



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EXPRESIÓN DE LA MOLÉCULA CD155 EN BIOPSIAS DE  
PACIENTES CON ADENOCARCINOMA PULMONAR Y SU RELACIÓN  
CON PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**JESÚS JAREB BENITO LÓPEZ**



**CD. MX.**

**2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ

**VOCAL:** ENRIQUE ORTEGA SOTO

**SECRETARIO:** LORENZO ISLAS VÁZQUEZ

**1er. SUPLENTE:** OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA

**2° SUPLENTE:** EDGAR RICARDO VÁZQUEZ MARTINEZ

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

**ASESOR DEL TEMA:**

LORENZO ISLAS VÁZQUEZ

**SUSTENTANTE (S):**

JESÚS JAREB BENITO LÓPEZ

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
Cáncer pulmonar .....	1
Carcinogénesis .....	4
Hallmarks del cáncer .....	5
Sistema inmunológico y cáncer.....	6
Evasión de la respuesta inmunológica.....	10
El contexto inmunológico en los tumores sólidos.....	12
CD155 .....	14
ANTECEDENTES .....	16
HIPÓTESIS .....	18
OBJETIVO GENERAL.....	18
Objetivos particulares .....	18
MATERIALES Y MÉTODOS .....	19
RESULTADOS.....	23
DISCUSIÓN.....	33
CONCLUSIONES.....	37
PERSPECTIVAS .....	38
REFERENCIAS .....	39

## **INTRODUCCIÓN**

“Cáncer” es el término empleado para denominar al conjunto de enfermedades caracterizadas por un incremento anormal en el número de células, relacionado con alteraciones en procesos de proliferación, muerte y diferenciación celular, que eventualmente pueden diseminarse a otros tejidos u órganos [1]. El Observatorio Mundial del Cáncer (GLOBOCAN) estimó la incidencia y mortalidad de este conjunto de enfermedades en 18 millones de casos nuevos y 9.6 millones de defunciones en 2018, así como su aumento a 29.5 millones de casos nuevos y 16.4 millones de defunciones para 2040 [2].

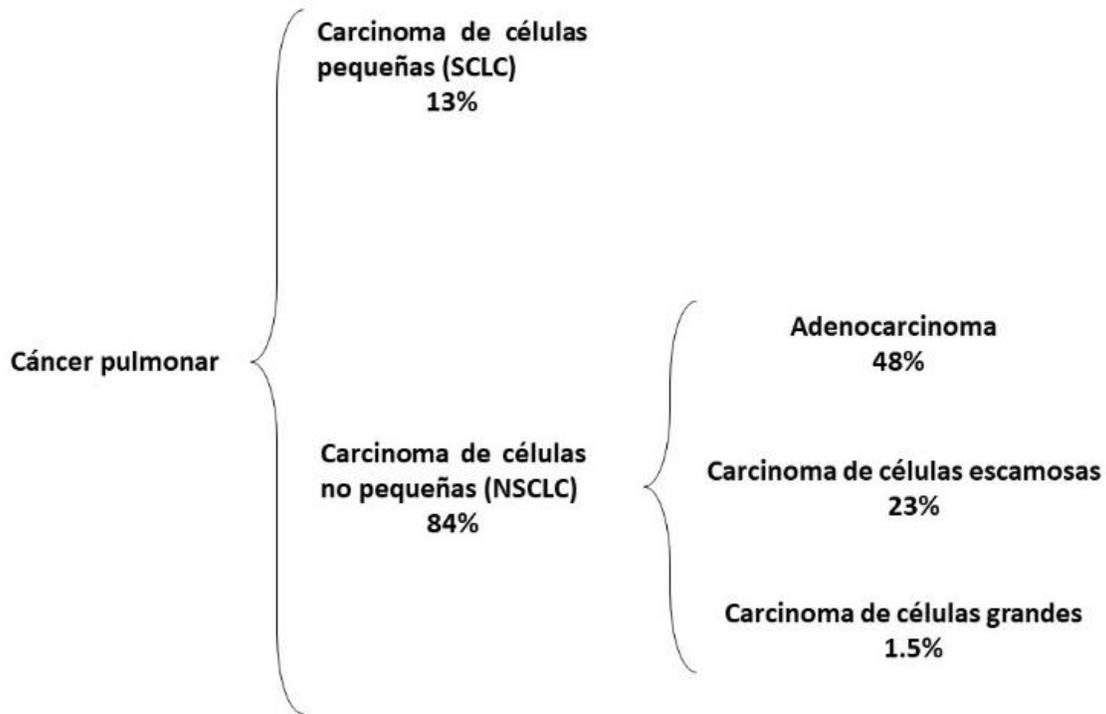
Los tipos de cáncer con mayor incidencia a nivel mundial son el cáncer de pulmón, de mama, colorrectal, de próstata y de estómago, mientras que los de mayor tasa de mortalidad son el cáncer de pulmón, colorrectal, de estómago, de hígado, y de mama [3].

Diversos factores como componentes genéticos o la exposición a determinados agentes, denominados carcinógenos, se han asociado con el desarrollo de estas enfermedades. De esta manera, alteraciones hereditarias en los genes *BRCA1* y *BRCA2* se relacionan con mayor probabilidad de desarrollar cáncer de mama y de ovario [4], la exposición a radiación ultravioleta (UV) es el factor principal para el desarrollo de melanoma [5], la infección con el virus del papiloma humano (VPH) tiene un papel causal en el cáncer cervicouterino [6], y la exposición a las diferentes sustancias derivadas del consumo del tabaco es la principal causa de cáncer pulmonar [7].

### **Cáncer pulmonar**

El cáncer pulmonar es el cáncer con un mayor mortalidad en el mundo, con más de 1.7 millones de defunciones en 2018 [8]. Es uno de los tipos de cáncer con peor pronóstico, con una supervivencia a 5 años en apenas 10% a 15% de los pacientes [7]. Se divide en carcinoma de células pequeñas (SCLC) y carcinoma de células no pequeñas (NSCLC). Este último grupo representa más del 80% de todos los casos e incluye tres tipos histológicos, adenocarcinoma; carcinoma de células escamosas

y carcinoma de células grandes, que difieren entre sí en histología, patrón mutacional y respuesta a tratamientos específicos [9, 10] (Figura 1).



**Figura 1. Clasificación histológica del cáncer de pulmón.** Los porcentajes representan la incidencia de los diferentes subtipos respecto al total de casos de cáncer pulmonar [10].

El adenocarcinoma es el tipo histológico más frecuente, representa casi el 50% de todos los casos de cáncer de pulmón en los Estados Unidos [10]. Este subtipo presenta una morfología glandular y para su diagnóstico puede buscarse la expresión de marcadores específicos de este histotipo, como el factor de transcripción tiroideo 1 (TTF-1) [7]. A su vez, y dependiendo del patrón de crecimiento que presenten las células tumorales, los adenocarcinomas pulmonares pueden dividirse en cinco subtipos: lepidico, acinar, papilar, micropapilar o sólido. El patrón lepidico presenta neumocitos atípicos que delimitan la pared alveolar, sin componente invasivo, el patrón acinar se caracteriza por células tumorales que forman glándulas ovaladas, el patrón papilar presenta células tumorales glandulares que crecen en la superficie de núcleos fibrovasculares, mientras que en el patrón micropapilar, las células tumorales forman papilas pero carecen de los núcleos fibrovasculares. Finalmente, en el patrón sólido, las células crecen en lámina y

presentan núcleos hipercromáticos (Figura 2). Aunque se han realizado clasificaciones más exhaustivas con base en la identificación de marcadores genéticos y moleculares [11], esta clasificación se aplica comúnmente en la clínica y se ha reportado que el patrón de crecimiento predominante está relacionado con el pronóstico de la enfermedad [12].

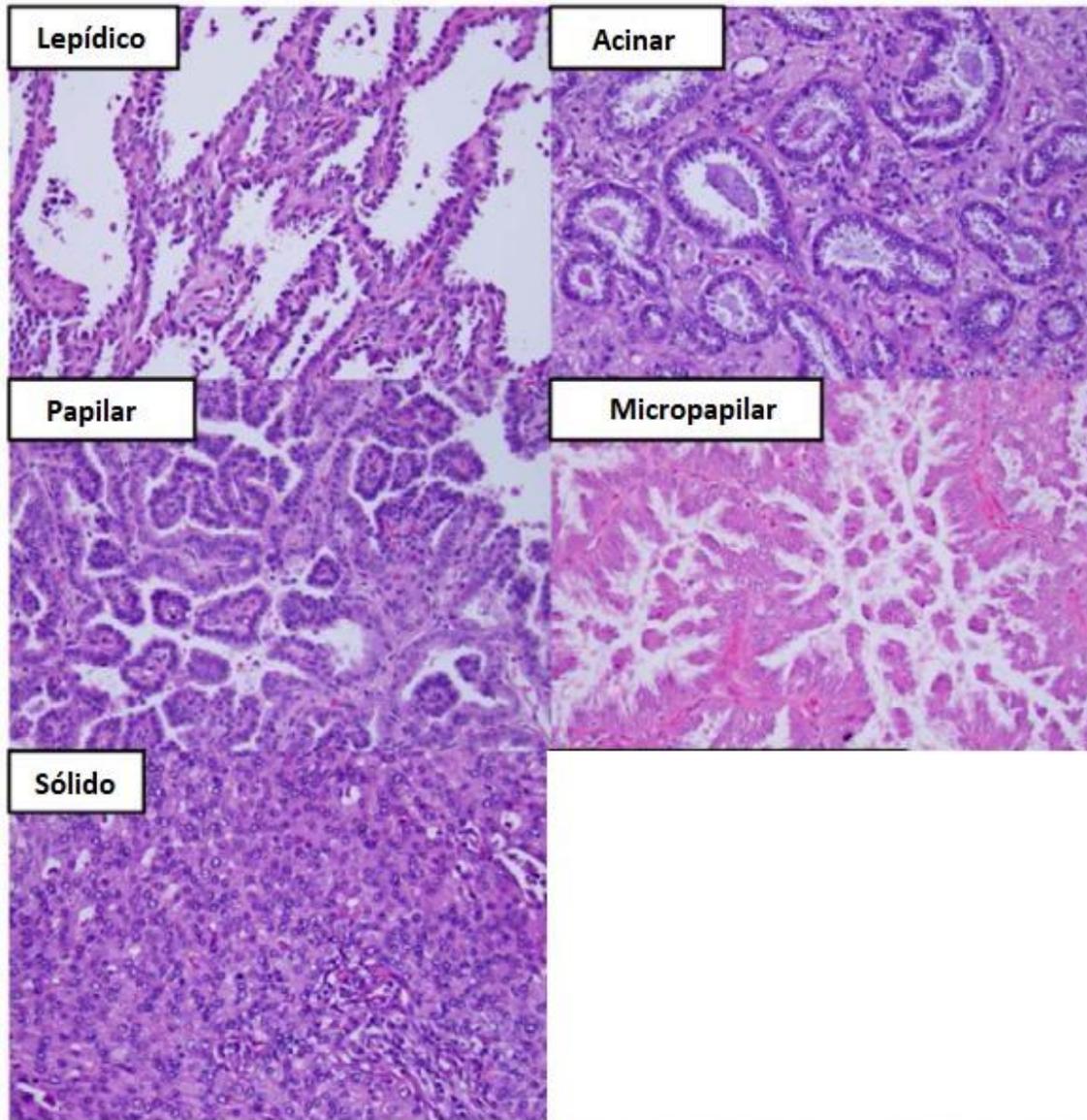


Figura 2. Subtipos histológicos de adenocarcinoma de acuerdo con su patrón de crecimiento. Modificada de Eguchi, *et al.* (2014). Major histologic subtypes of lung adenocarcinoma.

Además de la clasificación por subtipos histológicos, existen otros sistemas de clasificación que buscan evaluar la etapa de la enfermedad, así como el pronóstico y respuesta al tratamiento. Estos sistemas de clasificación suelen basarse en características histopatológicas, como el tamaño del tumor, su grado de invasión al estroma, la morfología de las células tumorales, la expresión aberrante de marcadores proteicos o genéticos, entre otros.

Entre estos sistemas de clasificación destaca el sistema de estadificación TNM como el estándar más empleado internacionalmente. Se basa en el registro de la extensión del tumor primario (T), la infiltración a ganglios linfáticos (N) y la presencia o ausencia de metástasis (M) [13]. Este sistema ha mostrado ser de valor pronóstico en diferentes tipos de cáncer, incluyendo carcinoma pulmonar de células no pequeñas.

