



11281  
**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

48

**FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**CARACTERIZACION DE LA RESPUESTA  
INMUNE EN GANGLIOS LINFATICOS  
DE PACIENTES CON CANCER**

**TESIS  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS  
BIOMEDICAS  
(INMUNOLOGIA)**

**PRESENTA  
M en C. EMMA LIBERTAD VERÁSTEGUI  
AVILES**

**TUTOR:  
DR. GUILLERMO ALFARO MARTINEZ**

México D.F.

2002

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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.

**TESIS  
FALLA  
DE  
ORIGEN**



**LA UNIVERSIDAD ES GERMEN DE  
INDEPENDENCIA, INQUIETUD Y AFAN DE  
LIBERTAD.**

**FELIPE GONZALEZ  
UNAM, Enero 2002**

***Why should it be so hard? I wondered.  
Now I know..... It shouldn't.***

**SYLVIA A. HEWLETT.  
-A LESSER LIFE-**

**A LA MEMORIA DE MI PADRE Y  
AL EJEMPLO DE MI MADRE**

**PARA ALINE Y ALONSO**

**QUIENES COMO SIEMPRE HAN  
ESTADO A MI LADO... en días de sol y  
en días de lluvia**

**PARA JOSE LUIS**  
**Mi amigo, mi compañero y mi más grande**  
**critico.**

**Dedico este trabajo con respeto y  
gratitud a los *pacientes* del  
INSTITUTO NACIONAL DE  
CANCEROLOGIA ...  
*MIS MEJORES MAESTROS***



## INDICE

Prólogo	1
Resumen	3
Abstract	5
-INTRODUCCION	
Cáncer	
Generalidades	7
Cáncer de Cabeza y Cuello	15
Cáncer de Mama	24
Cáncer de Cérvix	31
SISTEMA INMUNE	
Generalidades	38
Linfocitos T	45
Células NK	54
Células NKT	57
Circulación de los linfocitos	58
Factores Solubles	61
INMUNOLOGIA TUMORAL	
Generalidades	67
Reconocimiento Antigénico	69
Reconocimiento de Péptidos	74
Células Presentadoras de Antígenos	74
Mecanismos antitumorales Mediados por el Antígeno	81
Inmunosupresión	83
ORGANOS LINFOIDES SECUNDARIOS	
Generalidades	84
Ganglios Linfáticos	
Estructura	85
Desarrollo y Organización	92
Migración a través del Ganglio	95
Patología Ganglionar	100
Linfadenopatías	100
Hiperplasias	103
Patología ganglionar maligna	107
Neoplasias del sistema inmune	
Enfermedad de Hodgkin	107
Linfomas no Hodgkin	109
Metástasis Ganglionares	113

**INDICE**

<b>DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	119
<b>JUSTIFICACION</b>	121
<b>OBJETIVO</b>	122
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	
<b>Selección de Pacientes</b>	124
<b>Métodos</b>	
Preparación de Linfocitos	129
Obtención de Células Mononucleares	130
Cultivo Celular	131
Inmunofenotipo	132
Citometría de Flujo	133
Identificación de Células Dendríticas	135
Ensayo de Proliferación	136
Ciclo Celular	137
Histología e Inmunohistoquímica	138
Estadística	140
<b>Materiales</b>	141
<b>RESULTADOS</b>	
Histología	152
Inmunofenotipo	158
Ciclo Celular	179
Proliferación Celular	183
<b>DISCUSION</b>	186
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	187
<b>APENDICE</b>	

6

# **INTRODUCCION**

## CANCER

El cáncer es un grupo de enfermedades crónicas, de diferentes etiologías, con una distribución mundial y que abarca todos los grupos de edad. Como consecuencia de la disminución en la frecuencia de enfermedades infecciosas, control de las enfermedades cardio-pulmonares y el aumento en la expectativa de vida, es posible que el cáncer se convierta en la principal causa de muerte <sup>Greenlee 2001, Dirección general de epidemiología 1996, Doll 1967</sup>. En México en un periodo que comprende de los años 1922 a 1992, existió un incremento de 400% en la incidencia del cáncer, el tipo de tumor más frecuente es el cáncer del cérvix, seguido de los cánceres de mama, próstata y linfomas.

Diferentes factores exógenos y endógenos participan en el desarrollo de las neoplasias. Los factores exógenos pueden ser agrupados en las siguientes categorías de acuerdo a los estudios realizados por la Agencia Internacional para la Investigación del cáncer; (1) Ocupacionales (exposición a asbestos: mesotelioma); (2) Farmacéuticos (drogas inmunosupresoras: linfomas); (3) Infecciosos (virus del papiloma humano: CaCu, virus de hepatitis B; hepatocarcinoma, virus de Epstein Barr: linfoma de Burkitt); (4) Hábitos dietéticos (baja fibra: cáncer de colón); y (5) Estilo de vida (tabaco y alcohol; cáncer de cabeza y cuello <sup>Parkin 1993, Trichopoulos 1981, Trichopoulos 1987, Armstrong 1975, Burkitt 1988, Lancey 1992</sup>

Desde el punto de vista endógeno, múltiples evidencias sugieren que el cáncer es una enfermedad genética en la cual las células sufren a través del tiempo una serie de alteraciones (activación de oncogenes, inactivación de genes supresores, etc.) que inciden en la regulación del crecimiento y muerte celular <sup>Perkins 1997, Barbacid 1987, Murray 1981, Weinberg 1985</sup>.

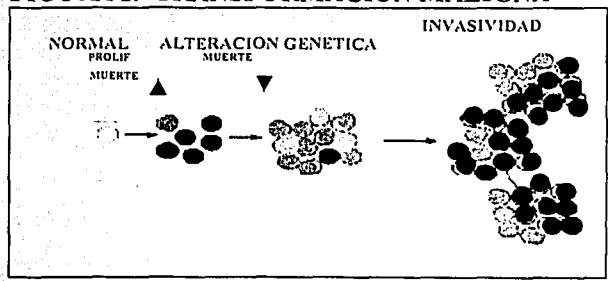
En algunos síndromes hereditarios estas alteraciones ocurren en línea germinal, sin embargo, la mayor parte de estas alteraciones se adquieren como mutaciones somáticas: translocaciones cromosómicas, deleciones, inversiones, amplificaciones o mutaciones en punto (Figura 1) <sup>Parkin 1994, Lancey 1992</sup>. Las alteraciones genéticas pueden ocurrir en forma espontánea, como consecuencia de agentes químicos o como resultado de infecciones virales. Algunos virus pueden insertar en el DNA de la célula huésped secuencias que

virales. Algunos virus pueden insertar en el DNA de la célula huésped secuencias que inducen cambios genómicos que contribuyen a la transformación neoplásica <sup>Perkins 1997, Barbacid 1987, Blair 1981</sup>

Es importante mencionar que existe evidencia de que en algunos casos, el cáncer de mama y ovario puede ser consecuencia de genes heredados en forma dominante con alta penetrancia, se han identificado dos genes mediante clonación posicional; *BRCA1*, localizado en cromosoma 17, el cual al mutar incrementa el riesgo para el desarrollo de cáncer de mama en 85% y para desarrollar cáncer de ovario en 50%. Una de cada 500 mujeres pueden presentar esta mutación en línea germinal en población abierta; sin embargo, el 1% de mujeres Ashkenazi presentan una mutación particular, una deleción 2-bp. La mutación del gen *BRCA2* localizado en el cromosoma 13, también esta asociado a una mayor frecuencia para el desarrollo de cáncer de mama y ovario, esta es menor a la encontrada con la mutación *BRCA1*, también el 1% de las mujeres Azhekenazi presentan la mutación 617delT <sup>Tonin2000</sup>

Durante el proceso de malignización las células adquieren la capacidad de crecer en forma independiente de factores de crecimiento, esta "transformación" le confiere la posibilidad, de vivir un tiempo mayor al de su contraparte normal, de invadir el tejido o los tejidos sanos y de migrar a órganos distintos de los cuales proviene (Figura 1) <sup>Barbacid 1987, Blair 1981</sup>

FIGURA 1. TRANSFORMACIÓN MALIGNA



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

En la actualidad se han utilizado cuatro diferentes abordajes para la identificación de genes asociados con el cáncer: (a) El estudio de virus asociados a cáncer; (b) bioensayos para genes asociados en cáncer en cultivo de tejidos; (c) localizaciones de genes en sitios de

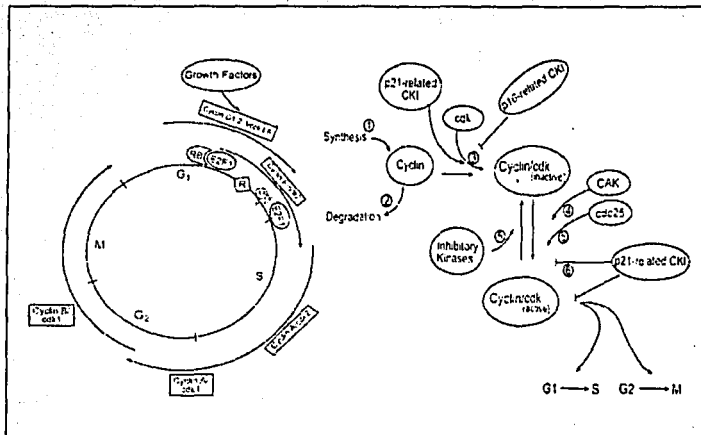
alteraciones cromosómicas en tumores; y (d) aislamiento de genes asociados al desarrollo de cáncer familiar <sup>Barbacid 1987</sup>.

En algunos tipos de neoplasias, y como consecuencia de alteraciones en algunos genes se pierde una de las principales características de los eucariontes superiores; la presencia de un tiempo de vida definido de las células somáticas en las cuales el crecimiento y la capacidad de dividirse se encuentra regulada <sup>Kastan 1997, Alberts 1994, Foulds 1958</sup>. Frecuentemente esta desregulación es consecuencia de alteraciones en algunos genes involucrados en la regulación del ciclo celular <sup>Alberts 1994</sup>.

En condiciones normales existe un control estricto de los eventos que se llevan a cabo durante la replicación celular, durante el ciclo celular algunas cinasas son activadas o inactivadas, modificándose por lo tanto los sustratos que determinan el estado físico de la célula (inducción de síntesis de DNA y eventualmente división celular) <sup>Kastan 1997</sup>.

Las cinasas y las ciclinas cinasas constituyen un importante mecanismo regulador del ciclo celular. En diferentes tipos de cáncer se han encontrado alteraciones que involucran algunas de estas moléculas directamente o los productos regulados por estas (Figura 2) <sup>Alberts 1994, Foulds 1958, Hines 1995, Hiram 1995, Kolf 1992</sup>.

FIGURA 2. CICLO CELULAR



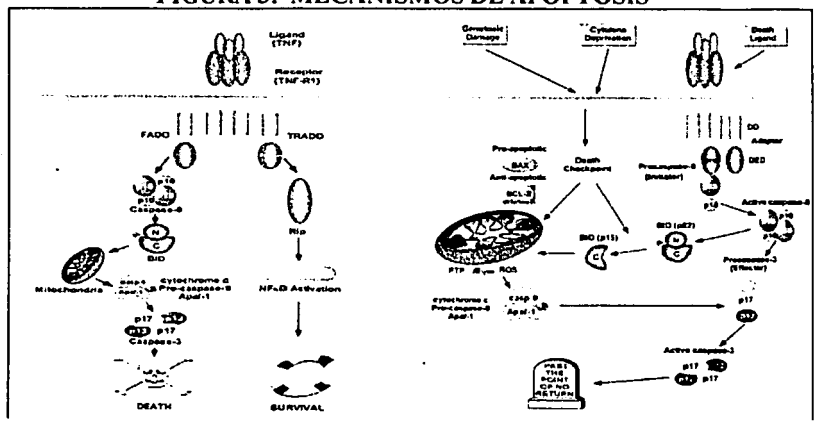
TEXTO CON FALLA DE ORIGEN

### APOPTOSIS

La homeostasis de los eucariontes multicelulares no esta limitada a la regulación del proceso de división, sino que es necesaria también la muerte de algunas células. La apoptosis es un proceso activo de muerte celular la cual provee un control estricto del número total de células. Es especialmente importante durante la embriogénesis, en el equilibrio en el número de células en el sistema nervioso central y en el sistema inmune <sup>Alberts 1994, Vaux 1993</sup>.

Los mecanismos por los cuales se induce la apoptosis varían de acuerdo a las necesidades del huésped; puede ser inducida como consecuencia de una alteración irreparable de la célula (radiaciones, esteroides), por la supresión brusca de algunos factores de crecimiento o bien, a través del receptor **Fas** <sup>Vaux 1993, Kerr 1991</sup>. Durante la apoptosis se activan varias enzimas, la **caspasa 8** es una enzima apical, la cual al oligomerizarse el receptor activado, rompe a la proteína **Bid** que dispara la liberación del **citocromo c** de la mitocondria, el citocromo c induce la oligomerización de **Apaf-1** con la **caspasa 9**, la cual rompe a la **procaspasa 3**, dando lugar a la formación de una proteasa activa que induce la muerte celular <sup>Kerr 1991, Schulze-Osthoff 1998, Allen 1998, Budihardjo 1999, Matsuyama 2000</sup>. El **Bcl 2** inhibe esta vía a nivel del citocromo c, sin embargo, existen vías alternas, independientes de la mitocondria y las cuales no están inhibidas Bcl 2. Una de estas vías utiliza la caspasa 9 y Apaf 1, participando **JNK** (Figura 3) <sup>Vaux 1993, Kerr 1991, Schulze-Osthoff 1998, Allen 1998, Budihardjo 1999, Matsuyama 2000, Adam 1998</sup>.

FIGURA 3. MECANISMOS DE APOPTOSIS



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## METASTASIS

Los procesos metastásicos representan la principal causa de morbilidad y mortalidad en cáncer<sup>Greenlee 2001</sup>. Las metástasis son el resultado de una secuencia de eventos, los cuales probablemente sean órgano-selectivos (mediados a través de factores solubles y sus receptores, ejemplo, las quimiocinas)<sup>Nicolson 1993</sup>.

Las neoplasias al momento del diagnóstico están constituidas por un grupo heterogéneo de poblaciones celulares con diferentes características genéticas, bioquímicas, inmunológicas y biológicas las cuales son importantes para el proceso metastático<sup>Fidler 1978, Fidler 1990</sup>. El conocimiento de los eventos moleculares responsables de las metástasis es esencial para un mejor abordaje terapéutico, para el estudio del proceso metastático es indispensable conocer la historia natural de las neoplasias, y las características que adquiere y requiere el tumor para su supervivencia.

**Angiogénesis:** Una vez que se establece en forma exitosa la transformación de las células, estas empiezan a dividirse a diferente velocidad, en forma inicial los nutrientes requeridos para sobrevivir son obtenidos por difusión o utilizando los mismos mecanismos que las células del tejido en donde aparecen<sup>Fidler 1978, Fidler 1998, Radinsky 1996</sup>. El período en el que aprovechan los mismos recursos que su contraparte normal, varía de acuerdo al tipo de neoplasia; sin embargo, al aumentar el número de células, la demanda de nutrientes se incrementa los cuales deberá obtener directamente a través de la circulación para lo cual se requiere la formación de vasos de novo. La neovascularización se lleva a cabo una vez que el tumor alcanza 1mm. de diámetro, en este proceso, la síntesis y secreción de los distintos elementos indispensables para la angiogénesis son provistos por los tejidos circundantes a la neoplasia<sup>Fidler 1985, Damerson 1994</sup>. En cáncer la autonomía para iniciar la angiogénesis no solo permite el obtener nutrientes en ocasiones en forma preferencial sino también le da acceso a la circulación a las células neoplásicas y por lo mismo, la oportunidad de metastatizar.

La inducción de angiogénesis esta mediada a través de distintas moléculas secretadas por células endoteliales, epiteliales, mesoteliales y leucocitos<sup>Greenblatt 1968, Fidler 1994</sup>, las cuales son capaces de producir; el *factor de crecimiento de fibroblastos* (FGF), *factor de crecimiento vascular endotelial* (VEGF), *factor de la permeabilidad vascular* (VPF), *IL-8*,



*angiogenina, angiotropina, Factor de crecimiento epidérmico (EGF), fibrina, nicotinamida, factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF), factor transformante de crecimiento alfa y beta (TGF $\alpha$ - $\beta$ ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ )* Damerson 1994, Ueba 1994, Rak 1995, Weidner 1992, Horak 1992, O'Reilly 1994, Sidky 1995

El proceso de angiogénesis se inicia por la proliferación de las células endoteliales, las cuales emigran y penetran al estroma del huésped, los vasos presentes en los procesos neoplásicos poseen características de permeabilidad, estabilidad vascular y regulación de crecimiento diferentes a los de su contraparte normal<sup>Kohn 1995</sup>. La extensión de la angiogénesis resulta del balance entre los factores inhibidores y los promotores, en cáncer frecuentemente predominan estos últimos. Algunos mecanismos que favorecen la angiogénesis son el resultado de mutaciones, algunas de las cuales tienen repercusiones a diferentes niveles. La mutación de p53 es una de las más frecuentemente observadas en cáncer e induce múltiples alteraciones celulares, una de estas es la disminución en la producción del factor antiangiogénico TSP-1, otros genes alterados inducen una desregulación del promotor del FGF aumentando la producción de este factor de crecimiento. Damerson 1994, Ueba 1994, Rak 1995, Weidner 1992, Horak 1992, O'Reilly 1994, Sidky 1995, Kohn 1995

**Invasividad:** Para el desarrollo de metástasis es también importante la disminución en la cohesividad celular, esta es consecuencia también de múltiples alteraciones que ocurren en la neoplasia; algunos tumores regulan negativamente la expresión de moléculas indispensables para la adhesión homotópica, en particular ha sido bien estudiado la regulación negativa de la E-Caderina en cánceres epidermoides. La E-Caderina es responsable de la adhesión homotópica dependiente de calcio en algunos epitelios<sup>Shimoyama 1989, Umbas 1992, Kodowaki 1994, Oda 1994, Shiozaaki 1994</sup>. Al disminuir la cohesividad celular, se facilita la posibilidad de metastatizar, lo cual se facilita por mecanismos presentes en las células neoplásicas que permiten la invasión al tejido conectivo del huésped. Tres mecanismos favorecen y facilitan la invasividad de los tumores:

(a) La presión mecánica como consecuencia del rápido crecimiento de las células neoplásicas, resulta una de las causas más obvias de la invasión,

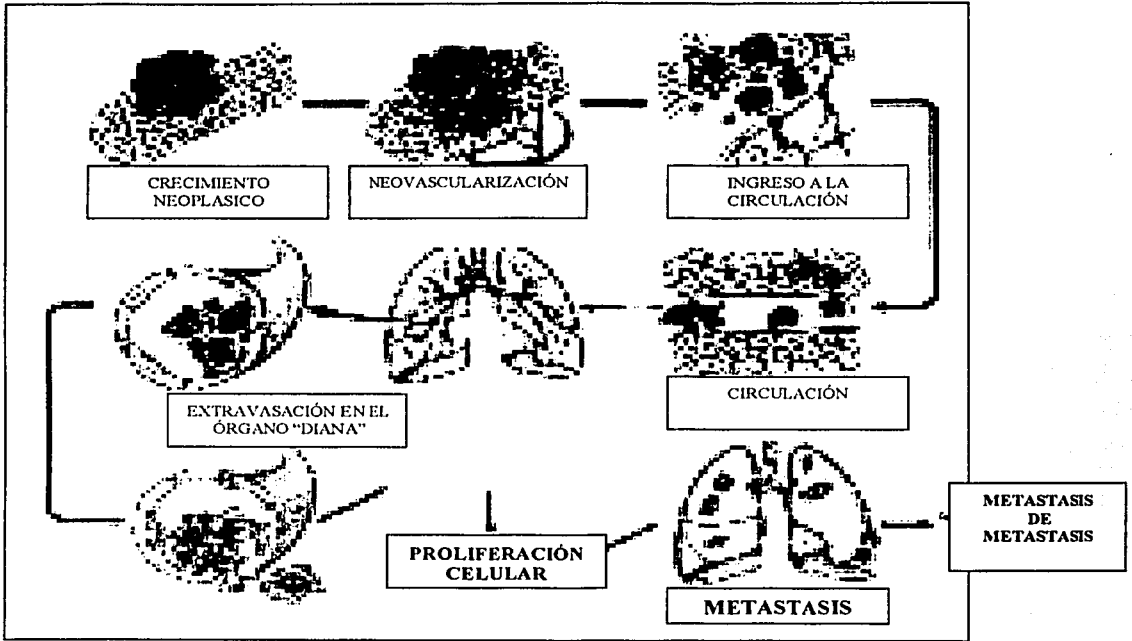
(b) Las células tumorales adquieren la capacidad de movilidad en respuesta a la presencia de factores secretados que alteran elementos del cito-esqueleto, los factores son producidos por células normales y tumorales. Algunos de los productos identificados a la fecha son la citocina de auto-motilidad, la tromboplastina y algunas monocinas<sup>Kohn 1995, Strauli 1984, Liotta 1986</sup>.

(c) La invasión tumoral requiere que al desprenderse del tumor primario las células neoplásicas penetren a la membrana basal y a través de las proteínas de matriz extracelular presentes en distintos endotelios<sup>Liotta 1992</sup>. Algunas células tumorales producen metaloproteinasas<sup>Stetler-Stevenson 1989, Liotta 1990, Stetler-Stevenson 1990</sup> y algunas otras enzimas capaces de romper los principales proteoglicanos de las membranas basales<sup>Himmelstein 1994, Fessler 1984, DeClerck 1991, Fisher 1996</sup>.

