lopez-Gonzalez, "Predominance of Th17 over regulatory T-cells in pleural effusions of patients with lung cancer implicates a proinflammatory profile," *Anticancer Research*, vol. 35, no. 3, pp. 1529–1535, 2015.
- [37] Y. Yamada, H. Saito, and M. Ikeguchi, "Prevalence and clinical relevance of Th17 cells in patients with gastric cancer," *Journal of Surgical Research*, vol. 178, no. 2, pp. 685–691, 2012.
- [38] Q. Li, Q. Li, J. Chen et al., "Prevalence of Th17 and Treg cells in gastric cancer patients and its correlation with clinical parameters," *Oncology Reports*, vol. 30, no. 3, pp. 1215–1222, 2013.



Hindawi
Submit your manuscripts at
<http://www.hindawi.com>