## **Carcinogénesis**

El proceso de transformación de células normales a células tumorales, denominado carcinogénesis, es sumamente complejo e involucra una gran cantidad de alteraciones celulares. Sin embargo, este proceso puede ser estudiado en tres etapas principales: iniciación, promoción y progresión. El mayor impacto de los agentes carcinógenos, como los generados por el hábito tabáquico, ocurre en las etapas de iniciación y promoción.

Durante la etapa de iniciación, las alteraciones genéticas o epigenéticas que generan los agentes carcinógenos brindan a las células una mayor capacidad de proliferar, pero éstas mantienen características morfológicas y funcionales normales; se dice que son células “iniciadas”.

El proceso de expansión clonal es la característica principal de la etapa de promoción. En este proceso las células iniciadas sufren alteraciones adicionales que les permiten proliferar de manera descontrolada, generando una cantidad excesiva de células con morfología y función similares a las de la original, lo que se conoce como hiperplasia.

La cantidad anormal y en constante aumento de células en el sitio, así como los mecanismos del organismo dedicados a mantener el orden en los tejidos, representan condiciones desfavorables para la supervivencia y desarrollo de las células transformadas. Estas condiciones eliminan a las células que no pueden adaptarse a ellas, de manera que sobreviven sólo las células con las características necesarias para superar tal presión; células por completo transformadas y con tal cantidad de alteraciones que desarrollan una función y morfología completamente diferentes a las de la célula original. Este proceso, conocido como de selección clonal, es característico de la etapa de progresión

### **Hallmarks del cáncer**

Aunque los diferentes tipos de cáncer presentan características distintivas y la población de células que forma un mismo tumor es heterogénea, las condiciones que deben superar las células cancerosas durante su transformación y desarrollo son similares. Por lo tanto, las estrategias que emplean todas las células cancerosas son semejantes. Así, el proceso de patogénesis tumoral puede ser entendido en función de la necesidad de las células cancerosas de superar las diferentes presiones a las que se ven sometidas [14]

Por ejemplo, el entorno y las células a partir de los que se desarrollan el cáncer de pulmón y el cáncer de colon son completamente diferentes, pero para que en ambos tejidos se desarrolle el cáncer, las células necesitan presentar alteraciones similares.

Algunas de estas alteraciones fueron descritas en el año 2000, y posteriormente en 2011, por Hanahan y Weinberg como una lista de características denominadas *hallmarks del cáncer* [14]. Estos hallmarks son desarrollados en común por las células tumorales y son necesarios para el desarrollo del cáncer:

A grandes rasgos, para que una célula prolifere de manera descontrolada necesita tener una capacidad ilimitada de multiplicarse, recibir una mayor cantidad de señales de proliferación, así como evadir las señales de supresión y de muerte celular. Además, los requerimientos nutricionales de las células en constante proliferación no pueden ser cubiertos de la misma manera que en tejidos sanos, por

lo que las células tumorales modifican su metabolismo, inducen la formación de nuevos vasos sanguíneos para obtener más nutrientes y oxígeno, o bien, desarrollan la capacidad de invadir áreas cercanas o migrar a otros tejidos con condiciones más favorables, un proceso conocido como metástasis [14].

Desde un punto de vista evolutivo, para que dentro de una población puedan surgir individuos con características especiales que les permitan sobrepasar las presiones a las que se ven sometidos, es necesaria una fuente de variación [15]. Las células tumorales obtienen esta variación de la inestabilidad de su genoma, causante de mutaciones constantes, lo que genera una población heterogénea con diferentes características y a partir de la cual se seleccionarán las células que mejor puedan responder a los retos a los que se enfrenten. Esta inestabilidad genómica es una característica del cáncer que puede dar origen a las demás [16].

Por último, recientemente se ha reconocido lo importante que es la relación del sistema inmunológico con las células tumorales. En primer lugar, porque algunas de las células y moléculas que participan en eventos de inflamación resultan favorables para el desarrollo de las células tumorales y en segundo lugar, porque para que estas células sobrevivan es necesario que desarrollen mecanismos para evitar la eliminación mediada por el sistema inmunológico.

Muchas de las terapias empleadas actualmente para el tratamiento de los diferentes tipos de cáncer están diseñadas para alterar estos hallmarks y aquellas que se basan en mejorar el papel del sistema inmunológico en la eliminación de las células tumorales han mostrado mayor eficacia que las terapias convencionales como la radioterapia o la quimioterapia [17].

### **Sistema inmunológico y cáncer**

La participación del sistema inmunológico en el reconocimiento y eliminación de tumores ha sido reconocida desde finales del siglo XIX y cuenta con diversas evidencias clínicas y experimentales [18]. Por una parte, en estudios clínicos se había observado una mayor incidencia de cáncer en pacientes inmunodeprimidos, o bien, que presentan algún defecto en su respuesta inmunológica. De esto se infiere que el sistema inmunológico parece proteger al organismo de la formación

de células transformadas, por lo que alguna afectación en este sistema favorecería el desarrollo de tumores. Por otra parte, en modelos murinos se había propuesto a la respuesta inmunológica como la responsable en la eliminación de un tumor al ser trasplantado de un ratón a otro. Teóricamente, el sistema inmunológico del ratón receptor estaría reconociendo y eliminando a las células tumorales trasplantadas.

Basados en estas evidencias, M.F. Burnet y L. Thomas propusieron la teoría de la *inmunovigilancia*. Esta teoría propone que la transformación celular ocurre constantemente en el organismo y que el proceso de carcinogénesis genera en las células antígenos particulares, llamados antígenos tumorales o neoantígenos [19]. Según esta teoría, los componentes de la respuesta inmunológica serían capaces de distinguir a las células transformadas y eliminarlas antes de que progresen. De esta manera, el sistema inmunológico participaría protegiendo al organismo, no sólo de agentes patógenos como virus, hongos o bacterias, sino también de células tumorales [20].

Sin embargo, es evidente que este proceso no es completamente eficiente o que las células tumorales consiguen evadirlo, puesto que el cáncer puede presentarse incluso en individuos inmunocompetentes. Así, el proceso de inmunovigilancia describe sólo una parte de la compleja relación entre el sistema inmunológico y el cáncer [21].

En cambio, la teoría de la *inmunoedición* describe un proceso más completo, dividido en tres etapas. En la etapa inicial, o de *eliminación*, las células transformadas pueden ser reconocidas y eliminadas por la respuesta inmunológica, con lo que se evita el desarrollo del cáncer. En la etapa de *equilibrio*, la presión que representa la eliminación constante de células tumorales resulta en la selección de aquellas con características menos inmunogénicas, que presentan una menor cantidad de antígenos tumorales, disminuyendo la capacidad del sistema inmunológico de eliminar por completo a la población de células. Eventualmente, en la etapa de *escape*, las células que sobreviven a la presión inmunológica son sólo aquellas que no pueden ser reconocidas ni eliminadas y por lo tanto, escapan a la destrucción por parte de la respuesta inmunológica [22].

Actualmente se busca entender el papel que tienen los diferentes componentes del sistema inmunológico en el desarrollo de la enfermedad. Se sabe que en el interior de los tumores sólidos o en la periferia, puede encontrarse prácticamente cualquier tipo de células de la respuesta inmunológica tanto innata: macrófagos, células dendríticas, células cebadas, células NK; como adaptativa: linfocitos con fenotipo naive y de memoria, linfocitos B y T, incluyendo sus diferentes poblaciones, Th1, Th2, Th17, Treg, Tfh y T citotóxicos [23].

La presencia de linfocitos infiltrantes del tumor (TILs) es el evento mejor estudiado en la respuesta inmunológica al cáncer, de tal manera que la relación entre el tipo, densidad y localización de los TILs ha sido sugerida como marcador de pronóstico de la enfermedad y de respuesta al tratamiento [24, 25].

Considerando la gran cantidad de células y moléculas que participan, la relación sistema inmunológico-cáncer resulta un tema sumamente complejo. Sin embargo, para fines de estudio, el proceso de eliminación de las células tumorales puede ser estudiado como una serie de pasos, que inicia con la liberación de antígenos tumorales y culmina con la eliminación de las células transformadas por células citotóxicas.

Este proceso es conocido como el *ciclo de inmunidad al cáncer* y comienza cuando neoantígenos son liberados al medio. Esto puede ocurrir debido a la muerte de las células tumorales, inducida por las condiciones del tumor, como la hipoxia, o por la acción de células del sistema inmunológico innato, como células NK o NKT. Estos neoantígenos son capturados por las células presentadoras de antígenos, como macrófagos o células dendríticas, procesados y presentados en moléculas del MHC. Las células presentadoras de antígenos migran a los órganos linfoides secundarios, donde los neoantígenos, asociados a moléculas del MHC, puede interactuar con los receptores de los linfocitos T (TCR) y en las condiciones apropiadas, activarlos. Los linfocitos ya activados, siguen gradientes quimiotácticos que los dirigen fuera de los órganos linfoides secundarios y salen de los vasos sanguíneos hacia la zona del tumor, mediante el proceso de diapedesis. Los linfocitos T CD8 reconocen los neoantígenos que las células tumorales presentan en sus moléculas de clase I del

MHC, lo que les permite realizar su actividad citotóxica. Finalmente, los linfocitos T citotóxicos (CTLs) eliminan a las células tumorales mediante la secreción de granzimas y perforinas o la vía de Fas/FasL. La muerte estas células libera más antígenos tumorales, iniciando nuevamente el ciclo (Figura 3) [26].

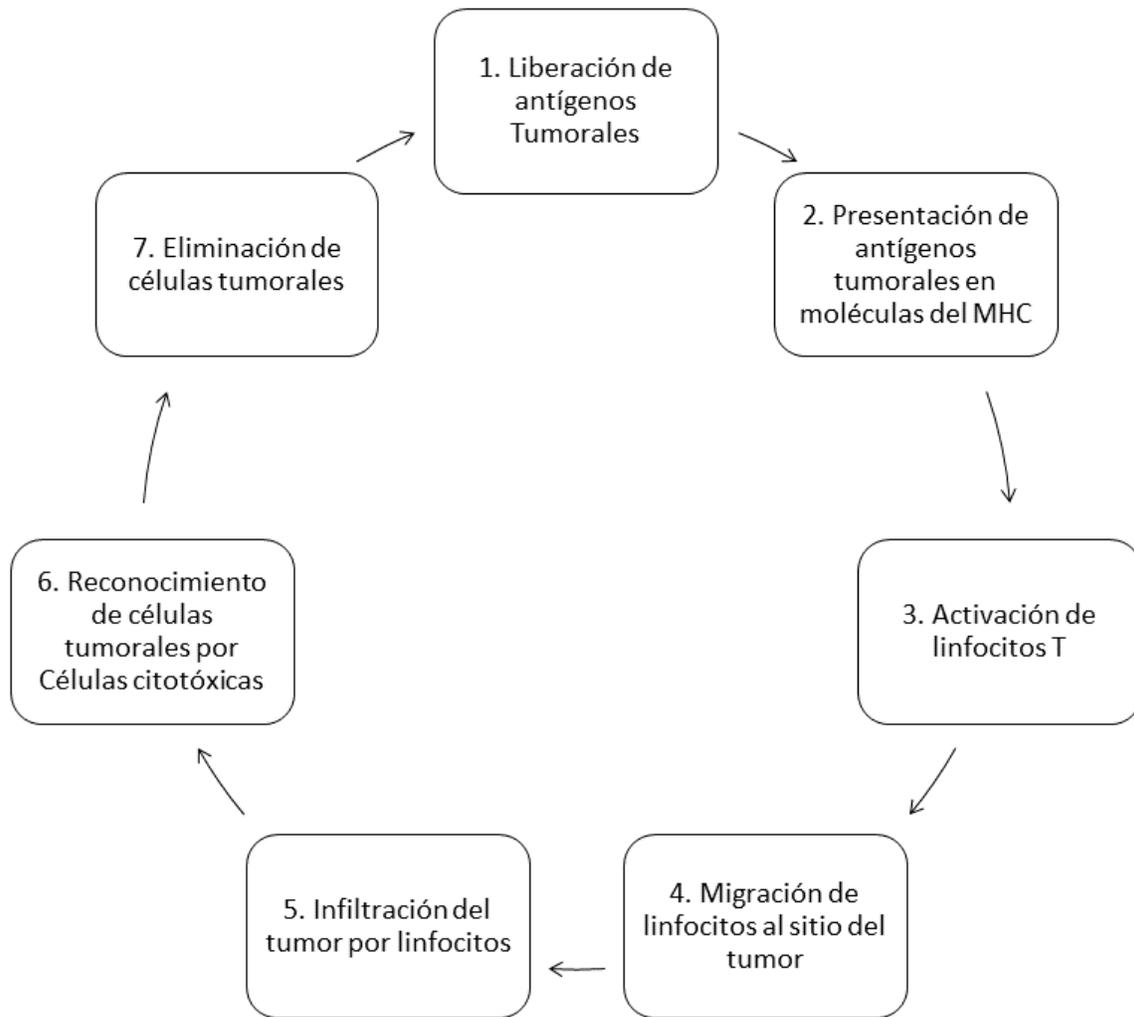


Figura 3. Ciclo de inmunidad al cáncer.