Una vez que la o las células tumorales ingresan al torrente circulatorio, deberán de sobrevivir a las distintas agresiones (sistema inmune, turbulencia etc.) presentes en el torrente circulatorio<sup>Zeidman 1961</sup>. Posteriormente la célula neoplásica se adhiere a los endotelios de vasos distales y se extravasa al parénquima del órgano mediante mecanismos parecidos a los que operaron durante el proceso de invasividad inicial<sup>Fidler 1985, Greenblat 1968, Fidler 1994</sup>. La nueva colonia de células tumorales expresa en la superficie diferentes receptores que le permiten responder a la presencia de factores específicos secretados por el nuevo órgano huésped; La supervivencia en este nuevo tejido depende (como en el inicio del proceso neoplásico) de la capacidad de evadir los procesos de defensa del huésped, y una vez que la masa es mayor de 1mm de la capacidad de desarrollar una red vascular<sup>Fidler 1978, Fidler 1990, Adams 1998</sup>.

Finalmente, las metástasis a distancia ocurren luego de que las células tumorales tienen acceso a vasos sanguíneos y linfáticos. Para acceder a los vasos sanguíneos se requiere de su capacidad de invasividad, de adherirse al endotelio vascular y finalmente la de extravasarse para colonizar órganos. Nuevamente, la supervivencia de las células tumorales metastásicas, depende de mecanismos similares a los que le permitieron asentarse en el sitio primario (Figura 6)<sup>Himmelstein 1994, Fessler 1984, DeClerck 1991</sup>.

FIGURA 6. PROCESO METASTÁSICO

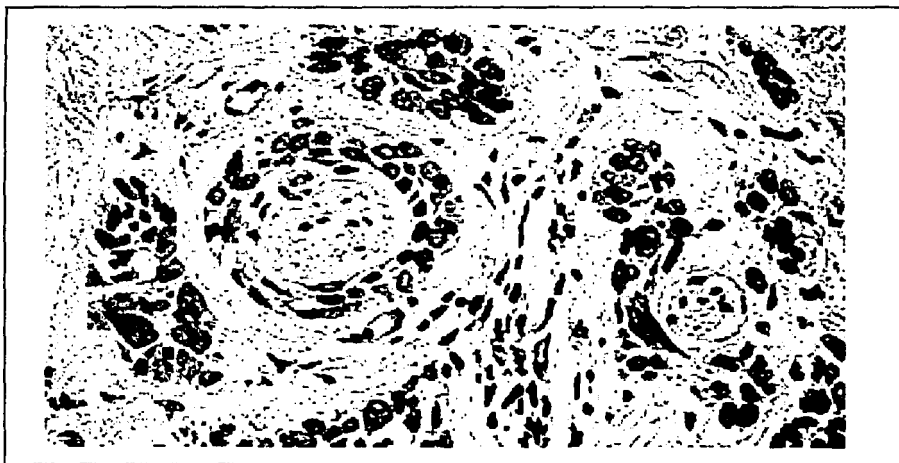


TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## CANCER DE CABEZA Y CUELLO

Las neoplasias del tracto aerodigestivo superior están constituidas por un grupo heterogéneo de tumores, con diferencias etiológicas, epidemiológicas, anatómicas y patológicas<sup>Shantz 1997</sup>. El tabaquismo y alcoholismo durante períodos prolongados son antecedentes frecuentes, el uso de tabaco está asociado a la presencia de diferentes agentes carcinógenos potencializados por el uso de alcohol, los cuales posiblemente induzcan cambios en genes, como los detectados en *myc*, *ras*, *int-2*, *bcl-1*<sup>Shantz 1997</sup>. Como factores etiológicos, también en ciertas localizaciones se han encontrado secuencias de DNA del virus de Epstein Barr (nasofaringe) y del virus de papiloma humano (laringe)<sup>Shantz 1997</sup>. En esta región anatómica, la neoplasia más frecuente es el cáncer epidermoide, el cual representa el 90% de los tumores (Figura 7)<sup>Shantz 1997, Barrera-Franco 1998</sup>.

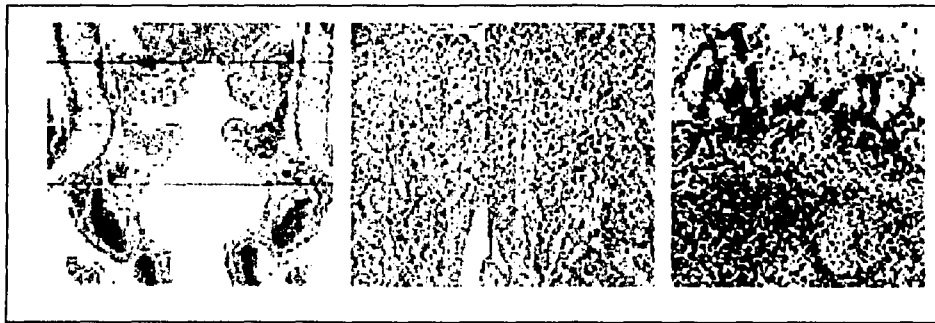
FIGURA 7. HISTOLOGIA DEL CANCER DE CABEZA Y CUELLO



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Desde el punto de vista anatómico, la exposición simultánea a carcinógenos de la mucosa que recubre el tracto aerodigestivo superior, pudiera dar lugar a múltiples lesiones premalignas o neoplásicas (Figura 8)<sup>Shantz 1997</sup>. El cáncer epidermoide por estas razones es multicéntrico, y rara vez metastatiza a distancia. La principal cusa de muerte en este grupo de neoplasias, es la falta de control loco-regional<sup>Shah 1981, Schuller 1986</sup>.

**FIGURA 8 A. HISTOLOGIA DEL CÁNCER DE LARINGE**

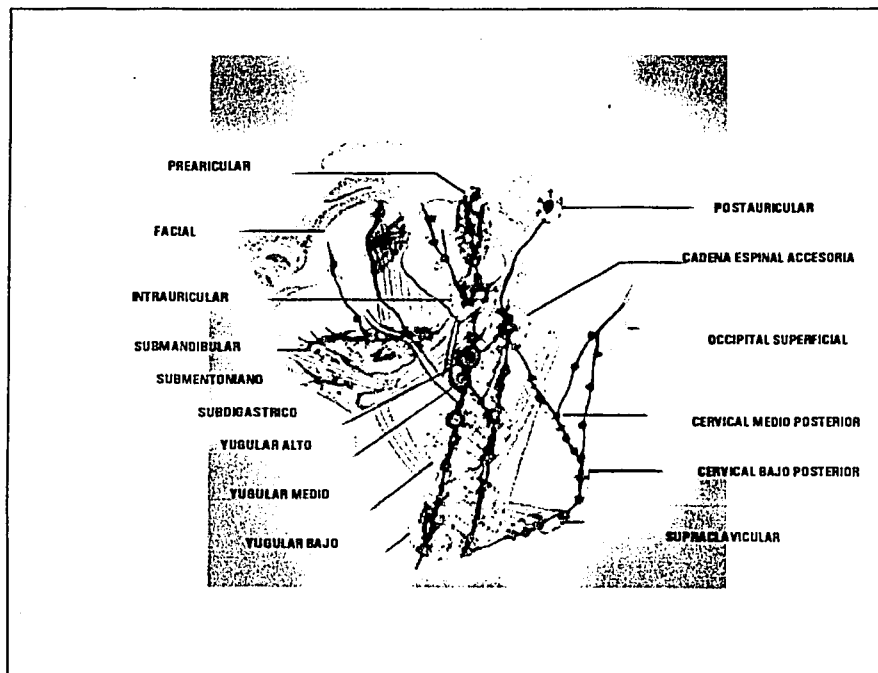


**FIGURA 8 B. RECURRENCIA POST-QUIRÚRGICA DEL CANCER DE LARINGE**



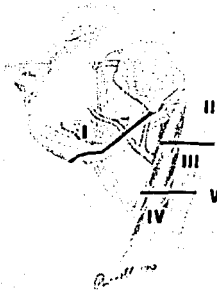
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 9. CADENAS GANGLIONARES EN CABEZA Y CUELLO



Desde el punto de vista anatómico es importante el conocimiento de las distintas estructuras vasculares y linfáticas para la planeación del tratamiento. En el área de cabeza y cuello existen varias cadenas linfáticas las cuales contienen más de 200 ganglios distribuidos a lo largo del cuello (Figura 9)<sup>Shantz 1997</sup>. El drenaje linfático de las diferentes regiones anatómicas está determinado por el origen embrionario de éstas (Figura 10)<sup>Shantz 1997</sup>.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**FIGURA 10. DISTRIBUCION GANGLIONAR POR NIVELES**

El grupo de edad más frecuentemente afectado es el de adultos mayores, excepto en algunos casos en donde alteraciones genéticas han sido implicadas y que pudieran ser responsables de neoplasias en individuos jóvenes sin antecedentes de tabaquismo o alcoholismo<sup>Shantz 1997</sup>.

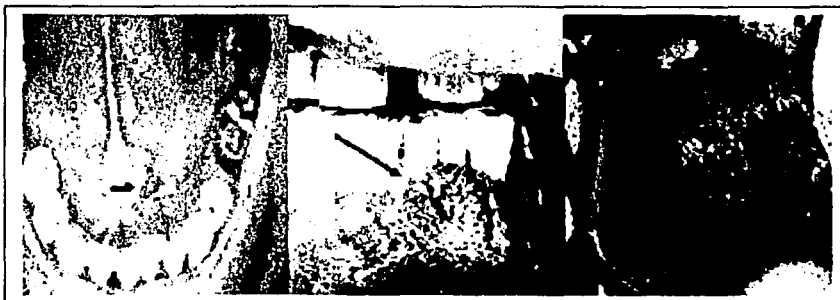
Otro aspecto interesante del área de cabeza y cuello es la inmunobiología de los carcinomas epidermoides; Diferentes estudios han demostrado que estos tumores se desarrollan en un ambiente de inmunosupresión locoregional, con deficiencias en el número y la función de los linfocitos T peri o intra-tumorales, anomalías en macrófagos, monocitos y anergia, los cuales son secundarios a la presencia de distintos factores inmunosupresores secundarios a la neoplasia en sí y a las deficiencias nutricionales, y antecedentes que frecuentemente presentan los pacientes<sup>Schuller 1986, Hadden 1997, Tatake 1989</sup>. A nivel sistémico, la desnutrición frecuentemente observada en los pacientes pudiera incrementar la inmunosupresión<sup>Hadden 1997</sup>.

Las neoplasias de cabeza y cuello, son fácilmente accesibles a la exploración, sin embargo, en México la mayor parte de los pacientes se diagnostican en etapas clínicas avanzadas por lo que el pronóstico frecuentemente es malo (Figura 11)<sup>Barrera-Franco 1998</sup>.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**FIGURA 11. NEOPLASIA EPIDERMOIDE DE REGION FRONTAL**

En el Instituto Nacional de Cancerología, este grupo de neoplasias representa el 14 % de los tumores y las localizaciones más frecuentes incluyen; tumores de cavidad oral y de laringe (Figuras 12 y 13)<sup>Barrera-Franco 1998</sup>.

**FIGURA 12. NEOPLASIAS EPIDERMOIDES DE CAVIDAD ORAL**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



El tratamiento depende fundamentalmente de la extensión de la enfermedad, pero en el momento actual la cirugía representa la terapéutica de elección tanto con intento curativo como paliativo<sup>Shantz 1997, Barrera-Franco 1998, Shah 1981</sup>

### FIGURA 13. ASPECTO CLÍNICO DE CÁNCER EPIDERMÓIDE AVANZADO



En neoplasias tempranas los beneficios obtenidos con cirugía o radioterapia son parecidos y la selección de un tratamiento u otro es particular a cada paciente, pero deben tomarse en cuenta los diversos aspectos anatómicos, cosméticos y funcionales principalmente relacionados a la pérdida de la función de la mandíbula y la laringe<sup>Barrera-Franco 1998, Gluckman 1986, O'Brien 1986</sup>

Desde el punto de vista quirúrgico han existido importantes avances en los abordajes y en la posibilidad de reconstruir el área utilizando colgajos miocutáneos, colgajos libres avasculares, placas de titanio y prótesis artificiales o de estructuras propias (ascenso gástrico) (Figura 14)<sup>Gluckman 1986, O'Brien 1986, Jess 1986</sup>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**FIGURA 14. RECONSTRUCCION DE MADIBULA**



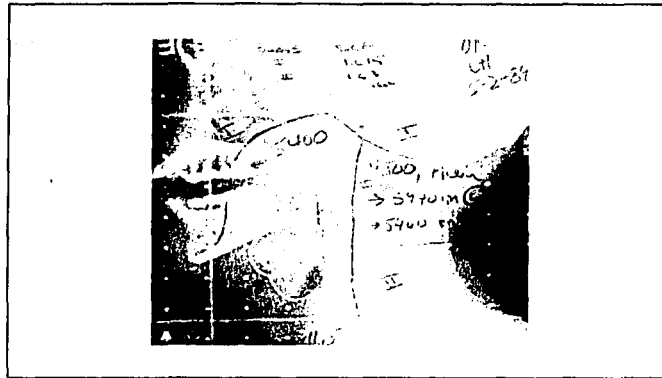
En neoplasias avanzadas, cuando es posible la cirugía, esta es extensa y los defectos cosméticos y funcionales son importantes, el índice de recurrencias es elevado y la supervivencia a un año es de 6 a 20% <sup>Gluckman 1986</sup>.

Como parte del tratamiento multidisciplinario de estos tumores, distintas formas de quimioterapia y/o radioterapia han sido utilizadas, para limitar la extensión de la cirugía o disminuir las recurrencias (Figuras 15 y 16) <sup>Barrera-Franco 1998</sup>.

Los resultados de distintos metanálisis permiten concluir que la enfermedad metastásica o recurrente es incurable, por lo que el uso de combinaciones con nuevos fármacos, dosis mayores de quimioterapia con o sin radioterapia <sup>Barrera-Franco 1998, Gluckman 1986, Jess 1977, O'Brien 1986</sup>.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

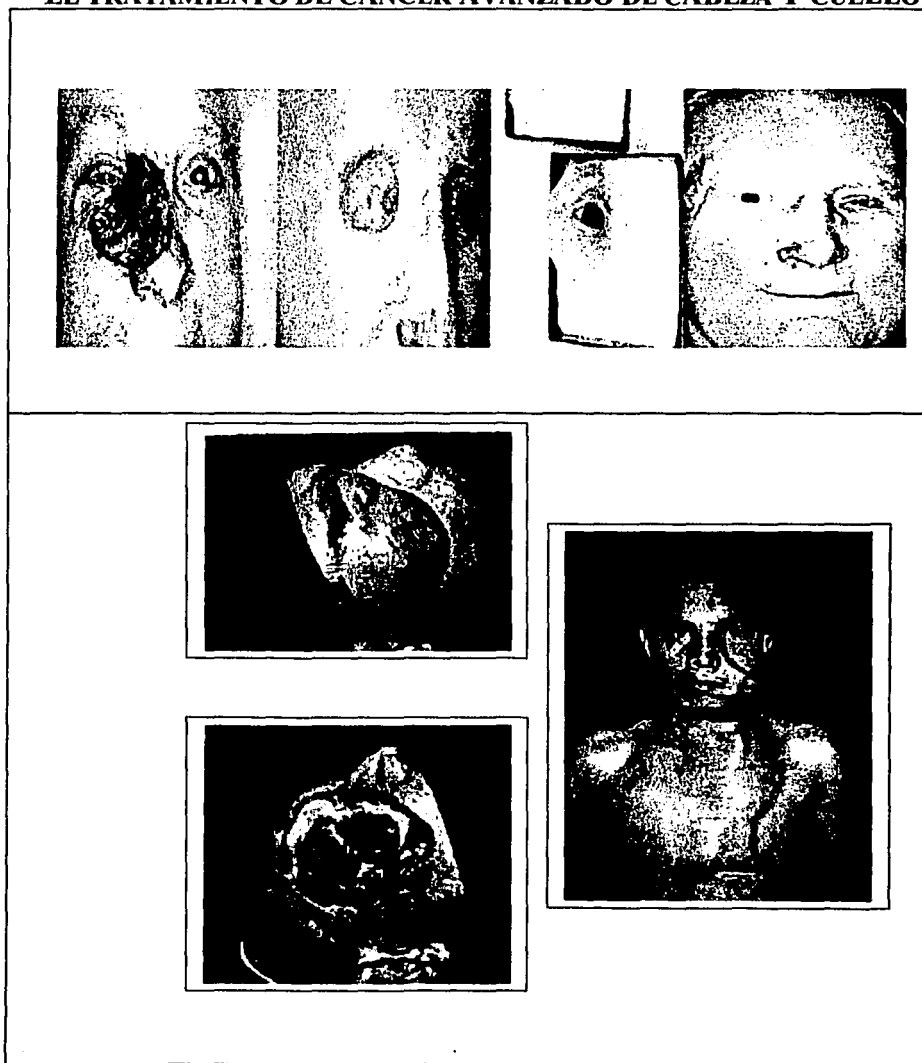
**FIGURA 15. PLANEACION DEL TRATAMIENTO CON RADIOTERAPIA**



Con el objeto de incrementar la efectividad de la radioterapia , disminuyendo la toxicidad de ésta, diferentes modalidades están siendo utilizadas, los mejores resultados se han obtenido utilizando hiperfraccionamiento de dosis o hipertermia <sup>O'Brien 1986, Jess 1977</sup>. Las posibilidades quirúrgicas en este grupo de pacientes incluso con fines paliativos se hace menos viable debido a la extensión, el sitio del tumor y por morbilidad inducida por los regímenes agresivos de tratamiento. A pesar de los avances mencionados no existe un claro impacto en la supervivencia a largo plazo por lo que el manejo óptimo de estos tumores no está del todo definido <sup>Shantz 1997, Barrera-Franco 1998</sup>.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**FIGURA 16. ABORDAJE MULTIDISCIPLINARIO EN  
EL TRATAMIENTO DE CÁNCER AVANZADO DE CABEZA Y CUELLO**



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## CANCER DE MAMA

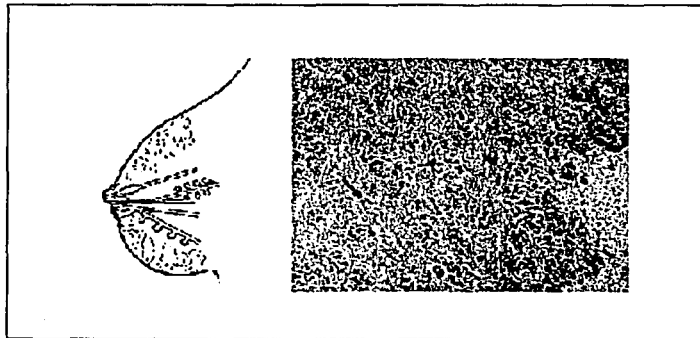
El cáncer de mama es la principal causa de muerte en mujeres en países desarrollados, se estima que en el año 2001, 192,000 desarrollarán este tumor y 40 200 morirán como consecuencia de éste <sup>Greenlee 2001, Chu 1996</sup>. La incidencia de esta neoplasia es menor en Asia y África, lo que sugiere que factores como menarca, peso, ingesta de grasas etc., pudieran contribuir al desarrollo de este tumor <sup>Willet 2000, Pike 1993</sup>.

La asociación a ciertos factores familiares se ha postulado, en especial BRCA1 y BRCA2; sin embargo, solamente del 5 al 10% de los cánceres de mama están asociados a mutaciones específica en BRCA1, BRCA2, p53, ATM, PTEN, MLH1, o MSH2 <sup>Rosen 1995</sup>.

## HISTOLOGIA

Desde el punto de vista histopatológico el 95% de los tumores en esta localización se originan en elementos epiteliales. En el 70-80% de los casos se trata de carcinoma infiltrante (Figura 17) <sup>Elston 1991</sup>, de 5 al 10% lobulillar <sup>Fitzgibbon 2000</sup> y menos frecuentemente pueden diagnosticarse como medulares, mucinoso, <sup>Gaffey 1995</sup> y otros.