## **Evasión de la respuesta inmunológica**

Para limitar la respuesta inmunológica y prevenir patologías derivadas de ésta, el sistema inmunológico cuenta con mecanismos reguladores que se encargan de controlar sus mecanismos efectores y disminuir su actividad, una vez resuelto el evento que generó su activación.

Las células tumorales alteran la expresión o la actividad de estos mecanismos reguladores para evitar la eliminación por parte del sistema inmunológico. De esta manera, la evasión de la respuesta inmunológica no ocurre por la generación de mecanismos ajenos al organismo; sino por la desregulación de procesos ya existentes.

Los mecanismos de evasión que emplean las células tumorales se basan en generar un microambiente de tolerancia, mediante el reclutamiento de células con actividad reguladora y la inducción de citocinas antiinflamatorias. El ambiente de tolerancia obstaculiza la eliminación de las células tumorales por los diferentes componentes de la respuesta inmunológica.

Las células que tienen el papel de regular la actividad de los mecanismos efectores, en el contexto del cáncer, son principalmente los linfocitos T reguladores y las células supresoras derivadas del linaje mieloide (MDSC). Los linfocitos T reguladores actúan disminuyendo la actividad de la respuesta inmunológica al secretar citocinas antiinflamatorias, como IL-10 o TGF- $\beta$ , al competir por las moléculas de coestimulación de los linfocitos T, como CD80/CD86, o directamente al eliminar a las células efectoras [27]. Las MDSC se presentan en pacientes con cáncer y no en individuos sanos, tienen la capacidad de inducir linfocitos T reguladores y en general, limitar la actividad de la respuesta inmunológica al cáncer [28].

En etapas más avanzadas, las células tumorales pueden presentar una menor inmunogenicidad, lo que favorece su escape puesto que no pueden ser reconocidas por el sistema inmunológico. Esto ocurre al variar o disminuir la expresión de

neoantígenos pero también al alterar la vía de presentación de antígenos, particularmente en moléculas de clase I del MHC [29].

Un mecanismo de inhibición que ha recibido especial atención como blanco para el tratamiento del cáncer es la expresión de moléculas inhibidoras de la respuesta inmunológica, llamadas puntos de control o *checkpoints* inmunológicos. Estas moléculas tienen la función de limitar la activación de los linfocitos T y otras células efectoras, para evitar procesos de autoinmunidad. Entre las moléculas más estudiadas se encuentran CTLA-4, la vía de PD-1/PD-L1, TIM-3, LAG-3, BTLA-4 y TIGIT. Particularmente, la molécula TIGIT, en interacción con su ligando de mayor afinidad CD155, puede afectar el ciclo de inmunidad al cáncer (Figura 3) en sus diferentes etapas [30].

La expresión de estas moléculas, y su interacción con sus respectivos ligandos, disminuye la proliferación y secreción de citocinas proinflamatorias en linfocitos T cooperadores, así como la actividad citotóxica en células NK y linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Especialmente en las células citotóxicas, la expresión de los diferentes checkpoints inmunológicos es característica del estado de “agotamiento”, en el que las células pierden gradualmente sus funciones efectoras, como secreción de IL-2, IFN- $\gamma$  o producción de granzima-B [31].

Las alteraciones de los procesos de reconocimiento y eliminación de las células tumorales favorecen su supervivencia y son una parte importante de la patogénesis del cáncer.

El bloqueo de los checkpoints inmunológicos, mediante el uso de anticuerpos monoclonales, ha mostrado una mejora significativa en la supervivencia de los pacientes, en comparación con las terapias convencionales [32]. Por esta razón, el estudio de estas moléculas y sus ligandos puede ser de gran utilidad en la búsqueda de marcadores de pronóstico y blancos terapéuticos.

## El contexto inmunológico en los tumores sólidos

La base de los sistemas convencionales de clasificación de los tumores sólidos es la descripción histopatológica de las muestras de tejido, buscando principalmente características de las células tumorales, por lo que no suelen tomar en cuenta otras células o moléculas presentes en el sitio. Los sistemas de clasificación convencionales son por tanto incompletos, pues no consideran la importancia que tienen los diferentes componentes del sistema inmunológico en el desarrollo del cáncer. De hecho, se ha demostrado que la sobrevida de distintos pacientes, con la misma categoría TNM puede variar significativamente [33]. Por lo tanto, se ha propuesto el uso de otras mediciones que incorporen datos sobre el microambiente tumoral y que podrían mejorar el valor pronóstico del sistema TNM.

Debido al efecto protumoral que pueden tener los componentes del sistema inmunológico en eventos de inflamación, se ha propuesto la evaluación de células inmunológicas circulantes como un parámetro que se relaciona con el pronóstico de la enfermedad. Puesto que los neutrófilos y las plaquetas pueden favorecer en las células tumorales la adhesión y migración a órganos distantes y los linfocitos tienen un papel fundamental en la respuesta antitumoral, el *Índice de Inflamación Sistémica* (SII) surge como un parámetro basado en una relación de linfocitos, neutrófilos y plaquetas ( $SII = \frac{\text{Neutrófilos} * \text{Plaquetas}}{\text{Linfocitos}}$ ) que ha mostrado tener un importante valor pronóstico en diferentes tipos de cáncer. Un valor de SII alto se relaciona con una menor sobrevida de los pacientes [34, 35].

Por otra parte, el parámetro denominado como *inmunoscore* busca clasificar los tumores sólidos con base en la presencia de infiltrados de células del sistema inmunológico, especialmente de linfocitos T CD3<sup>+</sup>, linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> y linfocitos T de memoria CD45RO<sup>+</sup>. La cantidad de estas células es cuantificada y, de manera similar al sistema TNM, los tumores son clasificados en cinco categorías (I0-I4) con base en la cantidad y localización de las células inmunológicas. La presencia de estas células se ha relacionado con una mayor sobrevida libre de enfermedad y mayor sobrevida global de los pacientes [25], de manera incluso superior al sistema de clasificación TNM [36].

Los resultados obtenidos con las terapias inmunológicas han ampliado la visión de la inmunidad al cáncer. Actualmente se considera no sólo que la respuesta inmune puede dar forma a algunas de las características de las células tumorales, sino que a su vez, los mecanismos de evasión de las células tumorales influyen las características de la respuesta inmunológica [37]. Considerando esto, Chen y Mellman propusieron la clasificación de los tumores sólidos en tres *perfiles o fenotipos inmunes*: el fenotipo inflamado, el fenotipo excluido y el fenotipo desértico. El fenotipo inflamado se caracteriza por la presencia de linfocitos CD3<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en contacto con las células tumorales, en el fenotipo excluido se observa la presencia de células inmunológicas retenidas en el estroma cercano a las células tumorales, mientras que el fenotipo desértico se distingue por la ausencia total de linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

## CD155

La molécula CD155, mejor conocida como PVR por su papel como receptor del virus de la poliomielitis, es una molécula de adhesión de la familia de las moléculas semejantes a las nectinas (Nect-5). Su expresión se considera mínima en la mayoría de los tejidos sanos, pero puede aumentar en tejidos con una tasa alta de proliferación, como el hígado en regeneración. Además, puede expresarse en células dendríticas y macrófagos como molécula de coestimulación de linfocitos y células NK [38].

Por eventos de *splicing* pueden producirse 4 variantes de esta molécula: las isoformas  $\alpha$  y  $\delta$  son expresadas en la membrana de las células, mientras que  $\beta$  y  $\gamma$  son isoformas solubles por su carencia de un dominio transmembranal [39].

Entre las funciones de esta molécula se encuentran su participación en la adhesión, proliferación y migración celular. La adhesión ocurre al interactuar en *trans* con Nectina-3, en las etapas iniciales del contacto célula-célula [40]. El proceso de proliferación se ve favorecido por CD155 al inducir la activación de la vía de MAP cinasas, la expresión de las ciclinas D2 y E, así como al disminuir la expresión del regulador del ciclo celular p27 [41], además de inhibir a la molécula Sprouty-2, que actúa como regulador negativo de la proliferación celular en respuesta a factores de crecimiento [42]. Experimentalmente, la migración se ve disminuida en células con una menor expresión de CD155 [43], además de que la presencia de esta molécula, en asociación con la integrina  $\alpha\beta 3$  y el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), es una característica de células en migración.

Además, la molécula CD155 participa en la regulación de la respuesta inmunológica al interactuar con las moléculas CD226, TIGIT y CD96, expresadas por linfocitos y células NK, en donde CD226 tiene función activadora, mientras que TIGIT y CD96 tienen función inhibidora

De manera similar a lo que ocurre durante la activación e inhibición de linfocitos por la interacción entre las moléculas CD80 y CD86 y las moléculas CD28 y CTLA-4, la interacción de CD226 con CD155 induce la activación de linfocitos CD4, CD8 y de

células NK, mientras que los receptores TIGIT y CD96 tienen una función de inhibición de estas células efectoras al interactuar con CD155.

La interacción de CD226 con CD155 induce la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8 y células NK, favoreciendo la eliminación de las células CD155 positivas [44]. Sin embargo, se ha mostrado que la expresión de CD226 se ve disminuida tras una estimulación crónica con CD155, lo que disminuye la capacidad citotóxica de las células NK [45].

El receptor mejor estudiado dentro de esta vía es TIGIT y su expresión se ha relacionado con la disminución de la actividad citotóxica y de la secreción de citocinas proinflamatorias [46, 47], así como con la inhibición de la actividad de linfocitos con perfiles Th1 y Th17, pero no Th2 [48]. Adicionalmente, cuando esta interacción ocurre entre linfocitos TIGIT<sup>+</sup> y células dendríticas CD155<sup>+</sup>, las células dendríticas disminuyen la expresión de IL-12 y desarrollan un fenotipo inmunoregulador, con la producción de IL-10 [49], lo que favorece la supresión de las células efectoras. De esta manera, la interacción de TIGIT con CD155 tiene un papel importante al interferir con la respuesta antitumoral en sus diferentes etapas [30].

Se considera que la expresión de CD155 en tejidos sanos es mínima, pero, dado que las funciones de esta molécula pueden favorecer los procesos de proliferación, migración, metástasis y evasión de la respuesta inmunológica de las células tumorales, su expresión se ve aumentada en diferentes tipos de cáncer [50].

## ANTECEDENTES

La molécula CD155 tiene una baja expresión en tejidos sanos. Diversos estudios han mostrado que se encuentra sobrepresada en células y tejidos de diferentes tipos de cáncer, como cáncer colorrectal [51], melanoma [52], cáncer pancreático [53] y adenocarcinoma pulmonar [54], tanto en la superficie de las células tumorales, como secretada en sus isoformas solubles [55]. Se ha observado que la mayor expresión de esta molécula se relaciona con un mal pronóstico de la enfermedad [52, 54]. Esta molécula se encuentra involucrada en procesos que pueden favorecer el desarrollo del cáncer, al promover directamente el desarrollo de las células tumorales y al evitar su eliminación por el sistema inmunológico modulando la respuesta antitumoral.

Respecto al desarrollo de las células tumorales, en un modelo murino se demostró que la expresión de CD155 es importante para la patogénesis tumoral, ya que la disminución en su expresión en células tumorales se relacionó con la disminución en su crecimiento y capacidad de hacer metástasis [56]. Adicionalmente, en un estudio realizado en colangiocarcinoma se demostró que una mayor expresión de CD155 en las células tumorales tiene una asociación significativa con parámetros clínico-patológicos comúnmente asociados con mal pronóstico, como mayor tamaño del tumor, mayor invasión a ganglios linfáticos, presencia de metástasis y angiogénesis [57].

En cuanto a la regulación de la respuesta antitumoral, la molécula CD155 puede intervenir de diferentes maneras, por una parte, su interacción con los receptores TIGIT y CD96 disminuye las funciones efectoras de células NK [47] y linfocitos infiltrantes de tumor [58], mientras que genera un ambiente antiinflamatorio debido al aumento de la actividad de linfocitos T reguladores [48] y al fenotipo tolerogénico generado en las células dendríticas [49]. Adicionalmente se ha mostrado que, en condiciones crónicas, la interacción de CD155 con el receptor activador CD226 puede causar la endocitosis de CD226, disminuyendo la actividad de las células citotóxicas [45]. De hecho, se ha reportado que la expresión CD155 tiene una

relación negativa con la presencia de linfocitos CD8 infiltrantes de tumor en cáncer pancreático [53].

Se sabe que el fenotipo inmune de los tumores sólidos depende de los mecanismos de evasión que presentan las células tumorales, es decir; la ausencia de inmunogenicidad del tumor y la disminución de señales de coestimulación, evitan la activación de una respuesta antitumoral y, por lo tanto, resultan en un fenotipo desértico. En cambio, la generación de un fenotipo excluido se debe a la presencia de mecanismos que evitan que las células inmunes entren en contacto con las células tumorales. Y finalmente, un fenotipo inflamado se presenta como resultado de una activación adecuada de la inmunidad antitumoral, en la que las células efectoras pueden alcanzar a las células tumorales, pero que presentan afectaciones en sus mecanismos efectores [37].

Los procesos en los que CD155 participa sugieren que su sobreexpresión por las células tumorales podría relacionarse con un fenotipo inmune, dependiendo de la etapa de la respuesta antitumoral en que esta sobreexpresión tenga un mayor impacto: activación de los linfocitos, infiltración del tumor o evasión de los mecanismos efectores. Chen y Mellman sugieren que la sobreexpresión CD155 podría estar relacionada con el fenotipo inflamado [37]

## **HIPÓTESIS**

La expresión relativa de la molécula CD155 será mayor en los casos de adenocarcinoma pulmonar con parámetros clínico-patológicos de peor pronóstico, como subtipos histológicos más agresivos, estadios más avanzados, mayor Índice de Inflamación Sistémica, menor cantidad de linfocitos CD8 o fenotipo inflamado.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la expresión relativa de la molécula CD155 en biopsias de adenocarcinoma pulmonar y asociarla con el subtipo histológico, el estado de TNM, Índice de Inflamación sistémica, cantidad de linfocitos CD8 en el infiltrado inflamatorio y el fenotipo inmune del tumor.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Clasificar los casos en función del subtipo histológico predominante
- Obtener del archivo clínico los parámetros de TNM y cantidad de linfocitos, neutrófilos y plaquetas
- Cuantificar la expresión relativa la molécula CD155 en los casos de adenocarcinoma pulmonar.
- Cuantificar la cantidad de linfocitos CD8 en el infiltrado inflamatorio
- Clasificar los casos en función de su fenotipo inmune
- Evaluar la posible asociación entre la expresión de CD155 con los parámetros clínico-patológicos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### *Material biológico*

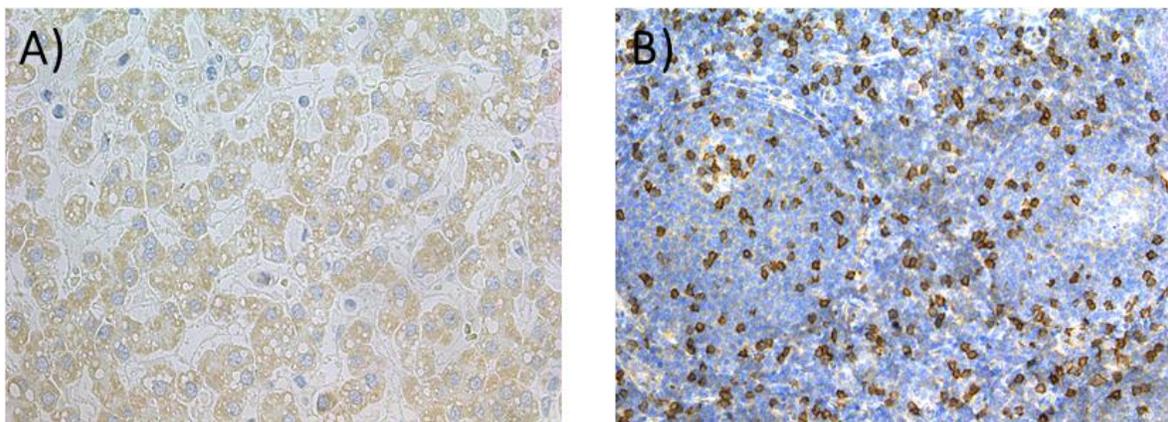
Las muestras empleadas en este estudio fueron biopsias de 28 pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar, proporcionadas por el Departamento de Patología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Del archivo clínico se obtuvo el diagnóstico final de los casos, su estado de TNM, y los valores de biometría hemática para el cálculo del Índice de Inflamación Sistémica.

De las biopsias fijadas en paraformaldehído y embebidas en parafina se obtuvieron cortes seriados de 4 micrómetros de grosor, empleados posteriormente para las tinciones de eosina-hematoxilina e inmunohistoquímica. El subtipo de adenocarcinoma predominante en la biopsia se determinó mediante la evaluación histológica de las laminillas con tinción de eosina-hematoxilina.

### *Tinción inmunohistoquímica*

La tinción inmunohistoquímica se realizó con algunas modificaciones al procedimiento de Aguilar-Cazares y colaboradores [59]. Para eliminar la parafina, las laminillas fueron calentadas a 60 °C por 30 minutos y, tratadas posteriormente, con Xilol por 5 minutos. El tejido se rehidrató con pases en etanol a concentraciones decrecientes desde 100% hasta 30% y finalmente agua. Se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena incubando las laminillas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% (v/v), diluido en metanol. La recuperación de antígenos se realizó empleando buffer de citratos 0.1M y pH 6 en una cámara de recuperación de antígenos (Biocare) a 110 °C y 6 psi durante 20 minutos. Se empleo PBS-suero de cerdo al 2% durante 30 minutos, a temperatura ambiente (TA) para evitar la unión inespecífica del anticuerpo primario. Se emplearon los anticuerpos anti-CD155 (Sigma-Aldrich, HPA012568) en una dilución 1:100 o anti-CD8 (Abcam) en dilución 1:75 y se incubaron a 32°C durante una hora y posteriormente a 4°C durante toda la noche. Al terminar las incubaciones se realizaron lavados con PBS-Tween al 0.1% y PBS para eliminar el excedente de anticuerpo. El anticuerpo secundario biotinilado (Genetex) se empleó en una dilución 1:150 y se incubó a 32 °C durante una hora. Tras los lavados con PBS, las laminillas se incubaron con un sistema avidina-biotina-peroxidasa (Vector), en una

dilución de 1:125, a 32°C durante 30 minutos. Se empleó diaminobencidina (SIGMA) al 0.04% como cromógeno y peróxido de hidrógeno al 3% como sustrato de la enzima peroxidasa. La reacción cromogénica se incubó durante 10 minutos para la tinción de CD155 y durante 5 minutos para la tinción de CD8 y se detuvo con agua. Posteriormente se realizó una contratinción con hematoxilina (Vector) durante 45 segundos. Finalmente, los tejidos se deshidrataron con pases sucesivos en concentraciones crecientes de etanol y xilol y se montaron con resina como medio de montaje no acuoso para microscopía (Entellan). Como control positivo para la tinción inmunohistoquímica de CD155 se empleó tejido de hepatocarcinoma, mientras que para la tinción de CD8 se emplearon biopsias de amígdala (Figura 4).



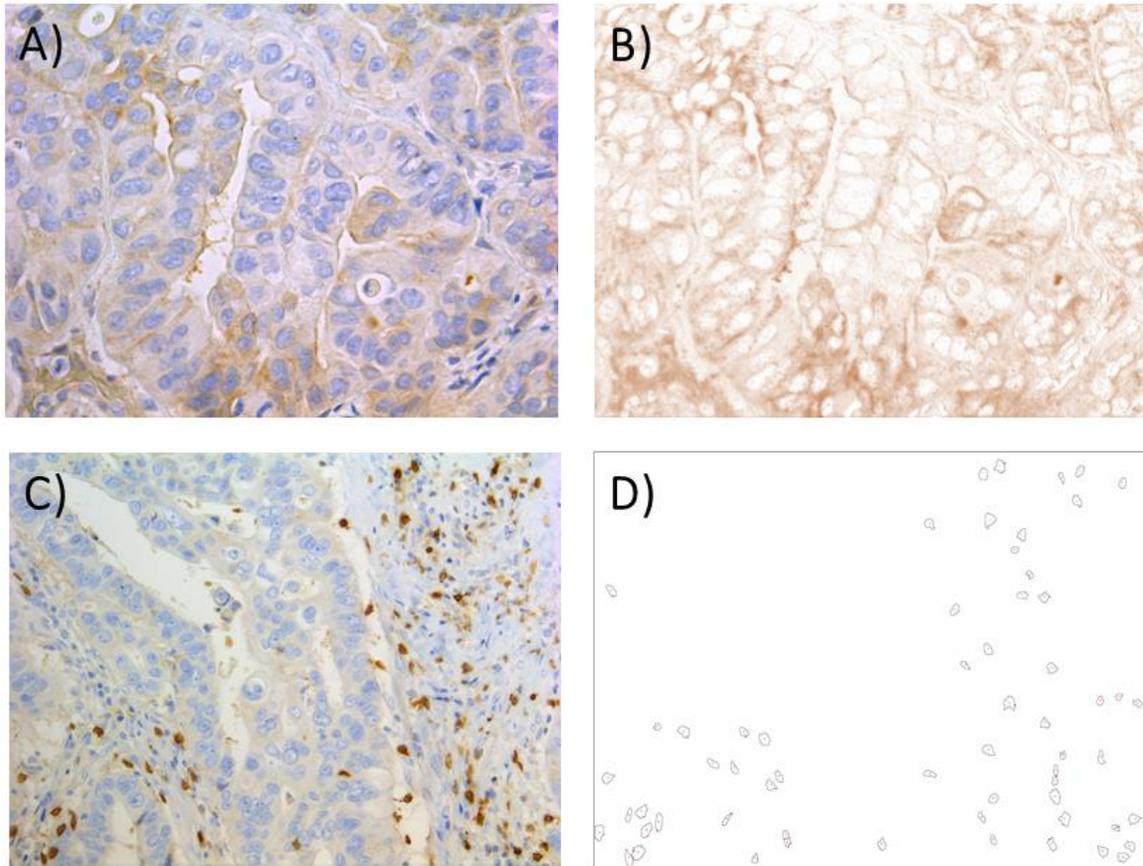
**Figura 4.** Imágenes representativas de los controles empleados. A) Tinción de CD155 en biopsia hepatocarcinoma Aumento 40X B) Tinción de CD8 en amígdala. Aumento 20X

### *Análisis de los casos*

Empleando un microscopio Leica (Leica) se tomaron fotografías de 6 campos representativos de cada tinción, con un aumento de 40X para la tinción de CD155 y de 20X para la de CD8. Para la cuantificación de CD155 se evaluó la expresión relativa, en términos de densidad óptica (DO), mientras que para la tinción de CD8 se evaluó la cantidad de células positivas por campo. Adicionalmente, la tinción de CD8 en los casos de adenocarcinoma se empleó para determinar su fenotipo inmune.

El análisis para CD155 se realizó mediante la deconvolución de colores para tinciones inmunohistoquímicas reveladas con DAB, del *plug in* FIJI del programa ImageJ (Figura 5A y 5B). Se obtuvieron valores de intensidad media correspondientes a la tinción con DAB y se transformaron a DO mediante la fórmula:  $DO = \log\left(\frac{\text{Intensidad máxima}}{\text{Intensidad media}}\right)$ , donde la intensidad máxima es igual a 255 para imágenes de 8 bits. Para definir los grupos de alta y baja expresión de CD155 se estableció como valor de corte la mediana de DO. Aquellos casos con un valor mayor fueron clasificados como de alta expresión, mientras que los de un valor menor, fueron clasificados como de baja expresión.

El análisis para CD8 se realizó, de igual manera con el *plug in* FIJI del programa ImageJ, mediante el conteo de células positivas por campo y eliminando la tinción de fondo al establecer valores de umbral de tinción de DAB y un tamaño mínimo para linfocitos en las células consideradas positivas (partículas) (Figura 5C y 5D).