FIGURA 17. CARCINOMA CANALICULAR INFILTRANTE

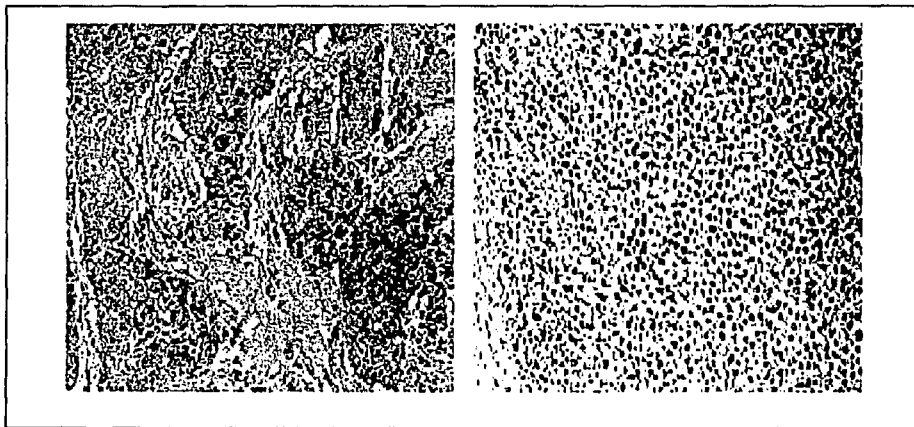


TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Las células neoplásicas en el cáncer canalicular infiltrante pueden ser: (a) bien diferenciadas, formando glándulas, con núcleos uniformes y ausencia de mitosis. (b) moderadamente diferenciadas, las cuales tienen moderada diferenciación glandular, con cierto pleomorfismo nuclear y, (c) pobremente diferenciadas, en donde no existe formación glandular, marcada atipia celular y actividad mitótica considerable. Este tipo de tumor con frecuencia se presenta asociado a carcinoma ductal o lobulillar, factores importantes a considerar cuando se deciden cirugías conservadoras<sup>Gasparini1993, Hayes 1996</sup>

El carcinoma lobulillar está caracterizado por la presencia de células pequeñas, las cuales infiltran el tejido mamario y la grasa, habitualmente crecen alrededor de los lobulillos normales, la presencia simultánea de carcinoma *in situ* hasta en el 75% de los casos, este tipo de tumor frecuentemente es multicéntrico y bilateral (Figura 18)<sup>Elston 1991, Fitzgibbons 2000</sup>

FIGURA 18. CARCINOMA LOBULILLAR



Las neoplasias mucinosas, constituyen un grupo de tumores clínicamente menos agresivos a los anteriormente descritos. Histológicamente es frecuente observar abundante infiltrado linfo-plasmocitario (Figura 19)<sup>Gaffey 1995, Gasparini1993, Hayes 1996</sup>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**FIGURA 19. CARCINOMA MUCINOSO**

La evaluación patológica es el elemento más importante para determinar el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama; varios aspectos son considerados en este análisis, presencia de ganglios metastáticos, tamaño del tumor, histología, grado del tumor e invasión vascular linfática. Gasparini 1993, Hayes 1996

Otros parámetros como la presencia de receptores estrogénicos o de progesterona, sobre-expresión de Her2/neu en pacientes con ganglios negativos, tienen un valor aun no bien establecido Pietras 1995

### **TRATAMIENTO QUIRURGICO**

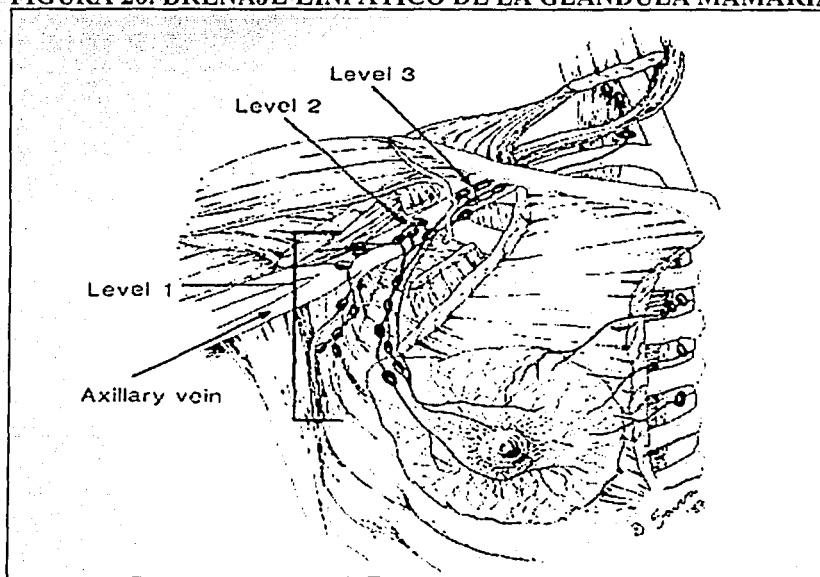
La mastectomía radical es la resección en bloque de la mama, piel, músculo pectoral y el vaciamiento ganglionar axilar. A pesar de lo radical de la cirugía, las posibilidades de curación utilizando únicamente esta modalidad son pocas, con una supervivencia de solo 50% a cinco años. Las fallas a tratamiento inicialmente se pensó, se debían a la incompleta disección ganglionar, lo que originó la realización de procedimientos quirúrgicos radicales, extendidos, en los que se resecaban los ganglios mamarios internos. El análisis de supervivencia no mostró ventajas con respecto a cirugías más conservadoras, por lo que se

decidió realizar tratamientos quirúrgicos menos radicales. Los procedimientos quirúrgicos más utilizados en la actualidad son; La mastectomía radical modificada, en donde se reseca la mama, la fascia del músculo pectoral mayor y algunos ganglios axilares y, la mastectomía simple, en la cual no se reseca el músculo, ni se realiza disección ganglionar Halsted 1907, Turner- Warwick 1959, Veronesi 1981, Turner 1981, Veronesi 1987, Chevinsky 1990

En el momento actual, la disección ganglionar tiene un papel en la estadificación; sin embargo, la eficacia de los tratamientos sistémicos, el estudio del ganglio centinela, y la supervivencia en mujeres con ganglios axilares negativos, ha cuestionado el beneficio de este procedimiento en algunos centros oncológicos Turner 1981, Veronesi 1987, Chevinsky 1990

El drenaje linfático de la mama incluye los grupos ganglionares axilares, mamario interno y supraclaviculares. Los ganglios axilares están agrupados en 3 niveles, el nivel I son aquellos que se encuentran en el borde ínfero-lateral del músculo pectoral menor, el nivel II se considera la región que aloja a los ganglios posteriores al pectoral menor por debajo de la vena axilar, finalmente en el nivel III se encuentran los ganglios localizados en la parte media del pectoral menor y contra la pared torácica (Figura 20) Turner 1981, Veronesi 1987, Chevinsky 1990

**FIGURA 20. DRENAJE LINFÁTICO DE LA GLANDULA MAMARIA**



TESIS CON FALLA DE ORIGEN



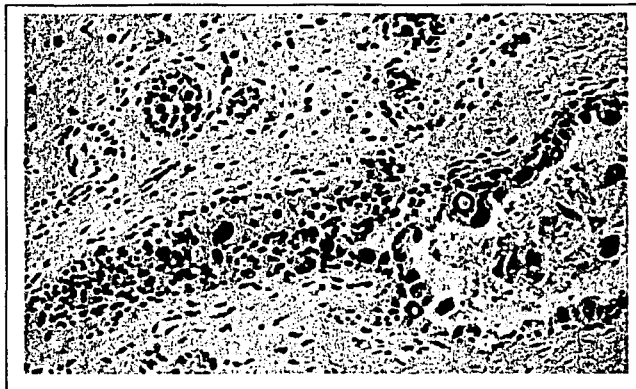
El porcentaje de metástasis en ganglios nivel II varía de 1.5 a 29% y aun cuando es posible la presencia de metástasis en nivel III sin tener metástasis en el nivel I la incidencia es de apenas 0.2 a 0.4%. Lo que se traduce clínicamente en que la posibilidad de desarrollar metástasis ganglionares en el nivel III en mujeres con disección de los niveles I y II varía del 1.3 al 3% Turner 1981, Veronesi 1987, Chevinsky 1990

La evaluación de los factores pronósticos en cáncer de mama había sido un ejercicio académico hasta recientemente en que dos metanálisis indicaron la utilidad de quimioterapia en pacientes con ganglios negativos y en aquellas mujeres con factores de mal pronóstico. Aproximadamente el 30% de pacientes con ganglios negativos que no reciben tratamiento adyuvante con quimioterapia mueren por enfermedad; el 70% de estas pacientes sobrevive aun sin terapia adyuvante. Es pues necesario en análisis de otras variables que pudieran incidir en el diagnóstico de estas pacientes Turner 1981, Veronesi 1987, Chevinsky 1990

## TRATAMIENTO QUIMIOTERAPEUTICO

El cánc. de mama es uno de los tumores sólidos más quimiosensibles. Las drogas activas incluyen antraciclina y antraquinonas, antimetabolitos, alcaloides de la Vinca y taxanos. El blanco de estos agentes es variado, actúan a diferentes niveles del ciclo celular, particularmente en la síntesis de DNA y RNA. En este tumor, recientemente se han utilizado otros tipos de terapia como el Trastuzumab, un anticuerpo monoclonal dirigido contra el oncogen c-erbB-2 Coates 1987, Enddelsman 1991, Toicher 1996, DeGregorio 1989, Gelmon 1994, Salmón 2001

En ocasiones histológicamente puede documentarse el efecto del tratamiento en el tumor y en los ganglios, las imagenes observadas varían desde respuestas patológicas completas, respuestas parciales o no respuestas. El tejido tumoral es remplazado en los casos en los que existen respuestas por fibrosis o necrosis (Figura 21).

**FIGURA 21. HISTOLOGIA DE CANCER DE MAMA POST QUIMIOTERAPIA.**

Los agentes quimioterapéuticos se emplean solos o en combinaciones, existen terapias iniciales o de primera línea en los que se combinan 5 fluorouracilo, mitomicina C y adriamicina y terapias de segunda y tercera líneas que emplean diferentes combinaciones de fármacos.

A continuación se enlistan algunos de los agentes más utilizados:

**Antraciclonas y antraquinonas.** Antes de la aparición de los taxanos, la antraciclina y sus congéneres especialmente la doxorubicina, eran consideradas las drogas más eficaces para este tumor con un porcentaje de respuesta de 35 a 50%. Los efectos colaterales incluyen además de náusea y vómito, la inducción de daño miocárdico. La incorporación a liposomas ofrece una modalidad interesante de tratamiento, la principal limitante es el desarrollo del síndrome mano-pie. Como monodroga su uso es limitado; sin embargo, su combinación con ciclofosfamida y adriamicina, proporciona un porcentaje de respuesta de 20 a 60% mujeres vírgenes de tratamiento Fossati 1998, Nabholz 1999,

**Agentes alquilantes** La ciclofosfamida como droga única no se utiliza en esta neoplasia, pero se utiliza en combinación con 5FU y adriamicina. La toxicidad incluye hematuria por inflamación vesical. Los agentes alquilantes se asocian con un riesgo mayor de desarrollar posteriormente, leucemia mielocítica aguda Aisner 1995, Tarnok 1988

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Cisplatino y carboplatino.** Se utilizan a dosis altas como monodroga, las maneras más frecuentemente utilizadas son en combinación con ciclofosfamida y adriamicina<sup>Sledge 1989</sup>.

**Antimetabolitos.** Al igual que los agentes alquilantes los antimetabolitos como el metotrexate se utiliza en combinación con otras drogas.

El 5-FU y sus derivados se utilizan ampliamente en el tratamiento del cáncer de mama, en diferentes esquemas, su administración en infusión aumenta la efectividad de estos agentes<sup>Green 1991</sup>

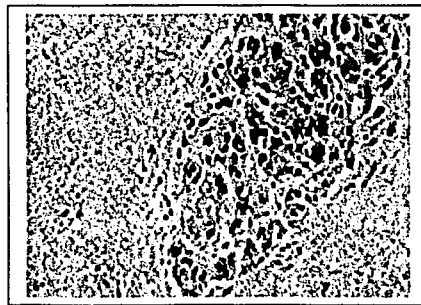
**Alcaloides de la Vinca:** La vincristina, vinblastina vinorelbine, y vindesina, actúan evitando el ensamble de los microtúbulos, lo que inhibe la replicación celular. Se utilizan en varias combinaciones con agentes alquilantes, antimetabolitos, taxanos, etc<sup>Ainsler 1991</sup>.

**Taxanos.** Los taxanos estabilizan los microtúbulos induciendo arresto en la fase G2 del ciclo celular. El paclitaxel utiliza como vehículo aceite de castor y alcohol lo que induce reacciones anafilácticas, por lo que se administra en combinación con dexametazona y antihistamínicos<sup>Papadimitriou 2001, Winer 1998, Blum 1999</sup>.

## TRATAMIENTO CON RADIOTERAPIA

Esta modalidad terapéutica constituye una parte fundamental del tratamiento del cáncer de mama, se emplea como única modalidad o más frecuentemente para consolidar tratamiento quirúrgico o post quimioterapia. Su papel en el tratamiento de enfermedad cutánea, metástasis óseas y cerebrales esta bien establecido (Figura 22)<sup>Pérez 1989</sup>.

**FIGURA 22. CAMBIOS INDUCIDOS POST RADIOTERAPIA**



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CANCER DE CERVIX

El cáncer cérvico uterino es una de las principales causas de muerte por cáncer en los países en vías de desarrollo, en donde se presentan 371,200 casos anualmente, con una mortalidad hasta del 50%. En México, esta enfermedad es responsable de aproximadamente 25% de las muertes por cáncer en mujeres <sup>Greenlee 2001; Dirección general de epidemiología 1996, Doll 1967</sup>.

En la patogénesis de esta neoplasia, son características frecuentes, el inicio de una vida sexual temprana y la presencia de múltiples parejas sexuales, hechos asociados a un riesgo de infecciones venéreas. Como todos las neoplasias malignas, el carcinoma de cérvix es el resultado de una serie de alteraciones en genes que regulan la proliferación celular y la apoptosis. La infección por el virus del papiloma humano (HPV), es muy importante, porque tiene un papel central en el desarrollo de esta neoplasia <sup>Ho 1998</sup>.

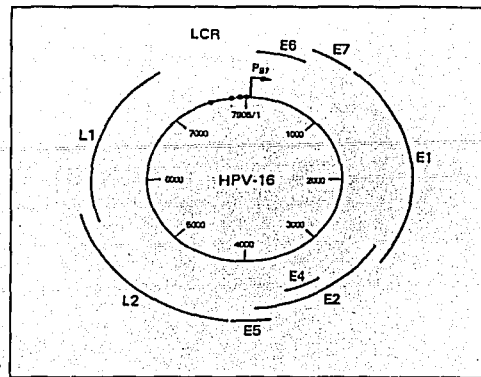
## VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

La asociación del virus del papiloma humano (VPH) en el desarrollo del cáncer de cérvix se encuentra firmemente establecida <sup>Ho 1998</sup>. Este virus se encuentra presente hasta en el 99.7% de todos los tumores <sup>Bosh 1995, Crook 1996</sup>; los tipos virales 16 y 18, se consideran virus de alto riesgo, frecuentemente aislados en lesiones neoplásicas <sup>Bosch 1995</sup>. Otras neoplasias asociadas a este virus incluyen; el cáncer del ano, de pene, de laringe <sup>Crook 1996</sup>.

El virus del papiloma humano es un virus de DNA, pequeño, icosaédrico, de 7 900 pares de bases <sup>Crook 1996</sup>, existen distintos fenotipos asociado a diferentes tipos de cáncer. El genoma del VPH contiene tres regiones; una reguladora no codificadora (URR) y dos regiones codificadoras (regiones tempranas y tardías) <sup>Ho 1998</sup>.

La región temprana posee seis marcos de lectura (E1, E2, E4, E5, E6 y E7). E1 y E2 son fundamentales para la replicación viral, mientras que E6 y E7 codifican para proteínas que son importantes para la inmortalización y transformación de células. Los productos de los genes tardíos (región L) resultan en la formación de la cápside viral (Figura 23) <sup>Ho 1998</sup>.

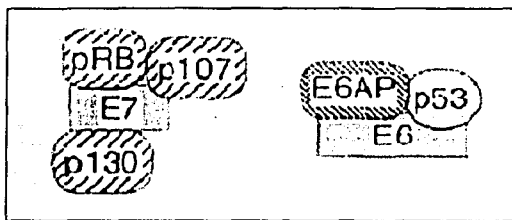
**FIGURA 23. VIRUS DE PAPILOMA HUMANO**



Después de la infección por el HPV existe un periodo de latencia asintomática, seguido de una infección activa en la cual, el virus se replica pero no se integra al genoma, lo que clínicamente se manifiesta como la presencia de condiloma acuminate o bien el desarrollo de neoplasia intraepitelial. La integración al genoma de algunos tipos de HPV altamente oncogénicos contribuye al proceso de la transformación neoplásica <sup>Ho 1998, Bosh 1995, Crook 1996</sup>

En las neoplasias tempranas de bajo grado el virus no se encuentra integrado en el 80% de los casos <sup>Ho 1998, Bosh 1995, Crook 1996, De Grujil 1996</sup>. La integración viral resultante altera los marcos de lectura de E6 y E7, e induce la pérdida de la regulación de la transcripción de E6 y E7, y la sobre-expresión de oncoproteínas. La proteína E6 de los virus de alto riesgo, se une con gran afinidad a p53 e induce la degradación celular de p53, el resultado es la pérdida de sus funciones de pausa en G<sub>1</sub>, y la inhibición de la apoptosis, E7 interactúa con la proteína del retinoblastoma (Rb), lo que induce la disociación del factor de transcripción E2F que resulta en la pérdida del control del ciclo celular (Figura 24) <sup>Ho 1998, Bosh 1995, Crook 1996, De Grujil 1996</sup>

**FIGURA 24. INTEGRACIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO**



El DNA del virus se encuentra integrado en las lesiones invasoras en más del 99% de los casos <sup>Crook 1996</sup>. Debido a su larga fase preclínica, el cáncer de cérvix es una neoplasia ideal para detectarse en etapas preinvasoras, como ha sido demostrado en algunos países con programas de detección oportuna eficaces, lo que se traduce como una reducción importante en la frecuencia de la neoplasia en estadios invasores y disminución importante en la mortalidad <sup>Sasieni 19965</sup>.

### **INMUNIDAD CONTRA EL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO**

Existen evidencias de que la infección por VPH y las enfermedades malignas asociadas a ésta, puede inducir respuestas humorales y celulares contra la cápside y las proteínas oncogénicas del virus. Histológicamente, se ha observado infiltración leucocitaria, lo que ha documentado indirectamente la importancia de la inmunidad en el desarrollo del tumor y de lesiones asociadas con el virus de papiloma. En pacientes con SIDA, esta neoplasia se ha considerado como parámetro para definir enfermedad, y en pacientes seropositivos a VIH existe una frecuencia mayor de condilomas, estos hechos refuerzan la importancia del sistema inmune en el control de la infección por VPH. Sin embargo, el papel que el virus tiene en el desarrollo de inmunidad contra el cáncer cervicouterino no está totalmente aclarado <sup>De Grujil 1998, Evans 1997, Coleman 1994, Arany 1996, Alexander 1996</sup>.

### **HISTOLOGIA Y CLINICA**

Las neoplasias epidermoides son los tipos histológicos más frecuentes (80%) (Figura 25), en el 15% son adenocarcinomas (mucinoso, endometroide células claras, seroso) y de 3 a 5 % adenoescamosos <sup>Kurman 1992, Albores-Saavedra 1997</sup>.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

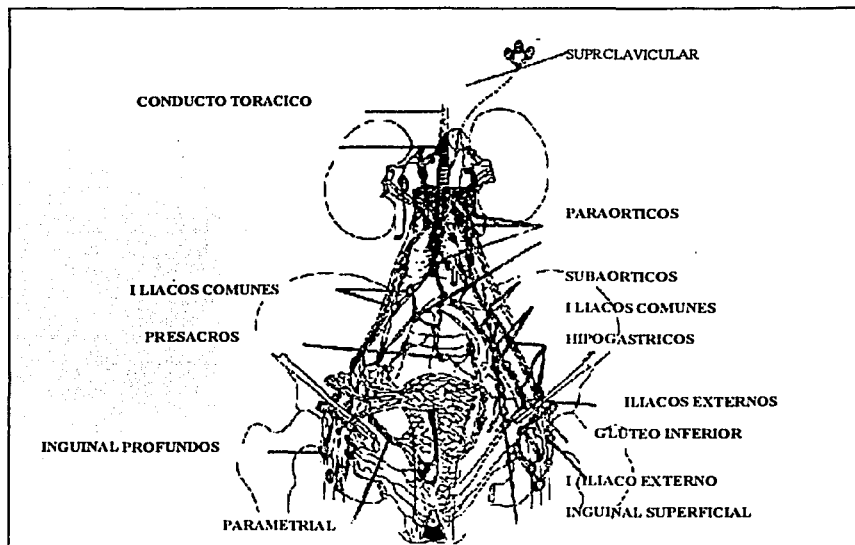
---

**FIGURA 25. CARCINOMA EPIDERMOIDE DEL CERVIX UTERINO****ESTADIFICACION CLINICA**

La etapificación clínica de este tumor se realiza basándose en el tamaño de tumor, invasión a parametrios, vagina y órganos vecinos. El crecimiento habitualmente es lento y las metástasis a distancia tardías. Dos clasificaciones son empleadas, la de la FIGO y la de la AJC Benedet 2000, Lagasse 1980, American Joint Committee 1998.

El carcinoma cervical sigue un patrón de progresión relativamente ordenado, se caracteriza al inicio, por diseminación locorregional a los órganos pélvicos (Figura 26), ganglios linfáticos regionales, y posteriormente a órganos a distancia. La elección del tratamiento depende de factores como; el estadio clínico, el tamaño tumoral, presencia de ganglios pélvicos infiltrados por tumor, la histología, condiciones mórbidas y la preferencia de la paciente.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**FIGURA 26. CADENAS GANGLIONARES PELVICAS****TRATAMIENTO****ESTADIOS CLINICOS TEMPRANOS**

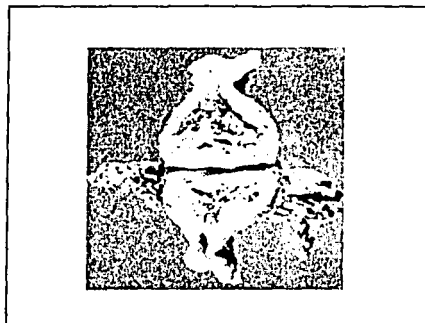
La cirugía permanece como el tratamiento de elección (excluyendo aquellas con contraindicaciones médicas para la cirugía) para todas las pacientes con enfermedad micro invasora (Estadios IA1, IA2). Estas pacientes, se curan en el 100% de los casos (Figura

27) Piver 1974, Landoni 2001, Inoue 1990

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**FIGURA 27. PRODUCTO DE HISTERECTOMÍA**



Para las pacientes con enfermedad temprana, estadios IB1, IB2 y IIA, el tratamiento con radioterapia o en cirugía es igualmente eficaz <sup>Landoni 1997</sup>. La elección depende de las preferencias de las pacientes, y de las tendencias de tratamiento Institucionales. Para este grupo de pacientes, la histerectomía radical con linfadenectomía pélvica bilateral (incluye la resección de ganglios iliacos, para-aórticos, obturadores pélvicos etc.), es el tratamiento de elección <sup>Landoni 2001</sup>. La supervivencia para las pacientes con estadios IB1 es de alrededor del 90-95% mientras que para estadios IB2 y IIA es del 60-90% a 5 años <sup>Inoue 1990</sup>.