**Figura 5. Cuantificación de tinciones inmunohistoquímicas.** A) Tinción inmunohistoquímica para CD155 en un caso de adenocarcinoma pulmonar. B) Imagen representativa de la deconvolución de colores correspondiente a la tinción con DAB en el caso presentado en A. C) Tinción inmunohistoquímica para CD8 en el infiltrado inflamatorio de un caso de adenocarcinoma pulmonar. D) Imagen representativa del conteo de partículas correspondientes a las células positivas del caso presentado en C.

### *Análisis estadístico*

El análisis estadístico se realizó con ayuda del programa Graphpad Prism 8, considerando una distribución no normal de los datos. Se empleó la prueba U de Mann-Whitney para la comparación de dos grupos, la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de múltiples grupos y el coeficiente de correlación de Spearman para los análisis de correlación. Se consideró un valor de p menor a 0.05 como estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

Se analizaron 28 casos de tumores primarios de adenocarcinoma pulmonar. El subtipo histológico de los casos, presencia de metástasis, así como la clasificación en función del Índice de Inflamación Sistémica se observan en la Tabla 1.

Tabla 1. Características clínico-patológicas de los casos evaluados.

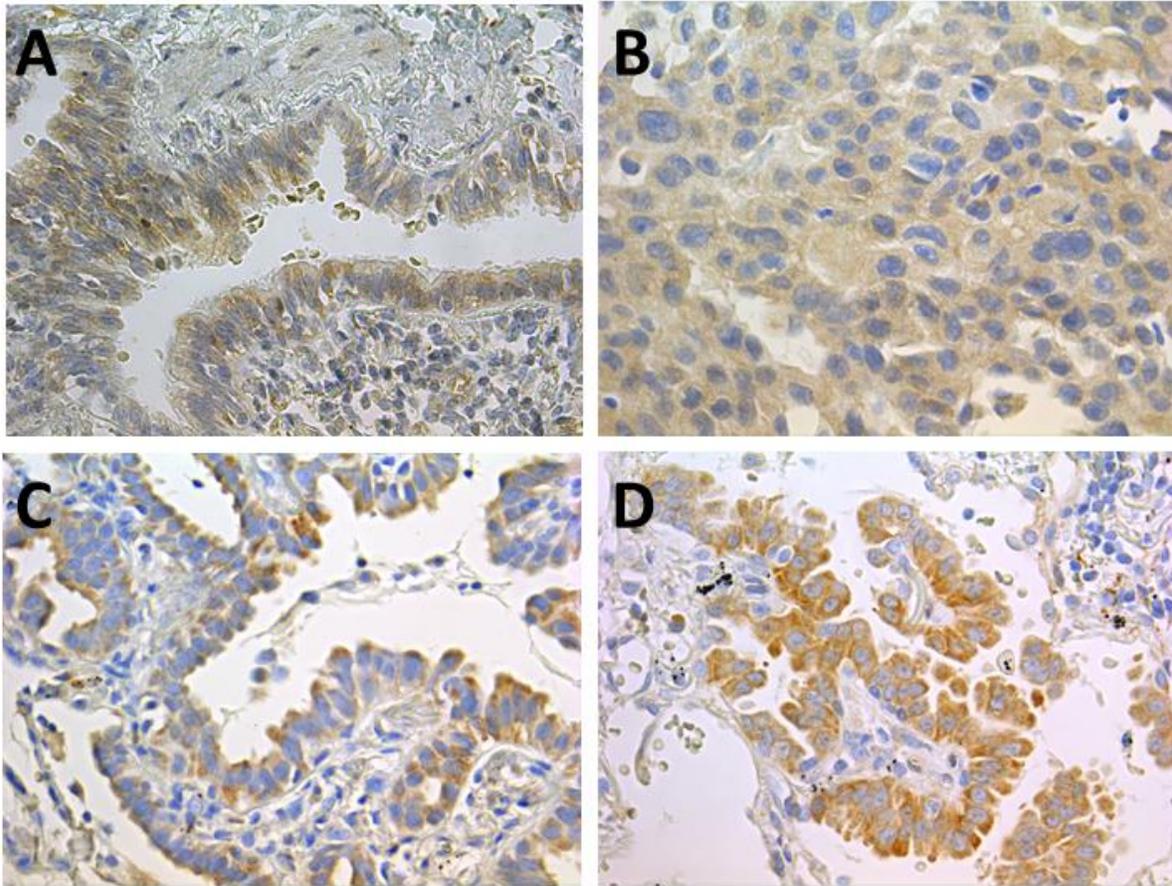
Casos de adenocarcinoma pulmonar		
Total		28
Subtipo histológico		
	Sólido	16
	Acinar	7
	Papilar	2
	Lepídico	3
Metástasis*		
	M0	6
	M1	12
SII**		
	Alto	14
	Bajo	14

\*Los parámetros del sistema de estadificación TNM no pudieron ser obtenidos para todos los casos. M0 Ausencia de metástasis. M1 Metástasis

\*\* Mediana:  $1420 \times 10^9$  células por  $\text{mm}^3$

En función del subtipo histológico predominante de los casos, los subtipos más frecuentes fueron sólido y acinar (16 y 7), mientras que los subtipos papilar y lepídico se encontraron en menor cantidad (2 y 3).

Se realizó la tinción inmunohistoquímica para CD155 en las biopsias, se identificó a las células tumorales como aquellas que presentaron pleomorfismo, cromatina laxa, núcleo anormal y más de un nucleolo (Figura 6). Las células tumorales positivas para esta molécula pueden observarse teñidas en color café.



**Figura 6. Tinción inmunohistoquímica de CD155 en los subtipos histológicos de adenocarcinoma pulmonar.** A) Subtipo acinar B) Subtipo sólido C) Subtipo lepidico D) Subtipo papilar. Los núcleos de las células se observan de color azul como resultado de la contratinción con hematoxilina, mientras que el color café es resultado de presencia de la molécula CD155 presente en las células tumorales. Aumento 40X

La expresión de la molécula CD155, en términos de densidad óptica de la tinción de diaminobencidina, se comparó entre los diferentes subtipos histológicos. Se observó una mayor expresión relativa en los subtipos papilar y sólido respecto a los subtipos acinar y lepidico; sin embargo, la diferencia no llega a ser estadísticamente significativa (Figura 7).

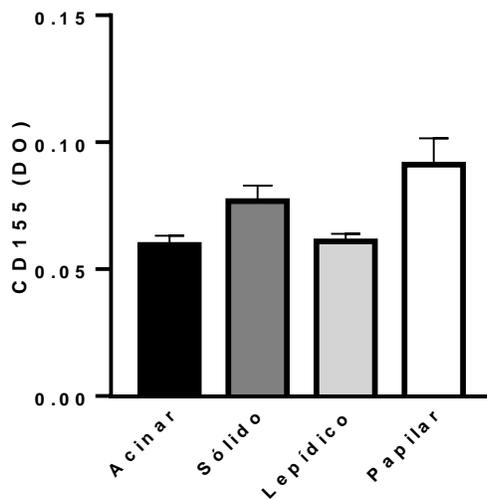


Figura 7. Expresión de CD155 (DO) por subtipo histológico de adenocarcinoma pulmonar. Subtipo acinar n=7, subtipo sólido n=16, subtipo papilar n=2, subtipo lepidico n=3. En la gráfica se ilustran los valores de media y error estándar.

Una vez obtenida la expresión de la molécula CD155, se comparó respecto a los datos de estadificación TNM y SII. Debido a que las biopsias fueron obtenidas de individuos con estadios clínicos avanzados, III y IV, la única variable relevante entre ambos grupos fue la presencia de metástasis. Se observó una expresión similar de CD155 en ambos grupos (Figura 8A). Por otra parte, al comparar la expresión de esta molécula con el SII tampoco se observó diferencia significativa (Figura 8B).

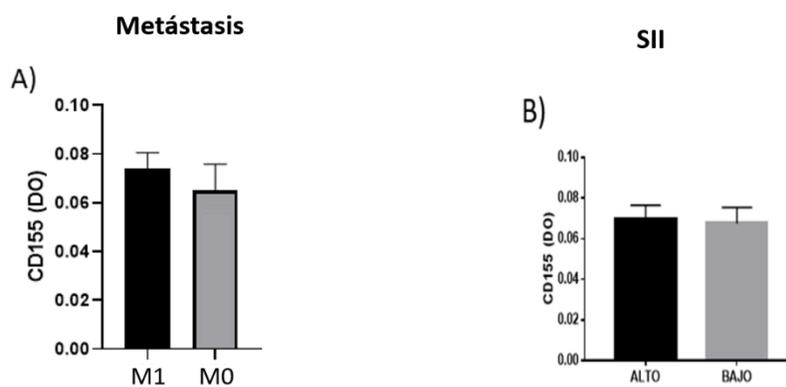
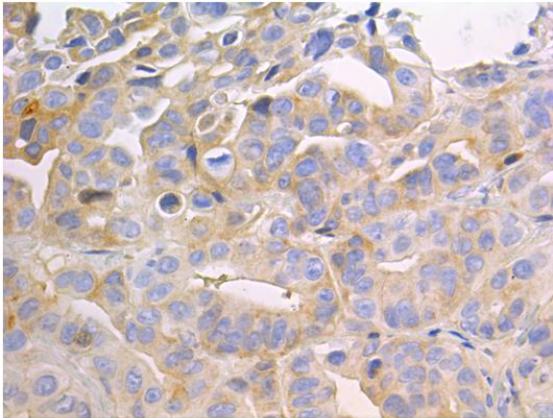
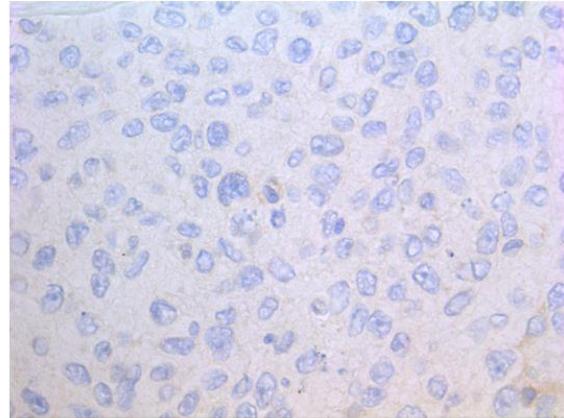


Figura 8. Comparación de la expresión de CD155 en casos de adenocarcinoma con metástasis y SII. A) Presencia de metástasis (M1, n=12), ausencia de metástasis (M0, n=6.) B) SII mayor a la mediana (ALTO, n=11), SII menor a la mediana (BAJO, n=10). Se ilustran los valores de media y error estándar.

Al no encontrar diferencias de expresión de CD155 entre los subtipos histológicos, entre los grupos con presencia o ausencia de metástasis, ni de con los valores de SII, los casos se dividieron respecto a la mediana de DO de CD155, en grupos de alta y baja expresión (Figura 9). Para analizar la relación entre la expresión de CD155 la presencia de linfocitos CD8 positivos.



Alta expresión.



Baja expresión

**Figura 9. Tinción inmunohistoquímica de CD155 en adenocarcinoma pulmonar.** Imágenes representativas de los grupos de alta y baja expresión. Aumento 40X.

Se realizó la tinción inmunohistoquímica para CD8 en los casos de adenocarcinoma (Figura 10A) y se comparó la cantidad de células CD8 presentes en el infiltrado inflamatorio con respecto a la expresión de CD155. Se observó que el grupo de alta expresión de CD155 muestra una menor cantidad de células CD8 por campo que el grupo de baja expresión (Figura 10B)

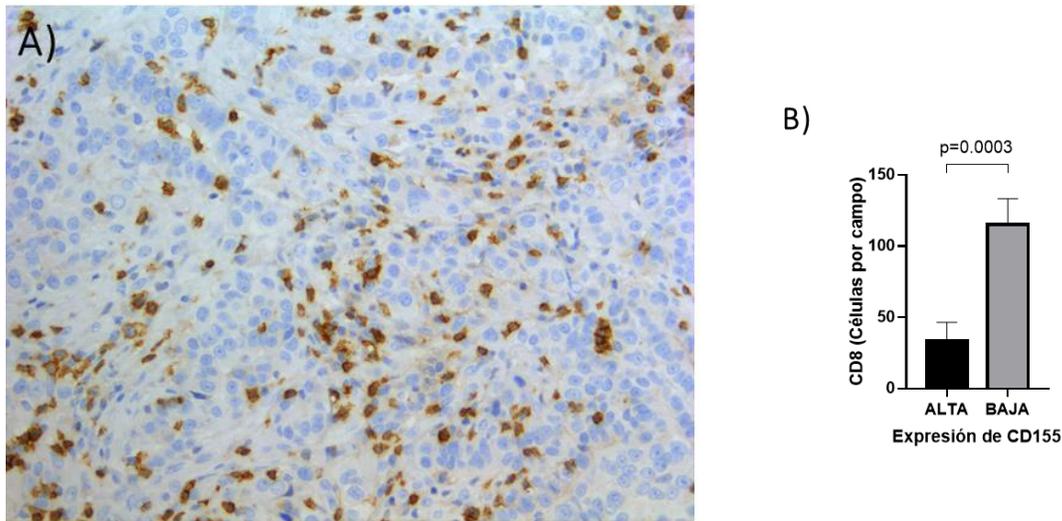


Figura 10. Relación del nivel de expresión CD155 con la cantidad de linfocitos CD8<sup>+</sup> en el infiltrado inflamatorio. A) Imagen representativa de la tinción de CD8. B) Comparación de células CD8 por campo entre grupos de alta n=14 y baja expresión de CD155 n=14. Se ilustran los valores de media y error estándar.

Así mismo, se comparó la cantidad células CD8 por campo entre los diferentes subtipos. Se observó que la cantidad de estas es diferente entre los subtipos histológicos y que el subtipo acinar presenta una cantidad significativamente mayor de estas células que el subtipo sólido (Figura 11).

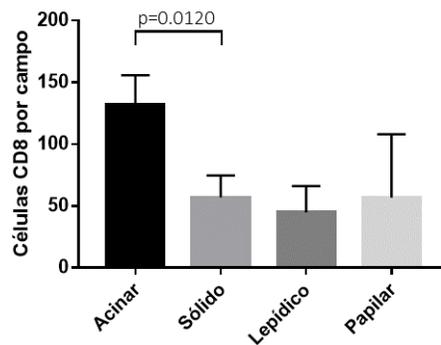
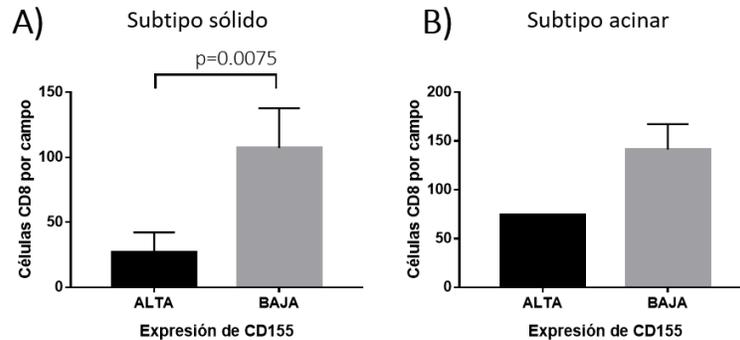


Figura 11. Presencia de células CD8 por subtipo histológico de adenocarcinoma pulmonar. Los casos con subtipo acinar presentan una mayor cantidad de células CD8 que el subtipo sólido. Subtipo acinar n=7, subtipo sólido n=16, subtipo papilar n=2, subtipo lepidico n=3. En la gráfica se ilustran los valores de media y error estándar.

Para determinar si la asociación antes observada entre los grupos de expresión de CD155 y la cantidad de células CD8 era resultado de los subtipos histológicos distintos, se realizó esta misma comparación en los subtipos sólido y acinar. En el

subtipo sólido se observó que el grupo de alta expresión de CD155 presenta significativamente menos células CD8. De la misma manera, en el subtipo acinar, el grupo de alta expresión muestra una tendencia similar (Figura 12).



**Figura 12. Relación del nivel de expresión CD155 con la cantidad de linfocitos CD8<sup>+</sup>.** A) Subtipo sólido. Alta expresión n=10, Baja expresión n=6. B) Subtipo acinar. Alta expresión n=1, Baja expresión n=6. En la gráfica se ilustran los valores de media y error estándar.

Dado que se observó una menor presencia de células CD8 en los grupos de alta expresión de CD155, independientemente del subtipo histológico, se evaluó si la asociación entre la expresión relativa de CD155 y la cantidad de linfocitos CD8 era suficiente como para establecer una correlación. Se encontró una correlación negativa en el total de los casos, que puede también observarse en los subtipos histológicos acinar y sólido (Figura 13).

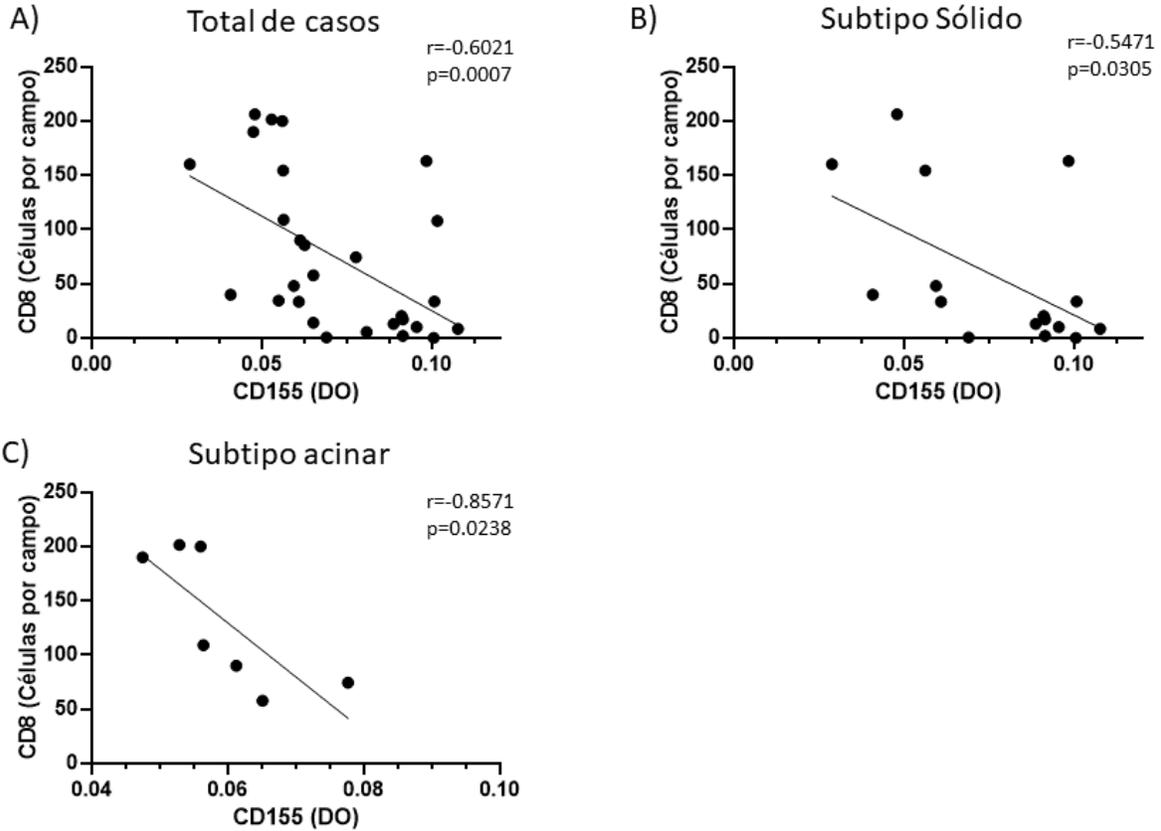
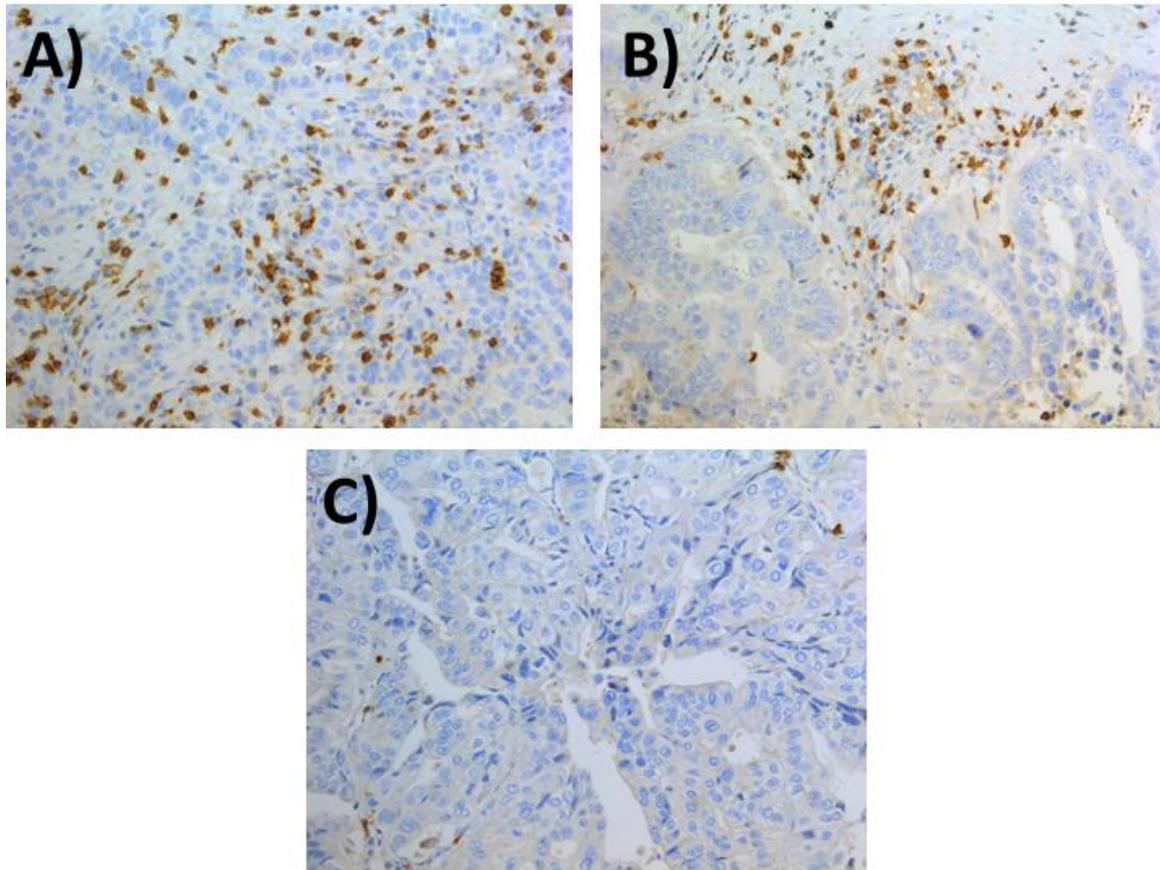


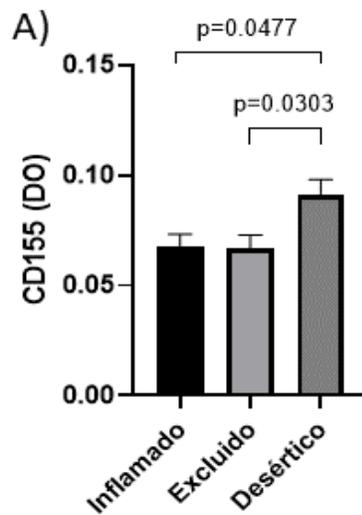
Figura 13 Correlación de la expresión de la molécula CD155 en células tumorales con la infiltración de linfocitos T CD8. A) Total de casos n=28. B) Casos predominantemente sólidos n=16. C) Casos predominantemente acinares n=7. r: coeficiente de correlación de Spearman.

Finalmente, los casos fueron clasificados en función del fenotipo inmune. Se consideró como fenotipo inflamado cuando los linfocitos CD8 positivos se encuentran en contacto con las células tumorales; como fenotipo excluido a la presencia de linfocitos CD8 positivos en la zona del tumor, pero retenidos en el estroma, por lo que no se encuentran en contacto directo con las células tumorales; y como fenotipo desértico cuando prácticamente no se observaron linfocitos CD8+ (Figura 14).