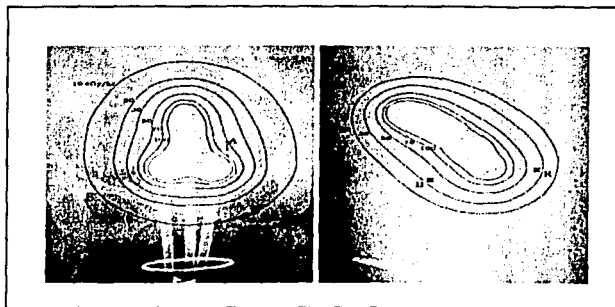
### **ENFERMEDAD AVANZADA**

El tratamiento de las pacientes con enfermedad avanzada (IIB a IVA), tradicionalmente ha consistido en radioterapia como modalidad única (Figura 28), siendo el pronóstico de estas pacientes poco alentador, los porcentajes de supervivencia a 5 años varían del 70 a 15% <sup>Lanciano 1991</sup>. Sin embargo, a partir de los años ochenta, se han publicado varios estudios fase I y II de quimioterapia concomitante con radiación, utilizando principalmente, cisplatino, fluorouracilo y mitomicina C. Inicialmente la evaluación de estas terapias no demostraron mejor supervivencia; sin embargo, recientemente se han publicado resultados del uso de quimio-radioterapia concomitante versus radioterapia sola, que sugieren un mejor control de la enfermedad <sup>Keys, 1999; Rose, 1999; Whitney 1999; Peters 1999;</sup>

<sup>Morris 1999</sup>

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**FIGURA 28. BRAQUITERAPIA**



Esta modalidad de tratamiento resulta novedosa como tratamiento adyuvante en etapas tempranas y como tratamiento definitivo en estadios IB2 <sup>Peters 1999, Morris 1999</sup>. Cinco estudios aleatorizados comparando radioterapia sola y quimioterapia neoadyuvante o concomitante demostraron consistentemente la superioridad del tratamiento combinado en términos de período libre de enfermedad y supervivencia y la notable reducción no sólo de las recurrencias pélvicas sino también de las sistémicas <sup>Peters 2000</sup>. Estos resultados sugieren que el uso de quimioterapia concomitante en todas las pacientes con tumores localmente avanzados (del IB2 al IVA) <sup>Peters 2000</sup> Dueñas, comunicación personal.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## SISTEMA INMUNE

La inmunología moderna surgió a partir de los conocimientos generados por químicos y microbiólogos quienes estudiaron y describieron los diferentes componentes del sistema inmune. Una vez establecidas las bases químicas del sistema inmune, los inmunólogos han iniciado el estudio de la inmunobiología.

El sistema inmune une dos tipos de moléculas, los receptores para el reconocimiento, que son moléculas no heredadas que se generan por recombinación somática, y moléculas generadas en línea germinal que son responsables de la información interna del individuo. Estas moléculas heredadas incluyen enzimas y organelos para el procesamiento de antígenos, moléculas del complejo principal de histocompatibilidad para la presentación de antígenos, citocinas que orquestan la inflamación y regulan las respuestas y diferentes tipos de moléculas presentes en la superficie celular y que son responsables de la adhesión entre células y de las distintas interacciones celulares. El sistema inmune combina la información germinal y somática utilizando un lenguaje químico adquirido a través de la evolución.

El sistema inmune esta constituido por una compleja red de órganos y células a través de los cuales es posible reconocer antígenos y en determinadas situaciones iniciar una respuesta inmune<sup>Paul 1999</sup>.

Entre las células que conforman este sistema, los linfocitos tienen un papel central ya que son estos los que determinan la especificidad de la respuesta inmune. Estos, interactúan con células presentadoras de antígeno (monocitos/macrófagos, células de Langerhans, células dendríticas) y responden a señales provistas por estas y otras células, a través del contacto entre células o bien en respuesta a distintos factores solubles<sup>Roitt 1969, Clark 1989., Haynes 1979</sup>. Otros tipos celulares comparten algunas de las funciones de los linfocitos, sin embargo, estas células (NK) poseen diferencias en la forma de reconocimiento antigénico, en los mecanismos efectores y en las funciones que estas llevan a cabo<sup>Savary 1986, Trinchieri 1989</sup>. Son necesarias también, células no hematopoyéticas (células epiteliales especializadas), las cuales proveen un ambiente anatómico en el cual las respuestas inmunes suceden, o bien son capaces de secretar factores solubles que regulan el crecimiento celular o la activación de ciertos genes<sup>Pober 1990</sup>.

Los linfocitos al igual que el resto de las células hematopoyéticas, se originan a partir de una célula tronco localizada en la médula ósea (excepto durante la embriogénesis temprana) en donde inician una serie de cambios regulados y coordinados en la expresión de genes que da lugar a las distintas formas y funciones de las células maduras<sup>Spangrude 1988, Huang 1992, Terstappen 1991</sup>. Es importante mencionar que entre todas las células hematopoyéticas, únicamente los linfocitos inician una serie de rearrreglos que dan lugar a un repertorio heterogéneo de receptores para el reconocimiento antigénico, y posteriormente bajo un estricto control son seleccionadas aquellas clonas con que no reconocen auto antígenos. Estos eventos se llevan a cabo en dos tipos de compartimientos anatómicos; los órganos linfoides primarios, (el timo y la médula ósea) los cuales poseen las características anatómicas y funcionales necesarias para favorecer la diferenciación y/o maduración de estas células<sup>Picker 1999</sup>.

La médula ósea es el órgano hematopoyético más grande en la mayoría de los mamíferos. La médula ósea se encuentra contenida en los huesos largos (dentro de cavidades cilíndricas) y en huesos planos (en el intersticio). Representa el 5% de la masa corporal en el adulto y es el principal órgano hematopoyético en la vida post natal. Este es un órgano dinámico, el cual responde a través de diferentes mecanismos a las demandas del organismo, principalmente debido a que muchos de los elementos sanguíneos formados ahí son de vida corta <sup>Picker 1999</sup>.

Al llegar a la médula ósea, los precursores de las células hematopoyéticas posiblemente se asientan en nichos específicos en donde existen células del estroma nodrizas, células reticulares, adipocitos, macrófagos y proteínas de matriz extracelular, los cuales favorecen los procesos de diferenciación de las distintas estirpes celulares y en los cuales c-kit y su ligando pudieran tener un importante papel <sup>Picker 1999, Hhuang 1990</sup>.

Durante la embriogénesis los linfocitos B migran de los distintos órganos hematopoyéticos a la médula ósea en donde a través de la vida continúan generándose y diferenciándose <sup>Mimelches 1971, Osmond 1974</sup>. El programa de maduración de los linfocitos B incluye la expresión de antígenos linaje específicos y el rearrreglo de los genes que codifican para el receptor para antígeno de este tipo celular, las inmunoglobulinas <sup>Picker 1999, Osmond 1986, Kincade 1989, Banchénau 1992, Burrow 1993</sup>. Los eventos que dan lugar a la diferenciación de las células B han sido descritos extensamente y no serán mencionados en este trabajo <sup>Picker 1999, Osmond 1986, Kincade 1989, Banchenau 1992, Burrow 1993</sup>.

En el timo se llevan a cabo funciones importantes relacionadas a la linfopoyesis de células T <sup>Miller 1986</sup>. Este órgano recibe los progenitores de células T, provee el micro ambiente necesario para la diferenciación de los linfocitos T en desarrollo, y coordina la liberación de estos a la periferia <sup>Miller 1986</sup>. Durante el proceso de diferenciación, los timocitos inician una secuencia ordenada de eventos que son instructivos e inductivos y que los llevan a la expresión de una serie de genes, en particular los que codifican para la expresión del receptor para el reconocimiento del antígeno, el TCR <sup>Miller 1986</sup>. Es importante mencionar también que un pequeño porcentaje de células T se diferencia en otros órganos como la lámina propia del intestino <sup>Picker 1999</sup>.

El timo es una estructura piramidal localizada en el mediastino antero-superior, detrás del esternón. Está rodeado por una cápsula delgada de tejido conectivo, la cual se invagina formando el septum, que subdivide al timo en lóbulos, el septum está vascularizado, posee linfáticos y se encuentra innervado <sup>Crديور 1980</sup>. Cada lóbulo está dividido en dos capas; la externa o corteza y la interna que conforma la médula, existe además una delgada capa externa que conforma la corteza subcapsular, sitio en el que residen los timocitos más inmaduros <sup>Crديور 1980</sup>. Los linfáticos eferentes forman la unión córtico-medular que es el sitio en donde los vasos salen a irrigar la corteza y la médula, sin embargo, no existen linfáticos aferentes <sup>Crديور 1980</sup>. Los extremos distales del septum forman los espacios perivascuales, sitios en donde existe intercambio de células y solutos, y en donde se encuentran células mieloides, células plasmáticas, células cebadas y células B residentes en el timo <sup>Crديور 1980</sup>.

Las células epiteliales se encuentran en ítimo contacto con los timocitos tanto en la corteza como en la médula, además de secretar distintos factores solubles, estas células expresan moléculas clase II <sup>Moore 1967</sup>. Existen algunos tipos de células epiteliales que reciben nombres específicos, en la corteza existen células nodrizas y en la médula corpúsculos de Hassall, cuya función es desconocida <sup>Levine 1980</sup>. En el timo también es posible identificar células musculares presentes en la médula, las cuales derivan de la cresta neural, poseen en la superficie receptores para acetil colina y posiblemente se encuentren involucradas en la patogénesis de la miastenia gravis <sup>Levine 1980</sup>.

El desarrollo embrionario sucede en forma temprana incluso antes de que otros órganos linfoides se desarrollen, en la 7 u 8 semana de vida intrauterina cuando empieza a ser colonizado por células tronco <sup>Owen 1981</sup>. El crecimiento del timo es continuo hasta la pubertad, etapa en la que alcanza el máximo desarrollo, a partir de esta edad inicia su involución y en el adulto es remplazado casi en su totalidad por tejido adiposo, sin embargo, continúa habiendo tejido linfoepitelial potencialmente funcional <sup>Steinman 1986</sup>.

Desde el punto de vista embrionario el timo es diferente a otros órganos linfoides ya que en éste, el estroma se deriva de células epiteliales las cuales provienen del endodermo de la tercera bolsa faríngea así como del ectodermo <sup>Bockman 1985, Aúnes 1990</sup>. Existen varios

tipos de células epiteliales en el timo las cuales interactúan con los timocitos de acuerdo con su localización, estas expresan moléculas del complejo principal de histocompatibilidad, secretan citocinas (IL-1, IL-3, IL-6, IL-7, LIF, y GM-CSF), y expresan moléculas de adhesión en la superficie de células epiteliales tímicas (LFA-3 e ICAM-1), posiblemente transduzcan señales al unirse con sus respectivos ligandos en los timocitos, finalmente en el timo se producen hormonas tímicas y proteínas quimiotácticas <sup>Haynes 1981, Cardin 1991, Le 1990, Dalloul 1991, Lobach 1985.</sup>

Existen varias proteínas secretadas por el epitelio de este órgano, las cuales en conjunto reciben el nombre de hormonas tímicas. La timopoyetina es un grupo de moléculas generadas por el procesamiento alternativo de un gen, esta hormona promueve la diferenciación de células T, inhibe el desarrollo de linfocitos B, interactúa con los receptores de acetil colina y estimula la liberación de hormona adrenocorticotrófica y endorfina beta <sup>Dardene 1988, Kendall 1991</sup>.

Las timosinas son hormonas de bajo peso molecular (3-4 kd) que promueven la diferenciación T en el timo <sup>Dardene 1988</sup>. La timulina es un nona-péptido que se une al zinc, el cual potencia las señales a través del receptor de IL-2 y promueve el desarrollo de timocitos IL2-R+ <sup>Dardene 1988, Kendall 1991</sup>.

El timo posee tres compartimentos funcionales y de maduración diferentes: (a) en la zona subcapsular se encuentran los linfoblastos más indiferenciados; (b) la corteza esta densamente poblada por timocitos que proliferan rápidamente adquiriendo la apariencia de linfoblastos los cuales son seleccionados en este nivel y (c) la médula en donde existen linfocitos que inician la etapa final de su maduración y selección antes de ser exportados a la circulación <sup>Wu 1991, Rahemtulla 1991, Campana 1989, Haynes 1988</sup>. En el proceso de diferenciación las células T expresan una serie de moléculas de superficie las cuales permiten su interacción con otras células y factores solubles, que reflejan un programa genético, capaz de ser modificado por señales externas, y a través de los cuales se selecciona y modula el repertorio de linfocitos T <sup>Scollay 1980, Fowlkes 1989, Crispe 1987, Lobach 1985</sup>.

Los protimocitos provenientes de la médula ósea que se asientan en el timo expresan CD4<sup>lo</sup>CD8<sup>c</sup>CD44<sup>+</sup>CD25<sup>c</sup>c-Kit<sup>+</sup> <sup>Van Dongen 1980</sup>, es posible que estas células estén

comprometidas a convertirse en células T, sin embargo, en esta etapa algunas pueden diferenciarse a linfocitos B, células NK o células dendríticas<sup>Shortman 1990</sup>, la diferenciación dependerá del micro ambiente en el que se desarrollen<sup>Shortman 1990</sup>. Al continuar con la diferenciación adquieren CD2, y CD3 citoplasmático, no expresan CD4 ni CD8 en la superficie (células doble negativas [DN]) y en este momento las células inician el rearreglo de las cadenas  $\beta$ ,  $\gamma/\delta$ <sup>Jenkinson 1989</sup>. Las células  $\gamma/\delta$  pueden permanecer como DN o adquirir CD8 y abandonar el timo para terminar su diferenciación en sitios terciarios<sup>Picker 1999</sup>, la mayoría de las células permanecen en el timo y empiezan a expresar los co-receptores CD4+/CD8+ [doble positivo (DP)] para un poco después rearreglar la cadena  $\alpha$  y regular negativamente CD4 o CD8, lo que los convierte en linfocitos T  $\alpha/\beta$  CD4+ o CD8+ [unipositivos]<sup>Picker 1999</sup>.

El mayor porcentaje de células que constituyen la corteza tímica, son células inmaduras que se encuentran en división, cerca del 25% de la población DP son blastos grandes, el 75% restante son células pequeñas que se encuentran en la fase G<sub>0</sub>. Las células DP tienen un período de tránsito de aproximadamente 3 días, en esta etapa estas células pueden terminar su maduración o bien ser eliminadas por apoptosis<sup>Picker 1999</sup>.

Al regular negativamente CD4 o CD8 las células DP aumentan la expresión de CD3, del receptor para antígeno de la célula T (TCR) y otras moléculas de superficie que les permitirán migrar y asentarse en los distintos órganos<sup>Jenkinson 1989</sup>. En la médula los linfocitos permanecen por 12 a 16 días y tienen pequeños cambios, los linfocitos maduros probablemente abandonan el timo a través de las venas post capilares<sup>Jenkinson 1989</sup>.

Durante la diferenciación celular intratímica deben de seleccionarse de los distintos TCR generados durante la recombinación génica<sup>Scntman 1991</sup>, aquellos capaces de algún reconocimiento del complejo principal de histocompatibilidad. La molécula CD4 interactúa con moléculas clase II y las células CD8+ con moléculas clase I, ambas moléculas están presentes en las células dendríticas epiteliales presentes en la corteza tímica (SELECCION POSITIVA)<sup>Scntman 1991</sup>. Una vez realizada esta primera selección, se deberán eliminar clones celulares con alta reactividad para moléculas del complejo y



péptidos propios (delección clonal), o cuando menos inactivados (anergia clonal) y de esta manera evitar la auto reactividad (SELECCION NEGATIVA)<sup>Sentman 1991, Picker 1999</sup>

La restricción del tipo celular requiere de una serie de eventos moleculares durante los cuales se activan y/o se silencian diferentes genes; algunos de estos codifican para citocinas, receptores de citocinas, moléculas que transmiten señales y factores de transcripción<sup>Fisher 1991</sup>

Una vez diferenciados los linfocitos migran a tejidos periféricos organizados; los órganos linfoides secundarios (bazo, ganglios linfáticos, placas de Peyer etc) que constituyen los sitios en donde ocurren las respuestas inmunes<sup>Rouse 1982</sup>. En forma adicional, una proporción importante de linfocitos y macrófagos, se encuentran en circulación y de esta manera es posible que células involucradas en la función inmune tengan acceso a diferentes compartimentos en donde se genera una respuesta inmune local y en ocasiones a partir de ésta, una respuesta sistémica<sup>Young 1999</sup>

A diferencia de otros sistemas, el inmune se encuentra distribuido en toda la economía y por lo tanto requiere de condiciones específicas que favorezcan los encuentros entre células inmunes y el antígeno en sus distintas formas de presentarse<sup>Freitas 2001</sup>. Este sistema además de plasticidad requiere de movilidad lo que permitirá ejercer la función de reconocimiento, activación y ejecución de diferentes funciones. La complejidad de este sistema radica precisamente en los distintos requisitos indispensables para su funcionamiento; generación de un amplio espectro de posibilidades para reconocer al antígenos, presencia de un micro ambiente que en forma eficiente favorezca y regule la expansión de linfocitos con distintas especificidades, y finalmente debe dispersar los linfocitos efectores y de memoria a los sitios en donde son requeridos<sup>Freitas 2001</sup>

El conocimiento de la fisiología del tejido linfoide resulta fundamental para el entendimiento de la respuesta inmune. Cada órgano linfoide tiene particularidades anatómicas que le confieren un potencial funcional específico, en éstos, coexisten células linfoides de diferentes características con células del estroma y se establecen complejas interacciones entre éstas<sup>Freitas 1993</sup>

En la actualidad el conocimiento del sistema inmune requiere el estudio de varios elementos y células, sin embargo, dado que los linfocitos T tienen un papel fundamental en la iniciación, regulación y por tanto en el reconocimiento de lo propio, el contenido de este documento discutirá principalmente a este tipo celular haciendo hincapié en que el funcionamiento correcto de estas requiere interacciones múltiples.

## CELULAS EFECTORAS

### LINFOCITOS T: CARACTERIZACION Y SUBTIPOS CELULARES.

Los linfocitos T constituyen una población de células del sistema inmune diversa. Los linfocitos T circulan, tienen la capacidad de asentarse en diferentes órganos linfoides y no linfoides y son responsables de inducir citotoxicidad, ayuda, colaboración además de secretar distintas sustancias <sup>Benoist 1999</sup>.

Durante el desarrollo intratímico los linfocitos T se diferencian, rearreglan los genes que codifican los receptores para el reconocimiento antigénico ( $\alpha\beta$ - $\gamma\delta$ ), son seleccionados positiva y negativamente mediante el reconocimiento de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad y adquieren las características necesarias para funcionar como linfocitos de "ayuda" CD4<sup>+</sup> o "citotóxicos" CD8<sup>+</sup> <sup>Ikuta 1990, Adkins 1991, Benoist 1992, Dunon 1997, Zinkernagel 1978, von Bohemer 1978, Teh 1988</sup>.

Los linfocitos Th1, mediante la secreción de IFN  $\gamma$  y el FNT  $\beta$ , son responsables de las respuestas celulares clásicas que inducen la destrucción de organismos intracelulares, así mismo en circunstancias de desregulación inducen respuesta autoinmunes órgano-específicas. Los linfocitos Th2, a través de la IL-4 e IL-5 están involucrados en respuestas de tipo inflamatorio y alérgico, activan células cebadas y eosinófilos e inducen IgE <sup>Benoist 1999</sup>.