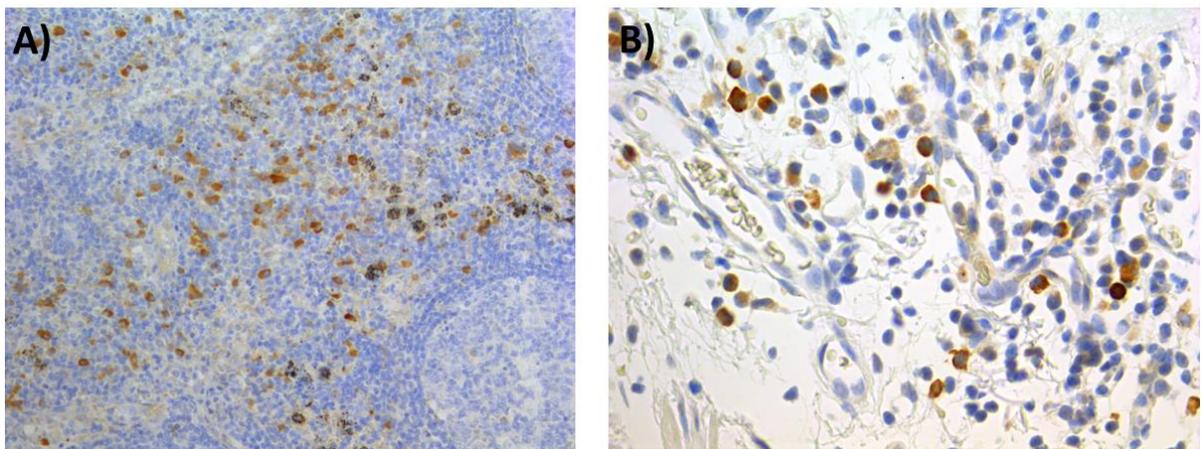
**Figura 14. Tinción inmunohistoquímica de células CD8 positivas en los fenotipos inmunes.** A) Fenotipo inflamado B) Fenotipo excluido C) Fenotipo desértico. En las tres imágenes se observan los núcleos de las células en color azul, mientras que el color café de la inmunotinción con DAB corresponde a los linfocitos CD8. Aumento 20X.

Para determinar si la expresión de CD155 se relacionaba con un fenotipo en particular, se compararon los valores promedio de DO entre los fenotipos. Se encontró que la presencia de esta molécula es mayor en los casos con un fenotipo desértico, en comparación con los que presentan fenotipos inflamado y excluido. (Figura 15)



**Figura 15 Expresión de CD155 por fenotipos inmunes.** DO promedio de CD155 por fenotipos inmunes: fenotipo inflamado n=17, fenotipo excluido n=6, fenotipo desértico n=5.

Por otra parte, se evaluó la expresión de CD155 en ganglios linfáticos correspondientes a algunos de los tumores primarios analizados anteriormente. De manera interesante se observó una tinción CD155 positiva en linfocitos principalmente de la zona interfolicular (Figura 16). Este fenómeno podría deberse a la presencia de las isoformas solubles de esta molécula unidas a sus receptores, expresados por linfocitos. Es necesario evaluar una mayor cantidad de ganglios para determinar la relevancia de este resultado.



**Figura 16. Linfocitos en ganglio linfático con tinción positiva para CD155** A) Linfocitos positivos para CD155 en la región interfolicular del ganglio linfático. Aumento 10X B) Linfocitos positivos para CD155. Aumento 40X.

Con los resultados obtenidos podemos sugerir que la sobreexpresión de la molécula CD155 por las células tumorales afecta negativamente la respuesta antitumoral al disminuir la cantidad de linfocitos T CD8 en el infiltrado inflamatorio, lo que se relaciona con la generación de un fenotipo desértico.

## DISCUSIÓN

La molécula CD155 tiene una baja expresión en tejidos sanos, pero se ha reportado que se encuentra sobreexpresada en diferentes tipos de cáncer y ha sido relacionada con un mal pronóstico. Los múltiples procesos a través de los que CD155 puede favorecer la patogénesis tumoral pueden dividirse en dos; aquellos que promueven directamente el crecimiento tumoral, así como su capacidad de invadir o hacer metástasis, y aquellos que favorecen la supervivencia de las células tumorales a través de la evasión de la respuesta inmune.

Con respecto a la participación de CD155 en el desarrollo de las células tumorales, se esperaba que los subtipos histológicos considerados como de peor pronóstico (sólido y micropapilar) estuvieran relacionados con una mayor expresión de esta molécula. Sin embargo, en la muestra analizada la expresión de CD155 no está relacionada con un subtipo histológico, lo que sugiere que la sobreexpresión de esta molécula es un fenómeno general del adenocarcinoma pulmonar.

Así mismo, se esperaba que la expresión de CD155 fuera mayor en casos con un estadio clínico más avanzado. En un reporte de colangiocarcinoma, Huang y colaboradores reportaron una asociación entre la expresión de CD155 y un mayor tamaño del tumor, mayor invasión a ganglios linfáticos, presencia de metástasis y angiogénesis [57]. Debido a que el cáncer pulmonar suele diagnosticarse en etapas avanzadas, las muestras analizadas en este estudio provinieron de pacientes con estadios III y IV, donde la diferencia más importante es diseminación a órganos distantes. En estos estadios, la sobreexpresión de CD155 no parece ser importante para la formación de metástasis puesto que se observó una expresión similar en los grupos con presencia o ausencia de este fenómeno. Es posible que la diferencia con lo observado por Huang se deba a que la muestra analizada en este estudio incluyó casos en etapas tempranas.

Al considerar que la expresión de la molécula analizada no se relaciona con un subtipo histológico en particular, ni con la presencia de metástasis, es importante tomar en cuenta las características de la muestra analizada. La mayor parte de los casos analizados fueron de subtipos acinar y sólido, mientras que los subtipos

lepídico y papilar se encontraron en menor proporción y del subtipo micropapilar, considerado como uno de los de peor pronóstico, no se obtuvieron muestras. Además, el análisis de la expresión de CD155 podría mostrar una mejor asociación con los parámetros de TNM, si se incluyeran casos con estadios I y II. Masson y colaboradores reportaron que la sobreexpresión de esta molécula ocurre en etapas tempranas de la enfermedad [51], por lo que su participación en los procesos de proliferación, invasión y metástasis podría tener un mayor impacto en etapas tempranas de la enfermedad.

Por lo anterior proponemos para estudios posteriores incrementar el tamaño de la muestra, incluyendo casos de todos los subtipos histológicos, así como de estadios tempranos, para definir el impacto de CD155 en estos parámetros clínico-patológicos.

Debido a que el SII es un parámetro que considera poblaciones de células inmunes a nivel sistémico y que un SII elevado ha sido relacionado con un mal pronóstico del cáncer, se esperaba que la expresión de CD155 estuviera asociada con una menor cantidad de linfocitos en sangre y, por lo tanto, con un valor mayor del SII. Sin embargo, no se observaron diferencias entre los grupos de expresión de CD155 respecto a este parámetro, lo que sugiere que, en los casos analizados en este estudio, la expresión de CD155 no afecta la relación de neutrófilos, plaquetas y linfocitos en sangre periférica.

Al dividir los casos por nivel de expresión relativa de CD155, se observó una menor presencia de células CD8 positivas en el grupo de alta expresión, lo que concuerda con Nishiwada y colaboradores [51], que reportan que la expresión de CD155 se relaciona con una menor cantidad de células CD8 en cáncer de páncreas. Por lo anterior, podemos sugerir que en cáncer de pulmón la molécula CD155 afecta la infiltración por células CD8.

Además, las características particulares de un subtipo histológico no parecen afectar esta asociación; aunque el subtipo acinar presentó una mayor cantidad de células CD8 con respecto al sólido, se observó el mismo fenómeno en ambos subtipos.

La correlación negativa observada entre la expresión de CD155 en las células tumorales y la cantidad de linfocitos CD8<sup>+</sup> en el infiltrado inflamatorio sugiere que la expresión de CD155 en las células tumorales favorece la evasión del sistema inmunológico.

Chen y Mellman sugieren que los fenotipos inmunes están relacionados con las estrategias de evasión que se presentan en las células tumorales para evitar su destrucción por parte de las células citotóxicas del sistema inmunológico [37]. Considerando que CD155 puede interactuar con TIGIT y CD96, lo que se relaciona con la disminución de la actividad de las células citotóxicas, en un fenotipo inflamado, la sobreexpresión de CD155 por las células tumorales serviría como mecanismo para evadir la citotoxicidad de las células inmunológicas. Sin embargo, la mayor expresión de CD155 se encontró en el fenotipo desértico. Este fenotipo inmune ha sido sugerido como el resultado de las estrategias de evasión que evitan la activación de la respuesta antitumoral, lo que sugiere que la sobreexpresión de la molécula CD155 afecta la activación de linfocitos, más que los mecanismos efectores de las células infiltrantes.

Al analizar la expresión de la molécula en ganglios linfáticos se encontró la presencia de linfocitos CD155 positivos, lo que sugiere la presencia de isoformas solubles unidas a las moléculas CD226, TIGIT o CD96, presentes en linfocitos. Esto podría explicar cómo una molécula expresada en por células del tumor primario impide el inicio de la respuesta inmune, comúnmente asociado a ganglios linfáticos.

Mediante análisis por RT-qPCR se ha reportado que la sobreexpresión de CD155 no ocurre en una isoforma específica, sino por un aumento general de la transcripción del gen [51], por lo que es razonable pensar que los tumores primarios en los que se encontró una mayor expresión de esta molécula producen también una mayor cantidad de las isoformas solubles, cuya expresión ha sido asociada con un peor pronóstico en diferentes tipos de cáncer [55]. Estas isoformas podrían drenar a través de la linfa hacia los ganglios linfáticos y unirse a sus ligandos CD226, TIGIT y CD96, presentes en los linfocitos, por lo que la tinción observada correspondería

al reconocimiento de las isoformas solubles de CD155 unidas a sus diferentes ligandos en los linfocitos.

En caso de interactuar con CD226, los linfocitos podrían sufrir de una disminución de este ligando activador, por lo que recibirían menos señales de coestimulación al momento de su activación. En cambio, si interactúan con TIGIT o CD96, los linfocitos sufrirían de agotamiento por la interacción con estos ligandos inhibidores desde el ganglio linfático, evitando su migración al sitio del tumor.

Esto tendría que ser verificado en estudios posteriores analizando un mayor número de casos de los tres fenotipos inmunes, tanto en tumor primario como en los ganglios linfáticos correspondientes, así como midiendo los niveles de las isoformas solubles de CD155.

Los resultados sugieren que, en estadios avanzados, la expresión de la molécula CD155 afecta la cantidad de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en el tumor primario, al disminuir su activación en los ganglios linfáticos. Por lo tanto, evaluar el nivel de expresión de esta molécula podría ser de utilidad, no sólo como pronóstico de la enfermedad, como se ha reportado anteriormente [52-54], sino también como un blanco de inmunoterapias, sobre todo en combinación con otras moléculas empleadas actualmente como se realiza en el bloqueo de PD-L1.

## **CONCLUSIONES**

La expresión de CD155 no se asocia de manera importante en la presencia de metástasis o subtipo histológico particular, en estadios avanzados.

El efecto de la molécula CD155 en la respuesta antitumoral es local, más que sistémico

La expresión de CD155 muestra una correlación negativa con la presencia de células CD8 positivas.

El fenotipo desértico se relaciona con una mayor expresión de CD155 en células tumorales.

## **PERSPECTIVAS**

Ampliar el tamaño de la muestra, incluyendo casos de todos los estadios clínicos, subtipos histológicos y fenotipos inmunes.

Evaluar la relación de los parámetros clínico-patológicos con los niveles de las isoformas solubles de CD155.

Evaluar la expresión de los ligandos de CD155 y su impacto en los fenotipos inmunes.