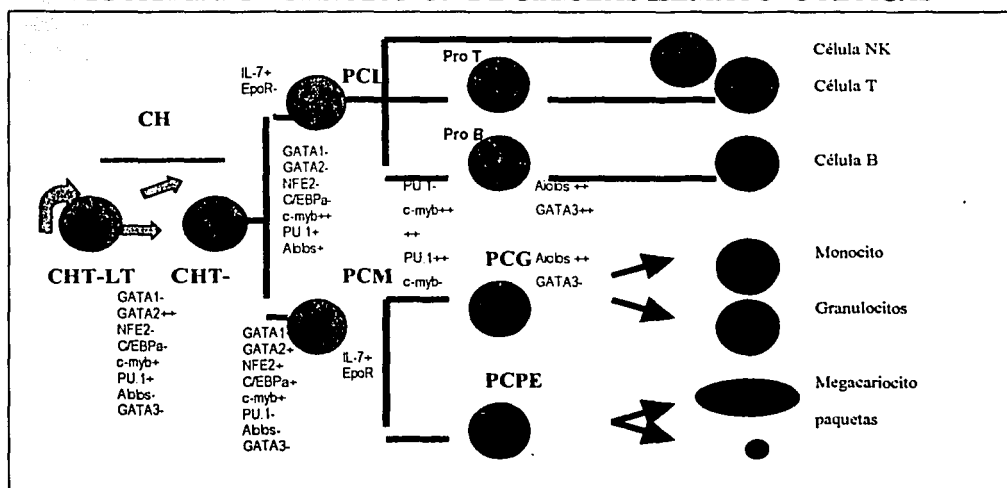
Es posible que exista una célula madre que dé lugar a todos los tipos de células linfoides (precursor común linfoide-PCL-) <sup>von Boehmen 2000</sup>, el fenotipo de estas células pudiera corresponder a la población descrita de células IL-7 $\alpha^+$ , Lin<sup>-</sup>Sca<sup>low</sup> c-kit<sup>low</sup>, las cuales pueden dar lugar *in vivo* a linfocitos T, B y células NK <sup>von Boehmen 2000</sup>. La diferenciación

subsecuente involucra la activación de diferentes genes; es posible que para el desarrollo de las células B se requiera Pax5 <sup>von Boehmen 2000</sup>, mientras que Notch 1 se requiere para el desarrollo de células T, pero no células NK <sup>Akashi 2000</sup>. Es interesante el hecho de que células CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>ckit<sup>+</sup> dan lugar a linfocitos T y células NK, lo que sugiere que Notch participa en una etapa más temprana en el desarrollo de estas células <sup>Di Santo 2000</sup>

Notch 1 regula a las proteínas HES, las cuales reprimen la función de los factores de transcripción bHLH en el compromiso de linaje al inducir la expresión de Pax5 en linfocitos preB <sup>Di Santo 2000</sup>. Por otro lado, las proteínas Id, forman heterodímeros con bHLH los cuales interfieren con la expresión de TCR- $\alpha$  y por lo tanto con el desarrollo de las células T. <sup>Rivera 2000</sup>

La regulación génica de los factores de transcripción involucrados en la regulación de citocinas pudiera también modular el crecimiento y la diferenciación de las células linfoides: Los linfocitos  $\gamma\delta$  dependen de la presencia de IL-7 en mayor grado que los  $\alpha\beta$ , para el desarrollo de células NK es indispensable la presencia de IL-15 (Figura 29) <sup>Di Santo 2000</sup>

FIGURA 29. DIFERENCIACIÓN DE CELULAS HEMATOPOYETICAS

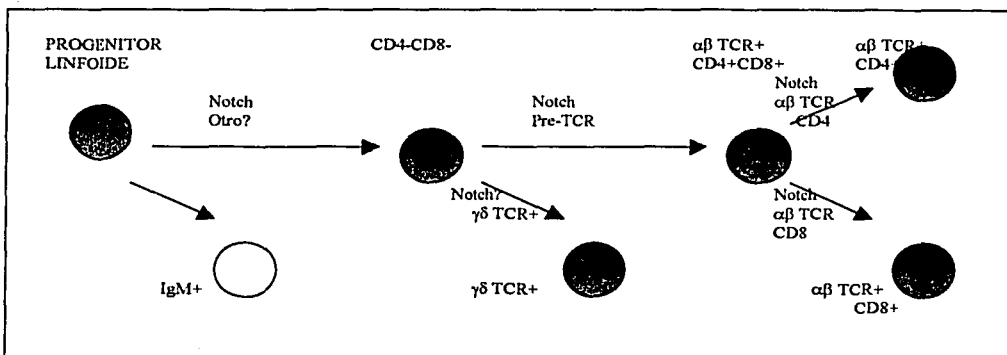


TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los miembros de las proteínas Notch juegan un papel fundamental en el desarrollo de las células pro-T <sup>Fleming 1998</sup>. Las proteínas Notch son receptores transmembranales, existen cuatro miembros de la familia que interactúan con algunos ligandos transmembranales que incluyen; Jagged 1, Jagged 2, Delta1 y Delta "like" 1 y 3 <sup>Milner 1999</sup>. Es posible que las señales provistas por Notch sean suficientes para inducir la diferenciación de células T <sup>Pui 1999</sup>, incluso para la diferenciación de linfocitos T  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$  (Figura 30).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

FIGURA 30. DIFERENCIACIÓN DE LINFOCITOS T

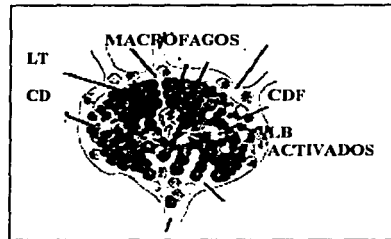


Algunos autores proponen que Notch-1 regula la expresión de CD4 vs. CD8 durante el desarrollo de la célula T. De acuerdo a esta proposición, los linfocitos DP que se seleccionan en base a las moléculas clase I, reciben una señal de Notch para regular negativamente CD4 y las DP seleccionadas por clase II reciben la señal para regular negativamente CD8 <sup>Delfos 2000</sup>. La expresión de CD4 esta regulada durante el desarrollo, por la presencia de un elemento silenciador que evita su expresión en la etapa de linfocitos CD4-CD8- y en la de los linfocitos CD8+CD4- <sup>Sawada 1994, Siu 1994</sup>. El gen de CD4 se encuentra en una región rica en genes, localizada en el cromosoma 12, está flanqueado por el "enhancer" específico LAG-3 y por un grupo de tres genes más, que incluyen al gen que codifica para la subunidad  $\beta 3$  de la proteína G heterodimérica <sup>Robey 1996</sup>. En el silenciador del gen que regula la expresión de CD4, existe un sitio de unión

unión para HES-1 lo que sugiere que a través de un mecanismo dependiente de HES-1, la señal de Notch puede reprimir la expresión de CD4<sup>Robey 1996</sup>. Una propuesta interesante es el hecho de que Notch-1 se encuentra involucrado en la maduración de CD4 y CD8<sup>Delffs 1998</sup>. Existen sin embargo, otros mecanismos que regulan la expresión positiva de CD4; una secuencia iniciadora, un dedo de zinc asociado a Myc y una proteína consenso de unión Ets. Tres proteínas de unión al núcleo CD4-1, CD4-2 y CD4-3. CD4-2 es una proteína consenso que se une al grupo de proteínas de alta movilidad (HMG), TCR1/LEF1. Cd4-1 y CD4-3 contiene una caja E la cual es reconocida por un factor helix-asa-helix (bHLH), en particular CD4-3 posee dos cajas E (bHLH-HEB y E2A). El heterodímero interactúa con la región 5' de la caja E y esta regula en forma importante la expresión de CD4. En etapas subsiguientes los linfocitos CD4 maduros pueden no requerir de este mecanismo<sup>Delffs 1998</sup>.

Durante el desarrollo de las células T existe un punto de control muy importante en linfocitos DNCD25+CD44-, en esta etapa se rearrreglan los genes  $\beta$  del receptor para antígenos de la células T y una cadena  $\alpha$  monomórfica unida a CD3, en esta etapa la activación a través de la tirosina cinasa LCK del pre-receptor es muy importante para el desarrollo de la célula T, SLP-76 y LAT son dos proteínas adaptadoras las cuales participan en la cascada de transducción de señales iniciada por la activación a través del TCR, y son necesarias para la expansión y diferenciación de los timocitos doble negativos, SLP-76 es esencial para la exclusión alélica del locus de TCR $\beta$ <sup>Piviniouk 2000</sup>.

Los linfocitos T CD4 naïve se encuentran casi en forma exclusiva en los órganos linfoides secundarios<sup>Bradley 1996, Mackay 1996, Reinhard 2000</sup>. En el caso de los ganglios linfáticos en la paracorteza, la razón de esta selectividad radica en el hecho de que estas células expresan un grupo único de moléculas de superficie cuyos ligandos se encuentran exclusivamente en los vasos endoteliales altos<sup>Piker 1993, Campbell 2000</sup>.

**Figura 31. LOCALIZACIONES CELULARES EN GANGLIO LINFATICO**

La expresión de CD62L permite a las células CD4 naïve rodar en la pared vascular y el receptor para quimocina CCR7 induce activación mediada por integrinas lo que les permite extravasarse. Los vasos endoteliales altos son las únicas estructuras del organismo que expresan los ligandos para dichas moléculas<sup>Cyster 1999</sup>.

La localización restringida de estas células implica necesariamente que células presentadoras de antígenos deben estar presentes en estas áreas, el tipo celular más abundantes en este sitio son las células dendríticas<sup>Piker 1993, Campbell 2000</sup>. Otras células presentadoras de antígenos, como los linfocitos B y macrófagos se encuentran fuera del área T, lo que sugiere que el tipo celular capaz de presentar antígenos a las células T naïve son las células dendríticas (Figura 31)<sup>Piker 1993, Campbell 2000</sup>.

Es posible que los otros tipos celulares (linfocitos B y macrófagos), en los ganglios linfáticos presenten y transporten antígenos, inaccesibles a las zonas T<sup>Garside 1998</sup>. En la zona T existen dos tipos de células dendríticas, las derivadas de precursores mieloides las cuales expresan CD11b y las derivadas de precursores linfoides que expresan DEC-205 y CD8 $\alpha$ , el papel que estas células tienen en la presentación de antígenos a linfocitos CD4 naïve no se conoce, aunque se especula que pudiera incidir en la diferenciación a Th1 o Th2<sup>Steinman 1997, Ingulli 1997, Luther 1997</sup>.

Una vez que las células CD4 naïve reconocen al antígeno, proliferan al secretar niveles elevados de IL-2 en un ambiente rico en IL-12, que a su vez es secretada por las células dendríticas, posteriormente las células CD4 migran al folículo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Las células naïve expresan CCR7, un receptor específico para quimiocinas producidas por las células del estroma presente en las zonas T, la migración al folículo sucede varios días después, a través de la expresión de CXCR5, que los linfocitos CD4 abandona las zonas T y se dirigen al folículo <sup>Ingulli 1997, Luther 1997, Sato 2000</sup>

Posterior a la expansión clonal existe una rápida disminución de linfocitos CD4-antígeno específico. Esta disminución es consecuencia de un mecanismo dependiente de Fas e independiente de bcl-2 o viceversa, dependiendo del tiempo de exposición al antígeno. Este mecanismo es indispensable para mantener el equilibrio en el número de linfocitos, en situaciones en donde existe estimulación antigénica crónica, es posible que exista muerte inducida por activación <sup>Kneitz 1995, Leung 2000, Lantz 2000, Van Parijs 1998</sup>. Los linfocitos sobrevivientes después de esta fase de expansión constituyen los linfocitos de memoria, los cuales tienen mayor afinidad al péptido presentado en el contexto del CPH <sup>Lantz 2000</sup>.

[Los linfocitos CD4 de memoria son capaces de migrar a través de los linfáticos aferentes después de adquirir el nivel más alto de diferenciación (definido por la producción de IFN $\gamma$ ) y alojarse en órganos no linfoides <sup>Jenkins 2001</sup>.

Aquellos linfocitos que expresan los niveles más altos de IL-12, dejan de expresar CCR7 y expresan un ligando de P-Selectina, adquiriendo la capacidad para producir niveles elevados de IFN $\gamma$  <sup>Antia 1998</sup>. Algunos autores sugieren la presencia de un grupo de linfocitos CD4+ activados, que no logran dividirse suficientemente, no alcanzan niveles elevados de producción de IL-12, y mantienen la expresión de CCR7. En estas circunstancias, estas células migrarán a los ganglios en forma similar a como lo hacen las células naïve <sup>Picker 1995</sup>. Las células CCR7- permanecen en circulación y son capaces de alojarse en tejidos que expresen P-Selectina <sup>Jenkins 2001</sup>. Al cesar el estímulo antigénico las células CCR7- mueren, en contraste con las células de memoria CCR7+ que tendrán la capacidad de responder y alcanzar niveles más elevados de citocinas en respuesta al antígeno, constituyéndose en respondedoras secundarias y adquiriendo la capacidad de asentarse en órganos no linfoides <sup>Jenkins 2001, Merica 2000</sup>.

Los linfocitos CD4 naïve tienen la capacidad de diferenciarse en linfocitos  $T_H1$ ,  $T_H2$  y  $T_H3$ , produciendo cada uno ciertas combinaciones de citocinas. El mecanismo por el cual adquieren esta polaridad no se conoce, sin embargo, es posible que las circunstancias en las que reconoce al antígeno es fundamental para definir la diferenciación<sup>Takeda 1996</sup>. Esta polaridad en la producción de citocinas de alguna manera regula la respuesta inmune, esta particularidad en el patrón de citocinas secretadas se ha observado también en linfocitos CD8 y en células NK<sup>Jenkins 2001</sup>.

Los linfocitos citotóxicos expresan el co-receptor CD8 compuesto por las cadenas  $CD8\alpha$  y  $CD8\beta$ , de 32 y 34 kD respectivamente. Existen dos formas de presentación en la superficie de las células: como homodímero  $\alpha\alpha$  o heterodímero  $\alpha\beta$ <sup>Gorman 1988</sup>. Ambas cadenas pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y están codificadas por genes muy relacionados. El coreceptor expresado por los linfocitos  $\alpha\beta$  expresa el heterodímero mientras que las  $\gamma\delta$  y las células NK habitualmente expresan el homodímero  $\alpha\alpha$ <sup>Baume 1990</sup>. La cadena alfa puede ser regulada postranscripcionalmente por citocinas como la IL4. Varios elementos reguladores *cis* están involucrados en la expresión de las cadenas alfa y beta. No se sabe si, al igual que para CD4, existe un silenciador de CD8<sup>Sawada 1994, Siu 1994</sup>.

Los linfocitos CD8 al ser activados posterior al reconocimiento del antígeno, inician expansión clonal. Los linfocitos CD8+ ejercen una función citotóxica a través de dos mecanismos moleculares; la exocitosis de gránulos que depende de la molécula formadora de canales (perforina), y de la regulación positiva de FasL (CD95L) que inicia la muerte celular programada al inducir la agregación de Fas (CD95) en la célula blanco. Ambas respuestas están iniciadas por la activación a través del RCT y estimulan la cascada de caspasas en la célula blanco, induciendo muerte por apoptosis. Las células CD8+ también secretan citocinas (TNF, IFN $\gamma$ ) y algunas quimiocinas<sup>Loovin 1996</sup>.

La secreción de gránulos ocurre a través de un proceso en el cual se fusionan las membrana de las vesículas contenedoras de los gránulos con la membrana plasmática. Este mecanismo está regulado en respuesta a una señal provista a través de la



membrana, secretando las vesículas que contienen gránulos preformados y en forma constitutiva si las vesículas contienen gránulos sintetizados de novo <sup>Burges 1987</sup>.

Los gránulos presentes en los linfocitos T citotóxicos miden de 0.5 a 1  $\mu\text{m}$  de diámetro y tienen una estructura heterogénea que consiste en dos componentes; el core del gránulo, rodeado en ocasiones por una doble membrana <sup>Peters 1991</sup> (Tipo I) y por multivesículas de 30 a 150 nm (Tipo II). Los gránulos tipo I contienen perforina, granzima y proteoglican y los tipo II enzimas lisosomales.

La perforina es una glicoproteína de 555 aminoácidos, de 65 a 75 kDa, la cual en presencia de calcio se inserta en la membrana de la célula blanco, se polimeriza formando canales que inducen la muerte celular <sup>Young 1986</sup>. Posee dos secuencias homólogas importantes para su función; a) secuencias homólogas al complejo de ataque de membrana del complemento, que posiblemente esté relacionado a la capacidad de formar canales <sup>Shinkai 1988</sup>, y b) un dominio C2 muy relacionado a otras proteínas que unen calcio al interactuar con lípidos <sup>Nalefski 1996</sup>. Es posible que la perforina no induzca lisis *per se*, sino al permeabilizar las células blanco para la granzima <sup>Kim 1989</sup>.

Las granzimas son serín proteasas, pertenecientes a la subfamilia de la serín-proteasas presentes en macrófagos, células cebadas y neutrófilos <sup>Lutzelchwab 1997</sup>. Se sintetizan como proenzimas, poseen un dipéptido de activación el cual es removido en el gránulo por la dipeptidil peptidasa I. En pH neutro tienen carga positiva la cual es importante para la formación de complejos iónicos con los gránulos de proteoglican y para post secreción de componentes extracelulares polianiónicos. La catepsina C (dipeptidil peptidasa I), tiene como función la activación de la pre-granzima al romper el dipéptido aminoterminal <sup>Kummer 1996</sup>.

Los proteoglicanos se encuentran en gránulos secretados por varias células hematopoyéticas y tienen un importante papel en la unión a otros gránulos. En linfocitos T citotóxicos y en células NK son moléculas heterogéneas compuestas por una estructura de serglicina a las cuales se encuentran unidas un número variable de cadenas glicosaminoglicano <sup>Sivens 1989</sup>.

Las lisosimas presentes en los linfocitos T citotóxicos, no poseen las características clásicas de las presentes en otras células y estas se encuentran asociadas a proteínas granulares de membrana (LAMP1, LAMP2) las cuales junto con la granulofisina son importantes para la autoprotección de los linfocitos T citotóxicos <sup>Peters 1989, Kannan 1996</sup>. La granulolisina es una pequeña proteína presente también en las vesículas de los linfocitos T citotóxicos y es posible que interactúe con la perforina en la formación de gránulos <sup>Pena 1997</sup>, así mismo participa la calreticulina <sup>Dupuis 1993</sup>.

Estudios en animales deficientes en perforina indican la importancia de la perforina en el rechazo a tumores <sup>Kagi 1994, van den Brock 1996</sup>, la vía Fas/Fas L resulta más compleja de estudiar, sin embargo pudiera estar asociada en inhibir la inducción de inmunosupresión contra tumores <sup>Dupuis 1993</sup>.

Los linfocitos T  $\gamma/\delta$  son una población de linfocitos tisulares, en otras localizaciones (como en gánlios o en circulación), se encuentran en bajo número. Estas células se están presentes en forma abundante en tejidos epiteliales (piel, intestino, pulmón, epitelios genitales, etc) en donde se conocen como linfocitos intra epiteliales (IEL) <sup>Hayday 2000</sup>. Reconocen oligonucleótidos de manera no restringida por moléculas clásicas del MHC. El receptor posee, al igual que el  $\alpha/\beta$  y las inmunoglobulinas, regiones variables y constantes. Estudios recientes sugieren que la estructura de del receptor  $\gamma/\delta$  se ha conservado a través de la evolución, por un período cercano a 450 millones de años <sup>Hayday 2000</sup>.

Llama la atención que en sitios en donde los linfocitos T  $\gamma/\delta$  se encuentran en forma abundante no existe una gran variabilidad antigénica (de acuerdo a algunos autores) y este hecho así mismo sugiere la posibilidad de reconozcan antígenos independientemente de la presencia de células dendríticas <sup>Janeway 1988, Asarnow 1988</sup>. La mayoría de los linfocitos T  $\gamma/\delta$  son DN para CD4 y CD8, en los casos en los que expresan CD8, esta molécula expresa las cadenas  $\alpha\alpha$ , algunas células expresan CD28, CD40L, receptores inhibitorios de células NK, NKG2D. Al igual que los linfocitos  $\alpha\beta$ -CD8<sup>+</sup>, su actividad citotóxica esta mediada por perforinas, granulolisina, Fas/FasL e IFN  $\gamma$  <sup>Hayday 2000</sup>. Es posible que los linfocitos T  $\gamma/\delta$  sean las primeras células T en

desarrollarse ya que rearreglos de las cadenas  $\gamma/\delta$  pueden detectarse en la semana 8 de gestación y se expanden posteriormente por estimulación periférica, los linfocitos  $T\gamma/\delta$  se desarrollan antes de que la TdT se active, hecho que probablemente contribuya al limitado repertorio de recombinación VDJ <sup>Hayday 2000</sup>. Es posible así mismo, que exista una diferenciación extratímica de estas células, en particular en el intestino delgado <sup>Hayday 2000</sup>.

Recientemente se ha descrito la unión del RCT $\gamma/\delta$  a péptidos presentados por moléculas codificadas por genes relacionados con moléculas clase I (MICA, B, C, D), cuyos ligandos incluyen KIR, NKG2D, hsp58 <sup>Hayday 2000</sup>. Así mismo los linfocitos  $T\gamma/\delta$  interactúan con varios tipos celulares; con células epiteliales, la interacción está mediada a través de NKG2D, integrina  $\alpha_E\beta_7$ , la cual interactúa con la caderina presente en las células epiteliales. Las células epiteliales al secretar citocinas como la IL-7 inducen la activación de los linfocitos  $T\gamma/\delta$ , al activarse, regulan positivamente quimiocinas linfotácticas, MIP1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$ , RANTES, linfotactina que reclutan linfocitos T CD8+, por lo que las células  $\gamma\delta$  ejercen su función efectora directa o indirectamente a través de células T (mediante citocinas y quimiocinas). Las células  $T\gamma\delta$ , también pueden interactuar con células mieloides, linfocitos B y células T $\alpha\beta$  <sup>Hayday 2000</sup>.

Los linfocitos T  $\gamma\delta$  tienen una importante función en proveer protección primaria contra diferentes agentes infecciosos (*Mycobacterias*, protozoarios, virus) y regulan la inflamación asociada a procesos infecciosos. Su participación en enfermedades autoinmunes en el rechazo a trasplantes y reacciones de hipersensibilidad retardada ha sido documentada <sup>Harrison 1996, Shihora 1996, Seymour 1998</sup>. Su papel en cáncer no se encuentra bien estudiada, aunque existen algunos reportes que describen su participación contra tumores al reconocer proteínas de choque térmico. Es posible que estas células participen también en el control de la proliferación de linfocitos B y T evitando el desarrollo de neoplasias de este tipo <sup>Peng 1996, Penninger 1995</sup>.

Una tercera población de linfocitos T son las células NK, las cuales inicialmente fueron caracterizadas por su habilidad de lisar células tumorales e infectadas por virus, en la

actualidad se les reconoce como células involucradas en un amplio espectro de funciones inmunes, filogenéticamente, es posible que las células NK aparecieran antes que los linfocitos T <sup>Savary 1986, Trinchieri 1989</sup>.

Los mecanismos de activación de células NK empiezan a ser caracterizados, comparten mecanismos similares de lisis a los de los linfocitos T citotóxicos <sup>Berke 1994</sup>. Las células NK producen grandes cantidades de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , factores estimulantes de colonias e IL-3, IL10 e IL-5 <sup>Mendes 2000</sup>. Expresan receptores para IL-2, IL-12, IL-5, TNF $\alpha$ , los cuales al igual que los receptores específicos para estas células pudieran influenciar su función <sup>Perussia 1991</sup>.

Las células NK no expresan el receptor para antígeno como la célula T, sin embargo, algunas de las cadenas que conforman el complejo CD3 se encuentran en la superficie de las células NK; la cadena  $\zeta$  se expresa en asociación con CD16 (Fc $\gamma$ RIIIA) <sup>Anderson 1989, Lanier 1989</sup>. La expresión de CD56 por células NK no es compartido con otras células hematopoyéticas, CD56 es un molécula de 140kDa, producto del procesamiento alternativo del gen que codifica para la molécula de adhesión neuronal (NCAM) que esta involucrada en el desarrollo del sistema nervioso central y de interacciones célula-célula <sup>Hercend 1985</sup>. CD56 posee tres dominios parecidos a las inmunoglobulinas y dos dominios parecidos a la fibronectina III <sup>Cunniham 1987, Nitta 1989</sup>. CD57 es expresado también por algunos subtipos de células NK y por células neuronales.

Recientemente han sido descritos varios receptores presentes en la superficie de las células NK con funciones inhibitorias o activadoras. Los receptores inhibitorios humanos, KIR (también conocidos como p58, NKB1, p70, p140, p50 y NKAT), CD94 y NKG2, parecen tener un importante papel en la especificidad de las funciones citotóxicas de las células NK <sup>Yokoyama 1999</sup>.

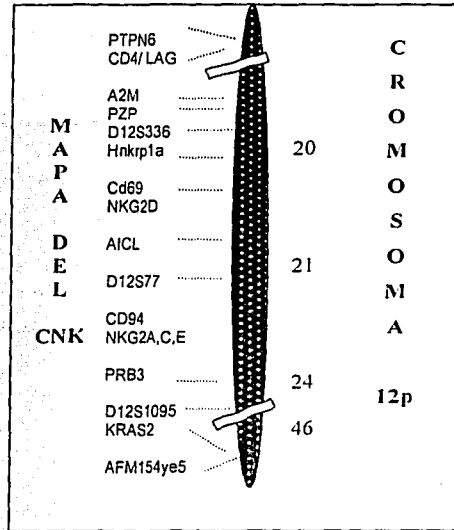
Las células NK en contraste con los linfocitos T citotóxicos no están restringidas por las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad <sup>Piantek 1985</sup>, sin embargo, esta no restricción parece ser alelo específica <sup>Colonna 1993</sup>. Esta característica de *restricción* de las células NK parece ser complementaria a la de las otras células citotóxicas, especialmente en la lisis de células tumorales <sup>Gattoni-Celli 1992, Korkolopoulou 1996</sup>.

De acuerdo a estas observaciones las células NK poseen dos tipos de receptores; de activación e inhibitorios. Los receptores de activación incluyen a CD16, NK1.1, LAG3, 2B4, NK-TR1, CD2, CD69, Ly6, gp42, p50, Ly49D<sup>Yokoyama 1999</sup>. CD16 está asociado a la capacidad de inducir lisis a través de anticuerpos (ADCC)<sup>Takai 1994</sup>. NK1.1 fue descrita en ratón, es una molécula que se expresa así mismo por células NK-T, en ratón está codificada por el gen MusNKR-PIC la cual da lugar a tres isoformas<sup>Lanier 1994</sup>. 2B4 es una proteína integral de membrana tipo I, miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, homóloga a CD48 y CD58<sup>Garni-Wagner 1993</sup>. LAG-3 se encuentra relacionada estructuralmente a CD4, se expresa en células NK y en células T activadas, aunque es posible que pueda unirse a las moléculas clase II del CPH, su actividad no está restringida por éstas<sup>Baixeras 1992</sup>. NK-TR1 parece estar asociada a la actividad citotóxica natural de las células NK y es independiente de la actividad de ADCC de estas<sup>Ortaldo 1997</sup>.

Los receptores inhibitorios de las células NK poseen dos estructura generales; Receptores tipo C parecidos a lectinas, que son proteínas integrales de membrana tipo II, unidas por puentes disulfuro y proteínas integrales de membrana tipo I pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas<sup>Yokoyama 1995</sup>. Este tipo de moléculas parecen estar asociadas a la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad e incluye a p58 (HLA-C)<sup>Colonna 1993</sup> y a NKBI (p70), asociado con HLABw4<sup>Litwin 1994</sup>, ambas moléculas conocidas como KIR poseen dominios intracitoplasmáticos que contienen dos secuencias ITIM las cuales pueden reclutar mediadores capaces de inhibir la activación celular, estas moléculas KIR, son inhibitorias específicas para moléculas clase I del CPH<sup>Dohring 1996</sup>. Otros receptores inhibitorios en humanos son parecidos a lectinas e incluyen a CD94, NKG2A las cuales pueden formar heterodímeros<sup>Sivori 1996</sup>.

Recientemente ha sido identificado el complejo de genes NK (NKC), es posible que este complejo al igual que el CPH codifique para moléculas estructuralmente diferentes importantes para la actividad de células NK (Figura 32)<sup>Yokoyama 1999</sup>.

FIGURA 32. MAPA DEL COMPLEJO DE GENES NK



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Las células NK1.1 definen a una población celular que produce grandes títulos de citocinas y expresan un repertorio restringido del receptor para antígeno de la célula T. Un subgrupo celular expresa CD4+CD8- y produce IL-4, otro subtipo de células expresa TCR+CD4-CD8-<sup>Vicari 1996</sup>. Es posible que una de las funciones que estas células poseen es la regulación, posiblemente negativa de la respuesta inmune<sup>Vicari 1996</sup>.

Las células NKT, son linfocitos T (CD3+) que co-expresan algunos marcadores de células NK (NK1.1), tienen la capacidad de reconocer antígenos glicolípidicos en el contexto de moléculas parecidas a clase I (Clase I "like"), CD1d, a través de su cadena invariante Vα2JαQ. Al unir el antígeno a través de su receptor, las células NKT producen grandes cantidades de citocinas proinflamatorias TH1 (IFNγ y FNT) y TH2 (IL-4 e IL-10), lo que hace difícil entender cuales son las repercusiones en el individuo, es posible que estas células sean importantes en funciones inmunes anti tumorales<sup>Yoshimoto 1995</sup>. No se conoce como sucede esta dicotomía, sin embargo, antígenos con alta afinidad para el RCT, pudieran inducir principalmente respuestas

TH1, estimulando a células CD4 convencionales a secretar citocinas TH2 <sup>Mendiratta 1997, Chen 1997, Smiley 1997, Terabe 2000</sup>. Este mecanismo tendría un efecto anti-autoinmunidad, posiblemente mediado por IL-13. Este efecto protector en autoinmunidad pusiera en individuos con tumor evitar la destrucción del tumor <sup>Mendiratta 1997, Chen 1997, Smiley 1997, Terabe 2000</sup>.

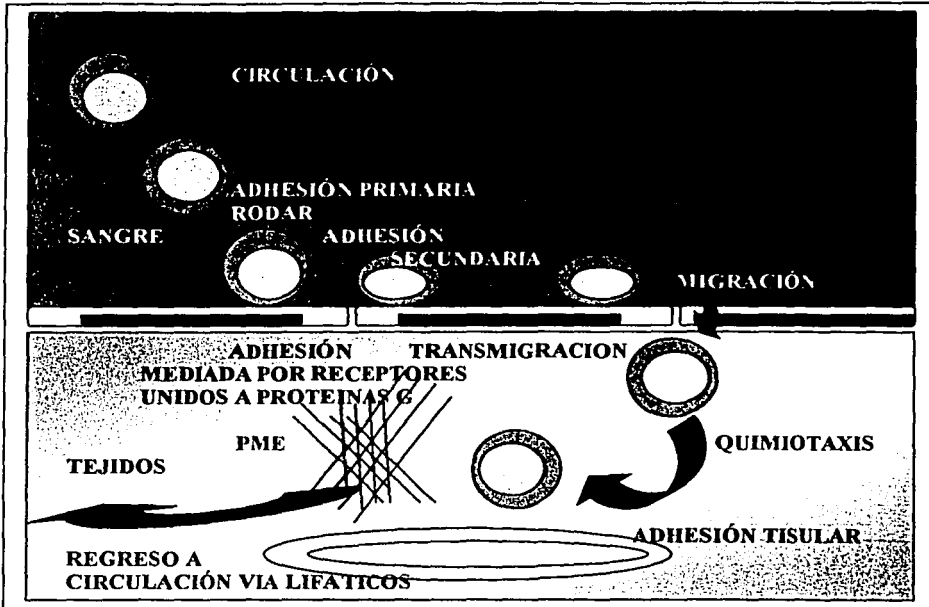
Las células NKT pueden ser CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> o bien CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>. La distribución de estas células es similar a la de las células CD4<sup>+</sup> convencionales, sin embargo, al ser estimuladas las células NKT CD4<sup>+</sup>, estas producen grandes cantidades de IL-4 e IL-13 <sup>Mendiratta 1997, Chen 1997, Smiley 1997, Terabe 2000, Bendelac 1995</sup>. Estudios en modelos animales sugieren que la IL-13 tiene un papel importante en la supresión de respuestas citotóxicas contra tumores. La IL-13 no se une en forma directa a células T por lo que la inhibición debe estar mediada por células con receptores para IL13/IL4 como macrófagos o células dendríticas <sup>Mendiratta 1997, Chen 1997, Smiley 1997, Terabe 2000</sup>.

Las células NKT pudieran ser consideradas el brazo regulador de las respuestas T, de manera específica <sup>Mendiratta 1997, Chen 1997, Smiley 1997, Terabe 2000</sup>.

### CIRCULACIÓN DE LOS LINFOCITOS.

La regulación del tráfico de linfocitos a los distintos ambientes anatómicos posiblemente controlen su diferenciación y regulen su supervivencia <sup>Butcher 1986, Butcher 1996</sup>. Las etapas mediante las cuales los linfocitos son compartamentalizados pueden dividirse en: adhesión del linfocito al endotelio vascular, "rodar" a lo largo del endotelio, activación celular mediada por receptores unidos a proteínas G, arresto dependiente de la activación, movimiento de los linfocitos a través del endotelio y finalmente la compartamentalización de las células (Figura 33) <sup>Butcher 1991, Springer 1995, Imhof 1995</sup>.

FIGURA 33. CIRCULACIÓN DE LINFOCITOS



En el adulto, el número y la distribución de los linfocitos se encuentra en equilibrio. La continua producción o expansión de linfocitos hace necesaria su regulación, y la necesidad de estos de competir por su supervivencia. Este objetivo se alcanza mediante un proceso activo en el que los linfocitos, a través de sus receptores para el reconocimiento del antígeno, reciben señales esenciales para su supervivencia y maduración, al igual que distintos órganos para asentarse y madurar en estos sitios <sup>Takeda 1999, von Boemer 1992</sup>

Es posible que los requisitos para asegurar la supervivencia de los distintos tipos celulares (naive, memoria, linfocitos B, T y CD4 o CD8), sean diferentes, y que la disponibilidad de éstos, module las poblaciones y especificidades existentes <sup>Freitas 2001</sup>. La variabilidad de estructuras anatómicas existentes en el sistema inmune (nichos), pueden ofrecer condiciones alternativas para mantener vivas a la diferentes células <sup>Forster 1996, Mombaerts 1992</sup>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Los centros germinales que se desarrollan a partir de los folículos durante las respuestas T dependientes, es uno de los mejores ejemplos del concepto de nicho en inmunología. Los centros germinales son oligoclonales, las células B que migran a éstos se activan fuera de los centros germinales e inician una expansión que contribuye a la conformación del centro germinal existiendo un número limitado de linfocitos específicos que lo conforman. Los linfocitos proliferantes deben interactuar con las células dendríticas foliculares lo que da una preferencia en la supervivencia aquellas clonal con alta afinidad por el antígeno <sup>Agnes 1999</sup>.

Los distintos subtipos de células T posiblemente ocupan diferentes nichos y es posible que estén independientemente regulados, en ausencia de linfocitos  $\alpha\beta$  no aumenta el número de linfocitos  $\gamma\delta$  y viceversa <sup>Tanchot 1997, Tanchot 1998</sup>. La presencia de alguna población determinada regula negativamente la presencia de las otras poblaciones. Sin embargo los linfocitos CD4+ y CD8+ están co-regulados y la disminución de una subpoblación puede ser compensada con la otra, manteniendo el número de linfocitos constante.

La especificidad del asentamiento de los linfocitos es el resultado de la combinación de diferentes interacciones entre los distintos receptores y sus ligandos <sup>Freitas 2001, Fulcher 1996</sup>. Este proceso, que en linfocitos naive es relativamente homogéneo, en linfocitos de memoria es altamente heterogéneo, mostrando restricciones importantes en la circulación y patrones de selectividad tisular. La regulación positiva de una serie de receptores de asentamiento y de quimiocinas posiblemente sean los responsables de la selectividad <sup>Rocha 1991</sup>.

La adquisición del fenotipo de asentamiento durante la diferenciación T efectora/memoria coincide con la producción de citocinas que le confieren a los linfocitos Th la diferenciación hacia Th1 o Th2 <sup>Rossi 2000</sup>. Recientemente se ha descrito que las células Th1 se unen a la selectina P dirigiendo a través de esta molécula el asentamiento de linfocitos Th1 en ciertos sitios, como la piel o articulaciones en los casos de artritis reumatoide. En contraste las células Th2 expresan el ligando para E selectina, el asentamiento de estas células difiere al de las Th1 <sup>Jenkins 2001</sup>.

## FACTORES SOLUBLES

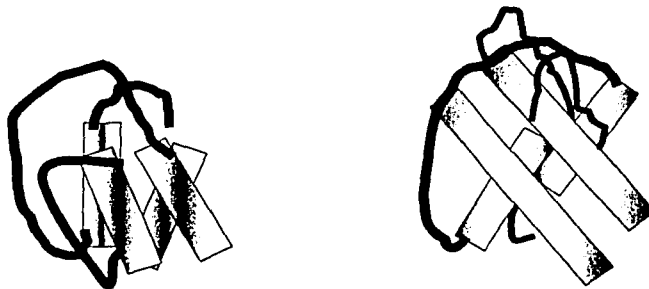
Las citocinas son proteínas secretada por diferentes tipos celulares, que ejercen su función en forma autócrina o parácrina <sup>Leonard 1999</sup>. Las citocinas interactúan transduciendo señales a través de receptores de superficie y generalmente actúan en forma local <sup>Leonard 1999</sup>.

Las citocinas tipo I tienen una estructura que consiste en cuatro alfa hélices, sus receptores comparten así mismo, características similares entre si <sup>Wlodawel 1993, Sprang 1993</sup>, este grupo de proteínas incluye moléculas involucradas en la inmunidad y algunas otras que no participan en los sistemas de defensa <sup>Leonard 1999</sup>.

Las citocinas tipo I pueden ser agrupadas en citocinas de cadenas cortas y citocinas de cadenas largas, las de cadena corta incluyen a la IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, M-CSF, y SCF (figura 34)

;

FIGURA 34. RECEPTORES PARA CITOCINAS TIPO I



Las citocinas tipo I de cadena larga incluyen a la hormona de crecimiento, prolactina, eritropoyetina, trombopoyetina, leptina, IL-6, IL-11, LIF, oncostatín M, factor neurotrópico ciliar, cardiotropina y GCSF <sup>Sprang 1993, Shang 1997</sup>.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los receptores de las citocinas tipo I, son glicoproteínas de membrana tipo I. Poseen cuatro residuos de cisteína conservados y puentes disulfuro Inter-cadenas en la región extracitoplásmica, la región intracitoplásmica contiene una caja rica en prolina que interactúa con la familia de las tirosinas Janus<sup>Cherel 1995</sup>

Los receptores para cinco importantes citocinas en la inmunología (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15) comparten la cadena  $\gamma$ <sup>Takeshita 1992</sup>. Estas citocinas están involucradas en diferenciación, activación y proliferación de linfocitos T, células NK y algunas células no linfoides<sup>Leonard 1999</sup>. Este no es el único caso en el que diferentes grupos de citocinas comparten alguna de las cadenas de sus receptores, el significado biológico pudiera estar relacionado con la regulación de la homeostasis del sistema inmune<sup>Leonard 1999</sup>.

Los interferones constituyen un importante grupo de citocinas, estas proteínas al igual que la IL-10 actúan a través de la unión a receptores de membrana tipo II<sup>Moore 1993, Farrar 1993</sup>. Sus funciones inmunoregulatoras son importantes y han sido extensamente revisadas<sup>Leonard 1999</sup>.

Las llamadas citocinas pro-inflamatorias tienen un importante papel en respuestas inflamatorias mediadas inmunologicamente, y en procesos autoinmunes, a este grupo pertenecen el factor de necrosis tumoral, la familia de IL-1, el factor transformante beta y algunas quimiocinas<sup>Kraker 1999</sup>.

Dos citocinas pertenecientes a este grupo tiene un importante papel en el desarrollo de órganos linfoides; el factor de necrosis tumoral (TNF) y la linfoxina  $\alpha$  (LT)<sup>Chaplin 1998</sup>. Ambas citocinas están estructuralmente relacionadas y fueron inicialmente caracterizadas por su capacidad de lisar células tumorales<sup>Ruddle 1992</sup>, son proteínas homodiméricas que interactúan con los dos receptores caracterizados (TNFRI/p55 y TNFRII/p75)<sup>Ruddle 1992</sup>. La LT puede estar presente en la membrana celular y en esta forma tiene una afinidad diferente por el receptor. TNF y LT son sintetizadas como proteínas transmembranales a tipo II, la forma membranal del TNF puede activar a su receptor, la forma secretora es liberada por una metaloproteinasas llamada TACE<sup>Kriegler 1988, Black 1997, Moss 1997</sup>.

Estudios en animales indican que ratones  $LT\alpha^{-/-}$  muestran un importante defecto en la formación de ganglios linfáticos y placas de Peyer<sup>De Tongi 1994</sup>. Estas alteraciones en ganglios linfáticos no son únicas en ausencia de LT, estudios recientes sugieren su importante papel en la definición de los compartimientos T y B en bazo<sup>Pasparakis 1996</sup>.

Las acciones de la LT y el FNT en la señalización que da lugar a la formación de ganglios linfáticos esta mediada principalmente a través de  $LT\beta R$  y  $TNFR1$ , sin embargo es posible que otros factores influyan en este proceso<sup>Chaplin 1998</sup>.

Las quimiocinas representan una súperfamilia de polipéptidos cuyo peso molecular varía entre los 8 a 16 KDa, al igual que las citocinas, estas ejercen sus funciones a través de la unión a sus receptores<sup>Zlotnik 2000</sup>. Las quimiocinas median respuestas quimiotácticas, inflamatorias, favorecen la migración de ciertas células, maduración de células dendríticas, desarrollo de células T y B, el desarrollo de respuestas TH1 y TH2. Inducen activación de integrinas y algunas de estas favorecen cambios intracelulares como el estallido respiratorio, la trascripción de citocinas así como; angiogenesis, crecimiento tumoral y desarrollo de metástasis, para ejercer su función éstas principalmente son secretadas<sup>Zlotnik 2000</sup>.

La función de las quimiocinas, en general, se puede resumir como el control de la migración de las células hematopoyéticas, incluyendo la mayoría de las células del sistema linfático<sup>Ansell 2001</sup>. Las quimiocinas poseen 4 cisteínas características, dependiendo del motivo expuesto por las dos primeras cisteínas, se clasifican en quimiocinas; a) la subfamilia CXC o alfa que tiene un aminoácido diferente entre los primeros dos aminoácidos e incluye interleucina 8, MIG, IP-10, varios GRO y SDF-1; (ELR.CXC y no ELR-CXC), lb) la subfamilia CC o beta, en las cuales las dos primeras cisteínas están adyacentes en la secuencia y que incluye numerosas quimiocinas entre las que contamos MIP1a, MIP1b, RANTES, MIP3a, MIP3b, 6ckine, TECK, HCC1-4, etc, c) la tercera clase de quimiocina CC o gamma que está representada por una sola quimiocina denominada linfotactín y que ha perdido las cisteínas 1 y 3 y conserva solamente las 2 y 4 y d) la cuarta clase llamada CX3C o delta y cuyo ejemplo es fractalkine que tiene 3 aminoácidos entre las dos primeras cisteínas y que además está

unida a la membrana de diversas células por un puente de mucina<sup>Zlotnik 2000</sup>. La primera y tercera cisteína y la segunda y cuarta cisteína forman puentes disulfuro y aunque solamente forman un puente disulfuro la quimiocina mantiene su función<sup>Zlotnik 2000</sup>.

La especificidad y efectos biológicos de las quimiocinas están mediados por su interacción con los receptores específicos, que pertenecen a la familia de siete receptores transmembranales. Su función se ejerce al enviar señales por miembros de la subfamilia sensible a la toxina de *pertusis* (PTX) G $\alpha$ i de proteínas G heterodiméricas. Dependiendo del tipo de quimiocina a la que unen han sido designados como CXCR1-5, CCR1-9, XCR1 y CX3CR1. Aquellas células que expresan estos receptores son atraídas por gradientes de quimiocinas, formados alrededor de las células productoras de éstas<sup>Ansell 2001</sup>.