## REFERENCIAS

1. WHO. (2018). *Cancer*. Fact Sheets. Recuperado de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
2. GLOBOCAN. (2018). *Cancer Tomorrow*. Recuperado de [http://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-isotype?type=1&population=900&mode=population&sex=0&cancer=39&age\\_group=valu&apc\\_male=0&apc\\_female=0](http://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-isotype?type=1&population=900&mode=population&sex=0&cancer=39&age_group=valu&apc_male=0&apc_female=0)
3. GLOBOCAN. (2018). *All cancers*. Fact sheets. Recuperado de <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>
4. Petrucelli N DM, Pal T. (2016). BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer. In *GeneReviews*, ed. AH Adam MP, Pagon RA, et al. Seattle (WA): University of Washington
5. Jhappan C, Noonan FP, Merlino G. (2003). Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Oncogene* 22: 3099
6. Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 24: S1-S10
7. Brambilla E, Travis W. (2014). Lung Cancer. In *World Cancer Report*, ed. B Stewart, C Wild. Lyon, Francia: IARC
8. GLOBOCAN. (2018). *Lung*. Fact sheets. Recuperado de <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/15-Lung-fact-sheet.pdf>
9. Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. (2007). Lung cancer in never smokers — a different disease. *Nature Reviews Cancer* 7: 778
10. SEER. (2015). *Cancer of the Lung and Bronchus (Invasive)*. SEER Cancer Statistics Review 1975-2015. Recuperado de [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2015/browse\\_csr.php?sectionSEL=15&pageSEL=sect\\_15\\_table.28](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/browse_csr.php?sectionSEL=15&pageSEL=sect_15_table.28)
11. Butnor KJ, Beasley MB, Cagle PT, Grunberg SM, Kong F-M, Marchevsky A, Okby NT, Roggli VL, Suster S, Tazelaar HD, Travis WD. (2009). Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Primary Non–Small Cell Carcinoma, Small Cell Carcinoma, or Carcinoid Tumor of the Lung. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 133: 1552-1559
12. Eguchi T, Kadota K, Park BJ, Travis WD, Jones DR, Adusumilli PS. (2014). The new IASLC-ATLERS lung adenocarcinoma classification: what the surgeon should know. *Seminars in thoracic and cardiovascular surgery* 26: 210-222
13. Grapatsas K, Leivaditis V, Tsiologianni Z, Haussmann E, Kaplunov V, Dahm M, Zarogoulidis P, Hohenforst-Schmidt W, Tsakiridis K, Foroulis C, Paliouras D, Barbetakis N, Kosan B. (2017). Epidemiology, risk factors, symptomatology, TNM classification of Non Small Cell Lung Cancer. An overview while waiting the 8<sup>th</sup> TNM classification. *Oncomedicine* 2: 14-23
14. Hanahan D, Weinberg Robert A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144: 646-674
15. Merlo LMF, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. (2006). Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nature Reviews Cancer* 6: 924-935
16. Duesberg P, Li R. (2003). Multistep Carcinogenesis: A Chain Reaction of Aneuploidizations. *Cell Cycle* 2: 201-209
17. Finn OJ. (2018). A Believer's Overview of Cancer Immunosurveillance and Immunotherapy. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 200: 385-391

18. Fridman WH. (2018). From Cancer Immune Surveillance to Cancer Immunoediting: Birth of Modern Immuno-Oncology. *Journal of Immunology* 201: 825-826
19. Buonaguro L, Petrizzo A, Tornesello ML, Buonaguro FM. (2011). Translating tumor antigens into cancer vaccines. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 18: 23-34
20. Ribatti D. (2017). The concept of immune surveillance against tumors. The first theories. *Oncotarget* 8: 7175-7180
21. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology* 3: 991-998
22. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. (2004). The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* 21: 137-148
23. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature Reviews Cancer* 12: 298
24. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoue F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pages F. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313: 1960-1964
25. Galon J, Pagès F, Marincola FM, Angell HK, Thurin M, Lugli A, Zlobec I, Berger A, Bifulco C, Botti G, Tatangelo F, Britten CM, Kreiter S, Chouchane L, Delrio P, Arndt H, Asslaber M, Maio M, Masucci GV, Mihm M, Vidal-Vanaclocha F, Allison JP, Gnjatic S, Hakansson L, Huber C, Singh-Jasuja H, Ottensmeier C, Zwierzina H, Laghi L, Grizzi F, Ohashi PS, Shaw PA, Clarke BA, Wouters BG, Kawakami Y, Hazama S, Okuno K, Wang E, O'Donnell-Tormey J, Lagorce C, Pawelec G, Nishimura MI, Hawkins R, Lapointe R, Lundqvist A, Khleif SN, Ogino S, Gibbs P, Waring P, Sato N, Torigoe T, Itoh K, Patel PS, Shukla SN, Palmqvist R, Nagtegaal ID, Wang Y, D'Arrigo C, Kopetz S, Sinicrope FA, Trinchieri G, Gajewski TF, Ascierto PA, Fox BA. (2012). Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *Journal of Translational Medicine* 10: 205
26. Chen Daniel S, Mellman I. (2013). Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity* 39: 1-10
27. Mougiakakos D, Choudhury A, Lladser A, Kiessling R, Johansson CC. (2010). Chapter 3 - Regulatory T Cells in Cancer. In *Advances in Cancer Research*, ed. GF Vande Woude, G Klein, pp. 57-117: Academic Press
28. Tesi RJ. (2019). MDSC; the Most Important Cell You Have Never Heard Of. *Trends in Pharmacol Sciences* 40: 4-7
29. Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM. (2006). Mechanisms of immune evasion by tumors. *Advances in Immunology* 90: 51-81
30. Manieri NA, Chiang EY, Grogan JL. (2017). TIGIT: A Key Inhibitor of the Cancer Immunity Cycle. *Trends in Immunology* 38: 20-28
31. Jiang Y, Li Y, Zhu B. (2015). T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death & Disease* 6: e1792-e1792
32. Pardoll DM. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* 12: 252-264
33. Nagtegaal ID, Quirke P, Schmoll HJ. (2011). Has the new TNM classification for colorectal cancer improved care? *Nature Reviews Clinical Oncology* 9: 119-123
34. Zhang Y, Chen B, Wang L, Wang R, Yang X. (2019). Systemic immune-inflammation index is a promising noninvasive marker to predict survival of lung cancer: A meta-analysis. *Medicine* 98: e13788-e13788
35. Lolli C, Basso U, Derosa L, Scarpi E, Sava T, Santoni M, Crabb SJ, Massari F, Aieta M, Conteduca V, Maruzzo M, La Russa F, Wheeler M, Berardi R, Galli L, De Giorgi U. (2016).

- Systemic immune-inflammation index predicts the clinical outcome in patients with metastatic renal cell cancer treated with sunitinib. *Oncotarget* 7: 54564-54571
36. Broussard EK, Disis ML. (2011). TNM staging in colorectal cancer: T is for T cell and M is for memory. *Journal of Clinical Oncology* 29: 601-603
  37. Chen DS, Mellman I. (2017). Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* 541: 321-330
  38. Miyoshi J, Takai Y. (2007). Nectin and nectin-like molecules: biology and pathology. *American Journal of Nephrology* 27: 590-604
  39. Bowers JR, Readler JM, Sharma P, Excoffon K. (2017). Poliovirus Receptor: More than a simple viral receptor. *Virus Research* 242: 1-6
  40. Sato T, Irie K, Ooshio T, Ikeda W, Takai Y. (2004). Involvement of heterophilic trans-interaction of Necl-5/Tage4/PVR/CD155 with nectin-3 in formation of nectin- and cadherin-based adherens junctions. *Genes Cells* 9: 791-799
  41. Kakunaga S, Ikeda W, Shingai T, Fujito T, Yamada A, Minami Y, Imai T, Takai Y. (2004). Enhancement of serum- and platelet-derived growth factor-induced cell proliferation by Necl-5/Tage4/poliovirus receptor/CD155 through the Ras-Raf-MEK-ERK signaling. *Journal of Biological Chemistry* 279: 36419-36425
  42. Kajita M, Ikeda W, Tamaru Y, Takai Y. (2007). Regulation of platelet-derived growth factor-induced Ras signaling by poliovirus receptor Necl-5 and negative growth regulator Sprouty2. *Genes Cells* 12: 345-357
  43. Sloan KE, Eustace BK, Stewart JK, Zehetmeier C, Torella C, Simeone M, Roy JE, Unger C, Louis DN, Ilag LL, Jay DG. (2004). CD155/PVR plays a key role in cell motility during tumor cell invasion and migration. *BMC Cancer* 4: 73
  44. Pende D, Bottino C, Castriconi R, Cantoni C, Marcenaro S, Rivera P, Spaggiari GM, Dondero A, Carnemolla B, Reymond N, Mingari MC, Lopez M, Moretta L, Moretta A. (2005). PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as ligands of the human DNAM-1 (CD226) activating receptor: involvement in tumor cell lysis. *Molecular Immunology* 42: 463-469
  45. Carlsten M, Norell H, Bryceson YT, Poschke I, Schedvins K, Ljunggren HG, Kiessling R, Malmberg KJ. (2009). Primary human tumor cells expressing CD155 impair tumor targeting by down-regulating DNAM-1 on NK cells. *Journal of Immunology* 183: 4921-4930
  46. Joller N, Hafler JP, Brynedal B, Kassam N, Spoerl S, Levin SD, Sharpe AH, Kuchroo VK. (2011). Cutting edge: TIGIT has T cell-intrinsic inhibitory functions. *Journal of Immunology* 186: 1338-1342
  47. Stanietsky N, Simic H, Arapovic J, Toporik A, Levy O, Novik A, Levine Z, Beiman M, Dassa L, Achdout H, Stern-Ginossar N, Tsukerman P, Jonjic S, Mandelboim O. (2009). The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 106: 17858-17863
  48. Joller N, Lozano E, Burkett PR, Patel B, Xiao S, Zhu C, Xia J, Tan TG, Sefik E, Yajnik V, Sharpe AH, Quintana FJ, Mathis D, Benoist C, Hafler DA, Kuchroo VK. (2014). Treg cells expressing the coinhibitory molecule TIGIT selectively inhibit proinflammatory Th1 and Th17 cell responses. *Immunity* 40: 569-581
  49. Yu X, Harden K, Gonzalez LC, Francesco M, Chiang E, Irving B, Tom I, Ivelja S, Refino CJ, Clark H, Eaton D, Grogan JL. (2009). The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nature Immunology* 10: 48-57
  50. Gao J, Zheng Q, Xin N, Wang W, Zhao C. (2017). CD155, an onco-immunologic molecule in human tumors. *Cancer science* 108: 1934-1938

51. Masson D, Jarry A, Baurly B, Blanchardie P, Laboisie C, Lustenberger P, Denis MG. (2001). Overexpression of the CD155 gene in human colorectal carcinoma. *Gut* 49: 236-240
52. Bevelacqua V, Bevelacqua Y, Candido S, Skarmoutsou E, Amoroso A, Guarneri C, Strazzanti A, Gangemi P, Mazzarino MC, D'Amico F, McCubrey JA, Libra M, Malaponte G. (2012). Nectin like-5 overexpression correlates with the malignant phenotype in cutaneous melanoma. *Oncotarget* 3: 882-892
53. Nishiwada S, Sho M, Yasuda S, Shimada K, Yamato I, Akahori T, Kinoshita S, Nagai M, Konishi N, Nakajima Y. (2015). Clinical significance of CD155 expression in human pancreatic cancer. *Anticancer Research* 35: 2287-2297
54. Nakai R, Maniwa Y, Tanaka Y, Nishio W, Yoshimura M, Okita Y, Ohbayashi C, Satoh N, Ogita H, Takai Y, Hayashi Y. (2010). Overexpression of Necl-5 correlates with unfavorable prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Cancer Sci* 101: 1326-1330
55. Iguchi-Manaka A, Okumura G, Kojima H, Cho Y, Hirochika R, Bando H, Sato T, Yoshikawa H, Hara H, Shibuya A, Shibuya K. (2016). Increased Soluble CD155 in the Serum of Cancer Patients. *PLoS One* 11: e0152982
56. Li XY, Das I, Lepletier A, Addala V, Bald T, Stannard K, Barkauskas D, Liu J, Aguilera AR, Takeda K, Braun M, Nakamura K, Jacquelin S, Lane SW, Teng MW, Dougall WC, Smyth MJ. (2018). CD155 loss enhances tumor suppression via combined host and tumor-intrinsic mechanisms. *Journal of Clinical Investigation* 128: 2613-2625
57. Huang DW, Huang M, Lin XS, Huang Q. (2017). CD155 expression and its correlation with clinicopathologic characteristics, angiogenesis, and prognosis in human cholangiocarcinoma. *Onco Targets Ther* 10: 3817-3825
58. Chauvin JM, Pagliano O, Fourcade J, Sun Z, Wang H, Sander C, Kirkwood JM, Chen TH, Maurer M, Korman AJ, Zarour HM. (2015). TIGIT and PD-1 impair tumor antigen-specific CD8(+) T cells in melanoma patients. *Journal of Clinical Investigation* 125: 2046-2058
59. Aguilar-Cazares D, Meneses-Flores M, Prado-Garcia H, Islas-Vazquez L, Rojo-Leon V, Romero-Garcia S, Rivera-Rosales RM, Lopez-Gonzalez JS. (2014). Relationship of dendritic cell density, HMGB1 expression, and tumor-infiltrating lymphocytes in non-small cell lung carcinomas. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 22: 105-113