Existen patrones de expresión de los receptores para quimiocinas en linfocitos Th1 y Th2, algunos de estos receptores se expresan consistentemente después de la diferenciación Th1 y Th2, sin embargo, la expresión de algunos otros son variables y pudiera reflejar el estado de diferenciación celular<sup>Benoist 1999</sup>. Los linfocitos T naïve, no responden habitualmente a quimiocinas producidas como resultado de la inflamación<sup>Hedrick 1998</sup>. Algunas citocinas ejercen su función al inducir la expresión de algunos receptores como CCR1, CCR2 y CCR5 en linfocitos activados en presencia de IL-2. Sin embargo, CXCR4 se expresa tanto en linfocitos en reposo como en activados<sup>McGrath 1999, Saada 1998, Burger 2000</sup>.

El papel de algunas quimiocinas durante la embriogénesis también es importante como lo demuestran los hallazgos en algunos modelos animales como; los ratones 'knockout' de CXCR5, receptor de una quimiocina denominada BCA-1, los cuales no tienen células B en sus ganglios linfáticos; ratón mutante PLT, no expresa la quimiocina 6ckine y como consecuencia no tiene células T en ganglios. Esto sugiere un importante papel en el tráfico de linfocitos<sup>McGrath 1999, Hedrick 1998, Kelly 1992, Yoshida 1999</sup>.

Un hallazgo interesante es el hecho de que no sólo los linfocitos expresan receptores de quimiocinas, líneas celulares neoplásicas expresan estos receptores lo que sugiere que las quimiocinas pueden estar involucradas en el desarrollo de metástasis<sup>Muller 2001</sup>.

**TABLA 1. LIGANDOS PARA LOS DISTINTOS RECEPTORES DE QUIMIOCINAS**

<b>RECEPTOR</b>	<b>LIGANDOS</b>
	<b>QUIMIOCINAS ALFA O CXC</b>
CXCR1	IL-8, GCP-2
CXCR2	IL-8, GCP-2, Gro $\alpha$ , Gro $\beta$ , Gro $\gamma$ , ENA-78, PBP
CXCR3	MIG, IP-10, I-TAC
CXCR4	SDF-1/PBSF
CXCR5	BLC/BCA-1
	<b>QUIMIOCINAS BETA O CC</b>
CCR1	MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, HCC-1, 2, 3 y 4
CCR2	MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4
CCR3	eotaxin-1, eotaxin-2, MCP-3
CCR4	TARC, MDC, MIP-1 $\alpha$ , RANTES
CCR5	MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES
CCR6	MIP-1 $\alpha$ /LARC
CCR7	MIP-3 $\alpha$ /ELC, 6Ckine/LC
CCR8	I-309
CCR9	TECK
	<b>QUIMIOCINAS GAMMA O C</b>
XCRI	Linfotactin
	<b>QUIMIOCINAS DELTA O CX3C</b>
CX3CR1	Fractalkine/neurotactin

**FALTA  
PAGINA**

**66**

## INMUNOLOGIA TUMORAL

En los últimos años se han realizado importantes avances en el entendimiento de los mecanismos inmunes específicos, el conocimiento de las células T y subtipos, linfocitos B, células NK y células dendríticas, sin embargo, aún existen grandes interrogantes con relación a los diferentes procesos de inmunidad. Uno de los aspectos más importantes pendientes es el entendimiento del porque, el sistema inmune es incapaz de reconocer inicialmente una célula transformada la cual eventualmente se multiplicara y metastatizara. Varias posibilidades se han postulado, que incluyen un inadecuado procesamiento y presentación de antígenos, la presencia de factores supresores, ausencia de moléculas accesorias o la falla en la identificación células neoplásicas al no reconocer a estas como un "peligro" para el individuo.

La mayoría de los tumores no expresan antígenos capaces de ser reconocidos por el sistema inmune, esta incapacidad puede deberse a los a los mecanismos de tolerancia establecidos para antígenos "propios". En general, las posibilidades de reconocimiento estarían dirigidas en contra de antígenos únicos (mutados o procesados en forma alternativa), antígenos cáncer-testículo, que se expresan en forma normal durante el desarrollo y en forma aberrante en células somáticas adultas, y antígenos de diferenciación (específicos para el linaje celular). Algunos antígenos (propios) pudieran al procesarse y exponer sitios crípticos, no expuestos al sistema inmune previamente, o bien, células recientemente transformadas pudieran ser lisadas a través de mecanismos inespecíficos de inmunidad.



Los orígenes de la inmunología tumoral se encuentran asociados a observaciones clínicas (tratamiento del cáncer mediante la inoculación de material purulento, la presencia de regresiones espontáneas etc.), y a las respuestas antimicobianas. Es por esto, que durante gran parte del último siglo la mayor parte de los esfuerzos en este campo trataron de sustentar científicamente esta disciplina.

Muchos de los estudios de inmunología tumoral han girado en torno al estudio de la inmunidad contra el melanoma maligno (Figura 35 A). En los años 70, se describió por primera vez la posibilidad de que linfocitos T obtenidos de sangre de un individuo con melanoma destruyeran células tumorales *in vitro* <sup>Maurer H, 1974</sup>. Una década después fue posible en forma exitosa generar células asesinas activadas por linfocinas (LAK), a partir células mononucleares, que al reinfundirse en el paciente inducían regresiones tumorales en sitios distales al tumor <sup>Roseberg 1988</sup>. La excitación generada por estas observaciones rápidamente fue remplazada por escepticismo debido que no existió impacto en la supervivencia de los pacientes <sup>Roseberg 1994, Cohen 2000, Chou 1988</sup>. Como consecuencia, todos los protocolos clínicos utilizando esta estrategia fueron suspendidos y surgieron nuevas interrogantes en cuanto a la participación del sistema inmune en el control del cáncer.

En la década siguiente, se iniciaron nuevos abordajes de inmunoterapia utilizando, subtipos específicos de células T, que incluyeron únicamente linfocitos CD8, en combinación con IL-2 y posteriormente linfocitos CD4 y CD8 obtenidos de ganglios regionales <sup>Peng 2000</sup>, sin embargo, en contraste con el concepto inicial de que los linfocitos T representaban el mecanismo por el que los tumores eran reconocidos y destruidos, en la actualidad se pondera la participación de muchas otras células y elementos solubles en este proceso. Estudios recientes han mostrado que no es necesario en todos los casos, el reconocimiento de antígenos tumorales, sin embargo, continúa existiendo un consenso en el hecho de que las respuestas T específicas pueden catalizar el rechazo de tumores y más importante aún su participación en la memoria contra el tumor <sup>kugler 2000, nestle 1998</sup>.

Un avance importante ha sido la descripción de la participación de las células tumorales en la modulación de esta respuesta, éstas son capaces de suprimir, evadir o eliminar las

respuestas anti-tumorales a través de la secreción o expresión de factores supresores como la IL-10, el factor transformante  $\beta$ , prostaglandinas y gangliosidos, y pueden inducir una regulación negativa de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad <sup>Wojtowicz-Praga, 1997, Ferrone 1995</sup>

## CELULAS Y MOLECULAS RELEVANTES EN LA INMUNOLOGIA TUMORAL

### 1. RECONOCIMIENTO ANTIGENICO.

Las células tumorales expresan en ocasiones, moléculas que pueden ser reconocidas por el sistema inmune. La presencia de estas moléculas puede ser identificada *in vitro*, por anticuerpos, o a través de linfocitos T citotóxicos específicos o a través de la secreción de algunas citocinas como consecuencia de este reconocimiento <sup>Schwartzentruber 1994, Disis 2000, Peng 2000, Barth 1991</sup>

La caracterización molecular de sistemas antigénicos reconocidos por linfocitos T citotóxicos, ha tenido una importante contribución al campo de inmunología tumoral. Los antígenos tumorales pueden ser expresados como consecuencia de alteraciones genéticas, alteraciones en la transcripción, o bien, ser proteínas que se expresan en algún momento de la diferenciación celular. El reconocimiento de antígenos únicos sería ventajoso para el individuo, ya que le confiere la posibilidad al sistema inmune de evitar o disminuir importantemente la autoreactividad <sup>Yanuck 1993</sup>. En algunas ocasiones los antígenos reconocidos por el sistema inmune son expresados por células tumorales y algunas células normales, dando lugar a autoinmunidad, este epifenómeno se observa en pacientes con melanoma maligno (Figura 35).

La respuesta natural contra el melanoma frecuentemente involucra la sensitización de linfocitos T en contra de una proteína no mutada (gp100), que se expresa en células de melanoma y melanocitos normales <sup>Bakker 1994, Rosemberg 1996, Overwijk 1999</sup>. La consecuencia clínica es el desarrollo de vitiligo que se observa en pacientes en forma espontánea (Figura 35B, 35C) y en algunos pacientes sometidos a inmunoterapia (Figura 35D, 35E) <sup>Roemberg 1996, Overwijk 1999, Vverastegui observaciones no publicadas</sup>. Una interrogante al respecto, es el porqué, este

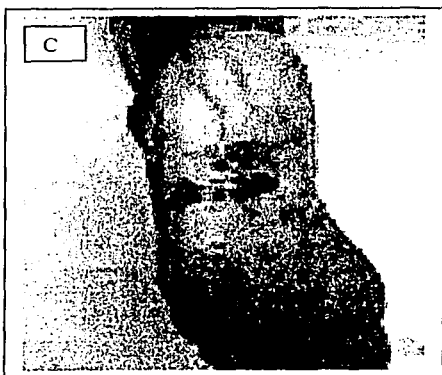
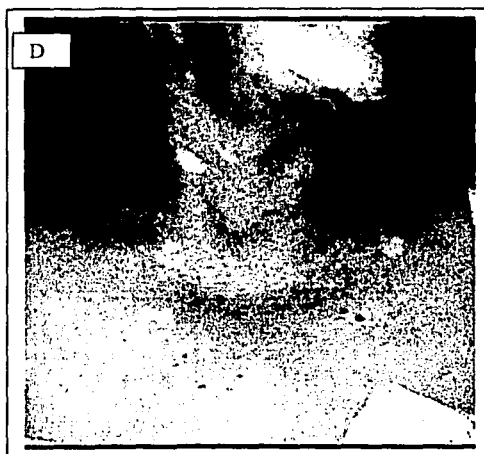
fenómeno no se generaliza, (ya que los melanocitos se encuentran distribuidos por toda la economía). En los pacientes con vitiligo, la respuesta anti-tumoral no es generalizada ni sostenida, lo que se ha interpretado como incapacidad parcial del sistema inmune para la destruir el tumor.

Este hecho también sugiere que los esfuerzos inmunoterapéuticos dirigidos en contra de antígenos compartidos, pudiera resultar en respuestas autoinmunes inaceptables.

Se han descrito a lo largo de las últimas décadas una serie de antígenos expresados preferentemente por células transformadas y por tejidos sanos durante su desarrollo embrionario; a) estos antígenos, son reconocidos exclusivamente por células T; b) pueden ser el resultado de mutaciones que se han asociado al desarrollo del cáncer; c) antígenos que expresan en tejidos sanos y en tumores (éstos han sido utilizados principalmente con fines diagnóstico o en el seguimiento de pacientes) Van Den Eyden 1997. Los antígenos tumor-específicos se agrupan de la siguiente manera:

**Antígenos Oncofetales.** Aparecen tempranamente en el desarrollo embrionario (antes de que se desarrolle la inmunocompetencia), no se expresan en tejidos adultos y por lo tanto la clonas de linfocitos T capaces de reconocerlos no están deletadas. El antígeno carcinoembrionario (CEA), es ejemplo de este grupo de antígenos, se piensa corresponde a una molécula de adhesión presente en el colon fetal. En el adulto, el 95% de los tumores originados en colon lo expresan, al igual que un algunos otros tipos de cáncer.

Figura 32. RESPUESTA INMUNE CONTRA MELANOMA MALGNO



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Antígenos tumor-específicos compartidos.** Este tipo de antígenos están codificados por genes completamente silenciados en tejidos normales. Se activan en una serie de tumores de diferentes etiologías. Los antígenos prototipo se encuentran codificados por los genes *MAGE* <sup>De Plaen 1994</sup>, *BAGE*, *GAGE* *RAGE* *GnTV* <sup>Benoit 1997</sup>. Estos genes codifican para antígenos solamente expresados en testículo; excepto *RAGE* que se expresa en retina y *GnTV* que no se expresa en ningún tejido sano, *MAGE*, se expresa además en trofoblastos placentarios <sup>DePlaen 1994, Takashi 1995, Uyttenhove 1997</sup>. Estos tejidos, tienen como característica común que no expresan moléculas del CPH <sup>Hass 1988</sup>, al expresarse en células neoplásicas pueden ser considerados como tumor-específicos. La activación de los genes *MAGE* resulta de la desmetilación de sus promotores, que se correlaciona con una desmetilación genómica inespecífica <sup>DeSmet 1988, Serrano 1996</sup>. La expresión de *MAGE* ha sido reportada en varios tipos de tumores de diferentes histologías y representa un blanco interesante para los abordajes inmunoterapéuticos <sup>Van Den Eyden 1997</sup>. Este grupo de antígenos esta restringido por moléculas clase I del CPH, principalmente por los alelos de HLA-A <sup>Van Den Eyden 1997</sup>.

Otro sistema antigénico detectado a través de linfocitos citotóxicos de pacientes con cáncer de mama, páncreas y ovario, es un epitope de mucina <sup>Jerome 1993, Barrat-Boyes 1996</sup>. La mucina es una proteína de superficie compuesta de varios grupos repetidos de 20 aminoácidos. En las células normales, la mucina se encuentra muy glicosilada, y cuando se expresa en tumores se encuentra subglicosilada, exponiendo residuos de aminoácidos que pueden ser reconocidos por linfocitos citotóxicos de manera no restringida por el CPH <sup>Van Den Eyden 1997</sup>. En la mama lactante, también existe una subglicosilación de la mucina, sin embargo, únicamente en la superficie apical extracelular, la cual no es accesible a los linfocitos citotóxicos. Se ha descrito que la mucina es un potente inhibidor de linfocitos T activados <sup>Gimmi 1996</sup>.

**Antígenos de diferenciación.** Un número importante de pacientes con melanoma reconocen antígenos presentes en melanoma y en melanocitos. Este grupo de antígenos incluye a la tirosinasa, una proteína que da lugar a diferentes péptidos, presentados por moléculas clase I y clase II <sup>Anichini 1993</sup>. El péptido de la tirosinasa reconocido por los

linfocitos T citotóxicos, tiene de 369 a 377 aminoácidos y presenta una modificación post-transcripcional, el residuo de aspargina presente en la posición tres, esta substituido por ácido aspártico, por glicosilación y desglucosilación subsecuente por una enzima que remueve el grupo amino con el glicán, este péptido es presentado por HLA-A31 <sup>Wang 1996</sup>. Otros genes que codifican para este grupo de antígenos son Pmel17<sup>BP100</sup>, *Melan-A*<sup>MART-1</sup>, TPR-2, CEA y PSA <sup>Van Den Eyden 1997</sup>.

**Antígenos resultado de mutaciones.** Este grupo de antígenos son péptidos derivados de proteínas expresadas en forma ubicua pero que se encuentran mutados en células tumorales, es ratón hay varios antígenos descritos, y algunos de estos se han encontrado también en neoplasias humanas. Dos de éstas que afectan a genes humanos, se han identificado como resultado de mutaciones en la cinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4) y la beta catenina, ambas posiblemente involucradas en la oncogénesis <sup>Van Den Eyden 1997, Wolfel 1995, Robbins 1996, Rubinfeld 1997</sup>. La mutación de CDK, evita que la proteína se una a su inhibidor p16<sup>Wolfel 1996</sup>, y la de la beta catenina, estabiliza a la proteína, favoreciendo la formación constitutiva de complejos con factores de transcripción como Lef-1 <sup>Rubinfeld 1997</sup>. Los complejos beta-catenina/Lef-1 resultan en la transactivación persistente de genes que posiblemente inhiban apoptosis o estimulen la proliferación celular <sup>Rubinfeld 1997</sup>.

El resultado de la mutación del gen *CASP-8*, es otro de los antígenos reconocidos por linfocitos T citotóxicos. El gen codifica para FLICE (proteasa de la caspasa 8), una proteasa asociada al dominio de muerte de Fas, que se requiere para la inducción de la apoptosis a través de Fas <sup>Muzio 1996</sup>. La capacidad de la proteína mutada para inducir apoptosis se encuentra disminuida con respecto a la proteína silvestre <sup>Mandruzzato 1997</sup>. También ha sido descrita la presencia de antígenos como consecuencia de la mutación de ras o p53, capaces de ser reconocidos por linfocitos citotóxicos <sup>Skipper 1993, Noguchi 1994</sup>.

**Antígenos tumorales sobre-expresados y antígenos ubicuos.** Los linfocitos T citotóxicos pueden reconocer antígenos codificados por genes no mutados, expresados por tejidos normales y neoplásicos, y lisar únicamente a los antígenos expresados en células tumorales <sup>Ikeda 1997</sup>. Tres antígenos han sido detectados de esta categoría en humanos; *PRAME*, *p53* y

*HER-2/neu*<sup>Van der Bruggen 1997</sup>. Los antígenos codificados por *PRAME*, se expresan en testículo, ovario, endometrio y glándulas adrenales mientras que los codificados por *p53* y *HER-2/neu* son ubicuos. *HER-2/neu* se encuentra sobre-expresado en el 30% de los cánceres de mama y ovario, su presentación está restringida por HLA-A2<sup>Fisk 1995</sup>. En el momento actual, se desconoce si la sobre-expresión de *HER2/neu* y *p53* en tumores induzca autoinmunidad, es posible que exista un umbral de expresión para poder ser reconocidos por linfocitos T citotóxicos<sup>Ropke 1996</sup>.

**Antígenos virales.** Los antígenos derivados de virus oncogénicos, constituyen otro de los grupos de antígenos tumorales útiles. En humanos el mejor ejemplo está representado por los antígenos codificados por la oncoproteína E7 del virus del papiloma, el péptido presentado a linfocitos T citotóxicos está restringido por HLA-A2<sup>Ressing 1995</sup>.

## 2. RECONOCIMIENTO DE PEPTIDOS POR LINFOCITOS T EN EL CONTEXTO DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

En el reconocimiento antigénico de las células T, normalmente existe una interacción entre el receptor para antígeno de las células T (RCT) y las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CPH). Al reconocer el péptido presente, las células T, CD4 (Clase II) o CD8 (Clase I), y en presencia de la co estimulación adecuada, se inicia el proceso de activación celular<sup>Huang 1996, Armstrong 1998</sup>.

Las células tumorales expresan principalmente moléculas de CPH clase I, y frecuentemente no expresan moléculas clase II<sup>Armstrong 1998</sup>, este hecho generó hace 25 años la hipótesis de que los linfocitos CD8 eran los responsables de mediar la respuesta inmune antitumoral. En la actualidad, se sabe que estas células representan uno de varios mecanismos disponibles en el sistema inmune para la destrucción de tumores<sup>Armstrong 1996</sup>.

## 3. CELULAS PRESENTADORAS DE ANTIGENOS

Las células dendríticas son el tipo celular más eficiente en la presentación de antígenos. Estas células toman antígenos y complejos CPH-péptidos, migran a los órganos linfoides secundarios en donde interactúan con los linfocitos T específicos, son el único tipo celular

que estimula linfocitos T en reposo *in vivo* e *in vitro*. Inician respuestas innatas y determinan la tolerancia, por lo que han desarrollado una vía de transporte único a través de la membrana <sup>Théry 2001</sup>.

**CARACTERIZACION.** Las células dendríticas constituyen una población celular heterogénea <sup>Banchereau 1998</sup>, se encuentran presente escasamente en diferentes tejidos, son capaces de ingerir antígenos por fagocitosis, macropinocitosis y endocitosis mediada por receptores. Las células dendríticas (CDe) poseen en la superficie receptores a través de los cuales inician un complejo proceso de maduración <sup>Banchereau 1998</sup>. La maduración de estas células se estimula por la presencia de patógenos bacterianos o virales; a través de un estímulo inflamatorio mediado por citocinas; y por linfocitos T de ayuda mediante la unión de CD40 a CD40L <sup>Théry 2001</sup>.

Las CDe maduras tienen numerosos procesos membranales que se extienden a cientos de micrómetros de la célula, formando "dendritas o pseudópodos, en el citoplasma estas células poseen además endosomas, lisosomas y en el caso particular de las células de Langerhans gránulos de Birbeck, que son estructuras relacionadas al procesamiento antigénico <sup>Hart 1996</sup>.

Las CDe no expresan CD14, CD3, CD19, CD20, CD24, CD56 ni CD66b, expresan varias moléculas de adhesión y coestimuladoras CD11a (LFA-1), CD11c, CD50 (ICAM-2), CD54 (ICAM-1), CD58 (LFA-3), y CD102 (ICAM-3), CD80 (B7.1) CD86 (B7.2), CD40. En circulación expresan CD2, CD44, CD13, CD16, CD32 y CD33 y al madurar solamente expresan CD80 y CD86 <sup>Hart 1993, Banchereau 1994, Fagnoni 1995, Takamizawa 1997</sup>.

Las CDe son activas en procesos de pinocitosis de antígenos solubles, poseen receptores inespecíficos que facilitan la fagocitosis, FcγR (CD16, CD32), receptores de complemento (CD11b, CD11c, CD35) y Cd11c <sup>Reis 1993</sup>. Al activarse y migrar a los tejidos, se regula negativamente su capacidad para procesar antígenos aumentando la función de presentación de antígenos <sup>Hart 1988</sup>. Las CDe procesan antígenos, principalmente a través de los lisosomas endocíticos restringidos por clase II <sup>Lanzaavecchia 1996</sup>.



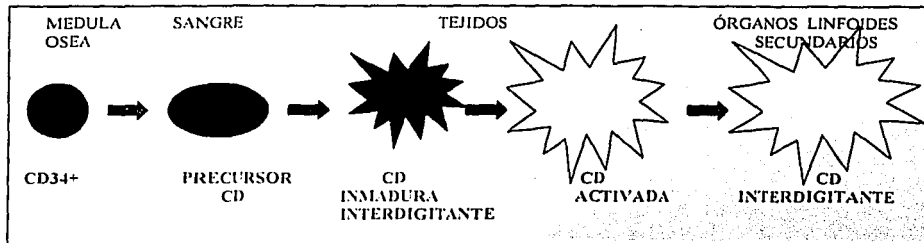
Existe sin embargo, la capacidad de realizar procesamientos alternativos de antígenos exógenos, que estarán restringidos por clase I <sup>Norbury 1997</sup>. Este tipo de procesamiento lo realizan a través de estimulación cruzada o "cross-priming" y utilizan proteínas de choque térmico como chaperonas <sup>Arnold Schild 1999</sup>.

Las CDe se originan de dos diferentes precursores. Las CDe mieloides se derivan de precursores de granulocitos y monocitos, en sangre aparecen como células mononucleares, con niveles elevados de moléculas clase II, pero con ausencia de la mayor parte de los antígenos. Los monocitos y macrófagos al exponerse a GM-CSF, TNF- $\alpha$  +/- IL-4, pueden diferenciarse a células dendríticas (Figura 36) <sup>Paluckaa 1998, Oehler 1998</sup>.

En ratón se han descrito CD de estirpe linfoide, las cuales pueden originarse de precursores linfoides CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> y pueden diferenciarse *in vitro* en ausencia de GM-CSF <sup>Ardavin 1993, Vremec 1992, Wu 1996, Suss 1996</sup>. Una población diferente de CD en humanos expresa niveles elevados de CD123 (receptor de IL-3) y CD4 sin expresar CD11c. Esta población de CD se ha encontrado en sangre y amígdalas, requiere de IL-3 para crecer y una señal de activación provista por CD40L para madurar. Es posible que estimulen a linfocitos CD4<sup>+</sup> a diferenciarse a células TH2 <sup>Grouard 1997, Oliveus 1997</sup>, en contraste con las CDe mieloides (CD11<sup>+</sup>) que inducen la diferenciación a TH1 <sup>Rissooan 1999</sup>, y parecen ser la principal fuente de interferón Tipo I por lo que es posible que también posean funciones efectoras <sup>Siegel 1999</sup>.

La CDe tiene diferentes etapas de maduración. Los precursores de CDe migran de la MO, circulan en la sangre a sitios específicos en donde maduran y actúan como centinelas del sistema inmune <sup>Austyn 1990</sup>. Esta migración está dirigida por la expresión de receptores de quimiocinas CCR1, CCR5, y CCR6 y por moléculas de adhesión como el ligando de CD62P <sup>Robert 1999, Greaves 1997, Sozzani 1998</sup>. Las CDe presentes en los tejidos incluyen a las células de Langerhans, las CD de hígado, de mucosas, y las de pulmón procesan y presentan antígenos en el contexto de moléculas clase I y II (Figura 36) <sup>Albert 1998, Svensson 1997</sup>.

Figura 36. DIFERENCIACION DE CELULAS DENDRITICAS



En forma adicional las CDe requieren una señal independiente del antígeno para activarse, se especula que esta debe ser una señal de peligro la cual es provista por citocinas o factores secretados por el daño o alteraciones celulares <sup>Pure 1990</sup>. Estas señales incluyen al lipopolisacárido, interferón, IL-1 y señales directas enviadas por virus o bacterias <sup>Pure 1990</sup>. Un aspecto importante en la maduración de células dendríticas es la expresión por tiempo prolongado de moléculas del complejo (2hr en inmaduras vs. 2 días en maduras) <sup>Pure 1990</sup>.

Una vez activada la CDe migra a la zona T de los GL al expresar CCR7 <sup>Dieu 1998, Chan 1999</sup>, en los tejidos linfoides secundarios la Cde, elabora quimiocinas como DC-CK1 y MDC que atraen tanto células T de memoria como células T naïve para ser estimuladas <sup>Adema 1997, Tang 1999</sup>. Las CDe secretan IL-1 que induce proliferación de células CD4 y CD8 y diferenciación de células B, estimulando una potente respuesta inmune <sup>Yavalkar 1996, Heufler 1996</sup>. En los órganos linfoides secundario, los linfocitos CD4 activados pueden activar a las CDe a través de interacciones CD40/CD40L lo que provee señales de supervivencia a las CDe, esto permite estimular LTC, incluso en ausencia de ayuda CD4+ <sup>Ridge 1998, Steinman 1991</sup>. Es posible también, que las CDe puedan presentar Ag a NK a través de CD1 lo que en conjunto, orquesta una importante respuesta inmune <sup>Shoenberger 1998 Bennet 1998</sup>. Una de las características más importantes de las CDe, radica en la capacidad que poseen para estimular células naïve a través de la regulación positiva de CD40L <sup>Fernandez 1999</sup>.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Es posible que la presencia de moléculas clase II en la CDe permita su intervención en la selección negativa en el timo por lo que pudieran participa en la tolerancia a diferentes niveles.

Existen diferentes tipos de CDe que comparten algunas características y sin embargo, son capaces de polarizar respuestas T a TH1 o TH2. En las diferentes etapas de la diferenciación de las CDe tienen diferentes funciones; los precursores de CDe secretan citocinas pro inflamatorias o antivirales, (EJ. 12, 15, 18), que pueden regular células NK, NKT. Las CDe inmaduras adquieren la capacidad de capturar y procesar antígenos, y finalmente las CDe maduras son capaces de modular respuestas T <sup>Fong 2000</sup>.

#### B. PARTICIPACION DE LAS CELULAS DENDRITICAS EN EL RECONOCIMIENTO DE TUMORES.

La sensibilización inicial de los linfocitos CD4 y CD8 requiere de la presencia de células presentadoras de antígenos, que presentan antígenos tumorales procesados, aún en ausencia de las células tumorales <sup>Huang 1996, Amstrong 1998</sup>. Los macrófagos y las células dendríticas del huésped son capaces de fagocitar, procesar y presentar péptidos en el contexto de moléculas clase I y clase II del CPH a linfocitos CD8 y CD4, respectivamente <sup>Huang 1996, Kleijmer 1995, Michalek 1993</sup>.

La presentación de péptidos tumorales por células dendríticas y macrófagos es ventajosa para el sistema inmune por varias razones; (a) las células tumorales habitualmente carecen de moléculas co-estimuladoras como ICAM-1 y B7, por lo tanto aún cuando las células tumorales no presenten moléculas del CPH, (b) la ausencia de co-estimulación previene de generar una respuesta inmune vigorosa <sup>Amstrong 1996, Sule-Suso 1995, Anichini 1993</sup>, (c) la presentación de antígenos en ausencia de coestimulación genera tolerancia y no activación <sup>Matzinger 1999</sup>, (d) las células tumorales frecuentemente presentan mutaciones que impiden la expresión en la superficie de moléculas del complejo o moléculas co-estimuladoras <sup>Ferrone 1995, Cormier 1998</sup>.

En contraste con lo mencionado las células dendríticas, aun en individuos con cancer no presentan mutaciones que impidan la expresión del moléculas del complejo o moléculas co-estimuladoras.

El mecanismo mediante el cual ocurre la sensibilización cruzada in vivo no se conoce del todo y algunas teorías que tratan de explicarlo se enumeran a continuación: (1) Restos tumorales y algunos productos secretados por el tumor ingresan a través de vasos linfáticos a ganglios linfáticos regionales en donde son fagocitados por células dendríticas presentes en los ganglios, estimulando in situ a los linfocitos T presente en estos; (2) Células presentadoras de antígeno circulantes migran a los nichos tumorales, procesan moléculas exógenas y células apoptóticas en el tumor <sup>Albert 1998, Rovere 1998</sup>, para después migrar a los ganglios linfáticos regionales en donde sensibilizan a los linfocitos T residentes en estos; (3) Células dendríticas residentes del tumor procesan antígenos tumorales y sensibilizan linfocitos T naive directamente en el lecho del tumor; (4) Las células metastásicas a los ganglios linfáticos son la fuente de antígenos para las células dendríticas y los linfocitos T presentes en el ganglio linfático <sup>cohen 2001</sup>. Estudios animales favorecen el segundo de los mecanismos descritos y las células probablemente mejor equipadas para llevar a cabo este proceso son las células dendríticas <sup>Girolomoni 1990, Cruz 1990, Cohen 1997, Czerniecki 1997</sup>.

Las células dendríticas como ya se mencionó en la sección anterior, provienen principalmente de la médula ósea, entran a la circulación como células inmaduras y migran posiblemente, al azar a diferentes microambientes extralinfáticos (piel, hígado, pulmón, intestino). Posteriormente, las células dendrítica fagocitan y pinocitan, los materiales exógenos presentes en la vecindad y señales provistas por los tejidos circundates y el inicio de el procesamiento antigénico inducen la maduración de las células. En esta etapa de maduración poseen relativamente poca capacidad para sensibilizar la cual se evidencia por la baja expresión de moléculas del CPH, pero principalmente por la baja presencia de moléculas co-estimuladoras. La liberación de  $TNF\alpha$  e  $IL-1\beta$ , alertan a la células dendríticas de la terminación de la fase de procesamiento antigénico y estimulan la presentación de antígenos a linfocitos T <sup>Kimber 1992</sup>, reclutando a las células dendríticas en ganglios linfáticos

Cruz 1990, Lindhout 1998, Jonuleit 1996, Steinman 1995. En el ganglio linfático, las señales provistas por las células T y la unión a ligandos como CD40 y CD154, inducen la regulación positiva de las moléculas del CPH, co-estimuladoras, etc, en la células dendríticas, facilitando la sensibilización del linfocitos T al péptido presentado <sup>Koski 1999, Mackey 1998, Steinman 1997, Mackey 1998, Ridge 1998, Koski 1999</sup>. Las células dendríticas maduras son capaces de presentar el péptido adquirido en el tejido extra linfoide en forma sostenida <sup>Cohen 2001</sup>.

La versatilidad e importancia de las células dendríticas es cada vez mas ponderada, ya que poseen, a diferencia de los macrófagos la capacidad para migrar a ganglios regionales en donde optimizan la sensibilización de células T. Un hallazgo importante es la posibilidad de los monocitos circulantes de convertirse en macrófagos o células dendríticas, la vía de maduración a células dendríticas esta condicionada a la extravasación y a la presencia de citocinas inflamatorias <sup>Koski 1999, Lyukh 2000</sup>.

#### PAPEL DE LOS LINFOCITOS EN LA RESPUESTA ANTITUMORAL.

Es posible que algunas células dendríticas favorezcan la polarización de respuestas celulares TH1, las cuales posiblemente represente el mecanismo antitumoral más eficiente <sup>Hu 1998</sup>. El tipo de células capaces de inducir este tipo de diferenciación se ha denominado Dc1 (células dendríticas tipo 1) y su diferenciación esta favorecida por la presencia de IFN $\gamma$  <sup>Cohen 1993, Czerniecki 2001</sup>.

Una vez que los linfocitos T son sensibilizados, éstos deben de recircular a través de los linfáticos y son activados por la presencia del antígeno tumoral hacia el cual fueron sensibilizados <sup>Plautz 2000</sup>.

Los linfocitos CD8, son una de las principales células involucradas en el rechazo a tumores, sin embargo, no son las únicas células capaces en mediar inmunidad antitumoral. Durante las ultimas tres décadas estudios en animales han mostrado la importancia de los linfocitos T CD8, para lo cual es necesaria la expresión de moléculas clase I <sup>Fidler 1978, Fidler 1977, Cohen 1994</sup>. Estudios recientes utilizando ratones knockout han mostrado que la ausencia de

ningún mecanismo mediado por células T es esencial para el rechazo de tumores Cohen 2001, Winter 1999, Plautz 2000

## 5. MECANISMOS INMUNES ANTITUMORALES MEDIADOS Y NO MEDIADOS POR EL ANTIGENO

El hecho de que la respuesta tumor-específica T pueda prescindir del contacto directo con el tumor, implica la presencia de un mecanismo secundario de rechazo, una vez que la célula T ha sido sensibilizada por la célula presentadora de antígeno. Es posible que la secreción de citocinas y quimiocinas en el entorno tumoral tenga la misma consecuencia en la destrucción tumoral, independientemente de si estas son secretadas por las células T en contacto con el tumor o por las células T en contacto con la célula presentadora de antígenos. El mecanismo de rechazo secundario es pues consecuencia de la secreción de citocinas y quimiocinas. Los efectos mediados por citocinas y quimiocinas incluyen un efecto antiangiogénico y pro-apoptótico, directo e indirecto al activar células accesorias (no-T). De igual manera las citocinas median que linfocitos T activados, células NK y células LAK, adquieran la capacidad de mediar apoptosis a través de FAS-ligando (APO-1 ligando), en las células tumorales Rosen 2000, Berke 1995, Berke 1995, Henkart 1994, Miki 1992. También la secreción de citocinas por linfocitos T activados inducen la expresión de moléculas del CPH y de moléculas accesorias, lo que a su vez incrementa la eficiencia del reconocimiento mediado por células T, alcanzándose una activación óptima durante el encuentro con el tumor Miki 1992, Ksander 1992, Frey 1997.

Las citocinas son capaces de ejercer un efecto antitumoral directo, el FNT  $\alpha$  induce un efecto antiangiogénico que *per se*, es capaz de inducir rechazo tumoral Asher 1991, Mule 1988, Asher 1989, se puede inducir un efecto pro-apoptótico mediado por IFN  $\gamma$  o TNF $\alpha$  Koshiji 1998, Spets 1998, Burke 1997, Tamura 1996, Yeung 1996, y es posible también incrementar la susceptibilidad de las células tumorales a la acción de otros mecanismos antitumorales. La exposición de las células al interferón aumenta la transcripción en la célula tumoral del fosfolípido-escremblasa, induciéndose la translocación de fosfatidilserina al exterior de la membrana

Zhou 2000, lo que incrementa la actividad fagocítica mediada por macrófagos, y la unión de macrófagos tumoricidas <sup>Krahling 1999, Utsugi 1991</sup>.

La acción antitumoral mediada por citocinas induce también la activación de otras células además de los linfocitos T; células NK, LAK, neutrófilos, monocitos y macrófagos <sup>Mule 1986, Ettinghaussen 1985, Fidler 1985, Saiki 1985, Koff 1985, Mule 1987, Steward-Akers 1993, Ferrante 1992, Katayama 1992, Barton 1995</sup>.

Las células NK expresan una serie de receptores de superficie (KIR) para identificar células transformadas o infectadas que han regulado negativamente la expresión de moléculas del CPH <sup>Moretta 1998, Moretta 1997, Moretta 1977, Lopez-Boyer 1996</sup>. Estudios recientes han demostrado que clones específicos de células NK reconocen combinaciones de CPH hipoexpresados y expresados normalmente con el objeto de evadir las respuestas T <sup>Moretta 1997</sup>. Las células NK median también la lisis tumoral a través de la secreción de algunas citocinas <sup>Steward-Akers 1993, Kamamura 1998</sup>, induciendo además a través de estas, la diferenciación a células LAK las cuales adquieren mayor capacidad de reconocimiento tumoral <sup>Fehniger 1999, Mohan 1997, Salazar Mather 1996</sup>.

La inmunología tumoral ha logrado grandes avances al estudiar el modelo murino, sin embargo, dado que la intención de esta revisión fue el análisis de la inmunología tumoral humana, no se discutirán estos aspectos en detalle, cabe señalar, sin embargo, que anomalías detectadas en ratones pudieran ser relevantes en el cáncer humano, como los hallazgos que describen las alteraciones en las señales de transducción <sup>Correa 1995, Mizogushi 1992, Wang 1995</sup>.

Otro aspecto importante de la investigación en el modelo murino, ha sido la caracterización de las células CD62 <sup>LOW</sup>. La L-selectina es una glicoproteína involucrada en la extravasación celular, la L-Selectina tiene una fuerte afinidad por las venas post capilares de los ganglios linfáticos <sup>Kjaergaard 1999</sup>, lo que le confiere a las células que expresan CD62 la tendencia a asentarse en éstos. La activación antigénica, se traduce en la regulación negativa de CD62 <sup>Jung 1990, Jung 1988, Jung 1988, Bradley 1991</sup>, por lo que las células T presentes en ganglios linfáticos regionales, expresan CD64 <sup>LOW</sup>, y muestran menor capacidad para

recircular <sup>Cohen 2001</sup>, es posible que estos linfocitos tengan una circulación restringida que incluye el lecho tumoral <sup>Kjaergaard 1999, Cohen 2001</sup>.

## 6. INMUNOSUPRESION

Es posible que para que exista una respuesta antitumoral efectiva, esta deba ser TH1, lo cual implica la presencia de células dendríticas tipo 1, sin embargo, es frecuente observar en tumores la inducción de respuesta TH2. La secreción de IL-10, prostaglandinas, factor de crecimiento vascular endotelial, factor transformante beta, y glucocorticoides, participan en la inducción de la inmunosupresión <sup>Cohen 2001</sup>. La consecuencia clínica de la acción de diferentes sustancias es la disfunción locorregional inmune <sup>Whitsde 1995, Hadden 1999, Cohen 2001, Verastegui2002</sup>.

Desde el punto de vista sistémico, llama la atención que la asociación de crecimiento tumoral y un estado de inmunosupresión generalizado, se observa únicamente en neoplasias avanzadas <sup>Mukhrji 1986m, Ioannides 1993, North 1985</sup>.



## ORGANOS LINFOIDES SECUNDARIOS

Los órganos linfoides secundarios son estructuras únicas las cuales proveen los elementos necesarios para la iniciación y mantenimiento de una respuesta inmune. Esta función se refleja en ciertas características estructurales comunes a todos los tejidos linfoides secundarios; en estos sitios existen mecanismos a través de los cuales los antígenos o las células presentadoras de antígeno son colectadas de las diferentes regiones de la economía y llevadas al microambiente linfoide apropiado, así mismo, estos tejidos poseen particularidades vasculares diseñadas para reclutar linfocitos de la sangre y, finalmente, en estos sitios existe una yuxtaposición de los distintos microambientes linfoides "zonas T y zonas B", en las cuales existe una importante interacción celular. <sup>Picker 1999</sup>

Los órganos linfoides secundarios están estratégicamente diseñados y distribuidos para permitir contactos con antígenos presentes en distintas localizaciones: El diseño del bazo permite interactuar con antígenos presentes en la sangre, los ganglios linfáticos reciben a los antígenos a través de vasos linfáticos, y los antígenos tisulares están en contacto con el tejido linfoide asociado a mucosas a través de epitelios especializados <sup>Mac Lennan 1993</sup>

## GANGLIOS LINFÁTICOS

Los ganglios linfáticos son estructuras ovoides, capsulares que se agrupan habitualmente en sitios de uniones vasculares (axila, ingle, regiones cervicales, mesenterio etc.) son componentes integrales de la vasculatura linfática <sup>Weiss 1988</sup>

Los capilares linfáticos convergen en vasos linfáticos mayores (linfáticos eferentes) y eventualmente todos estos en los ganglios linfáticos en el sitio de entrada de las arterias ganglionares y puntos de salida de las venas ganglionares y de los linfáticos eferentes <sup>Weiss 1988</sup>. Los linfáticos aferentes al bifurcarse, conforman el seno subcapsular o marginal el cual separa la cápsula fibrosa del tejido linfoide que conforma la corteza. En el seno subcapsular existen preferentemente macrófagos, células dendríticas y células del estroma <sup>Weiss 1988</sup>. La linfa y células depositadas en el seno subcapsular deben pasar a través de los linfocitos presentes en la corteza vía senos radiales antes de

alcanzar la medula del ganglio<sup>Picker 1999</sup>. La medula consiste en senos medulares ricos en macrófagos y células plasmáticas, separados entre sí por células del estroma y fibras. Esta distribución anatómica permite a antígenos presentes en cualquier región de la economía entrar en contacto con células del sistema inmune.

Los linfocitos, especialmente vírgenes, tienen un continuo flujo a través de la corteza, estos entran a los ganglios a través de las vénulas endoteliales altas presentes en la zona T de la corteza (o paracorteza. Las vénulas endoteliales altas expresan moléculas de adhesión que interactúan con las presentes en los linfocitos especialmente vírgenes<sup>Ebnet 1996</sup>

### FIGURA 37. GANGLIO LINFATICO



La corteza puede dividirse en dos regiones estructurales y funcionales; zonas T y zonas B. Los linfocitos B están agrupados en folículos en donde también se pueden identificar células dendríticas foliculares, macrófagos y algunos linfocitos T CD4<sup>+</sup> efectores y de memoria (Figura 37)<sup>Rouse 1984</sup>.

Los folículos pueden dividirse a su vez en folículos primarios, los cuales están conformados por linfocitos B pequeños en reposo y células dendríticas foliculares. Los folículos secundarios poseen una región interna con linfocitos B activados asociados con una red de células dendríticas foliculares y algunos macrófagos, rodeados de un anillo de linfocitos B en reposo con las características de los presentes en los folículos primarios.<sup>Ppcker 1999</sup>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En reposo los ganglios habitualmente poseen solo algunos folículos secundarios mientras que aquellos estimulados por el antígeno tienen una corteza con múltiples centros germinales. En la paracorteza existen principalmente linfocitos T los cuales son principalmente  $CD4^+$  (proporción 3:1 con respecto a  $CD8^+$ )<sup>Ebnet 1996</sup>.

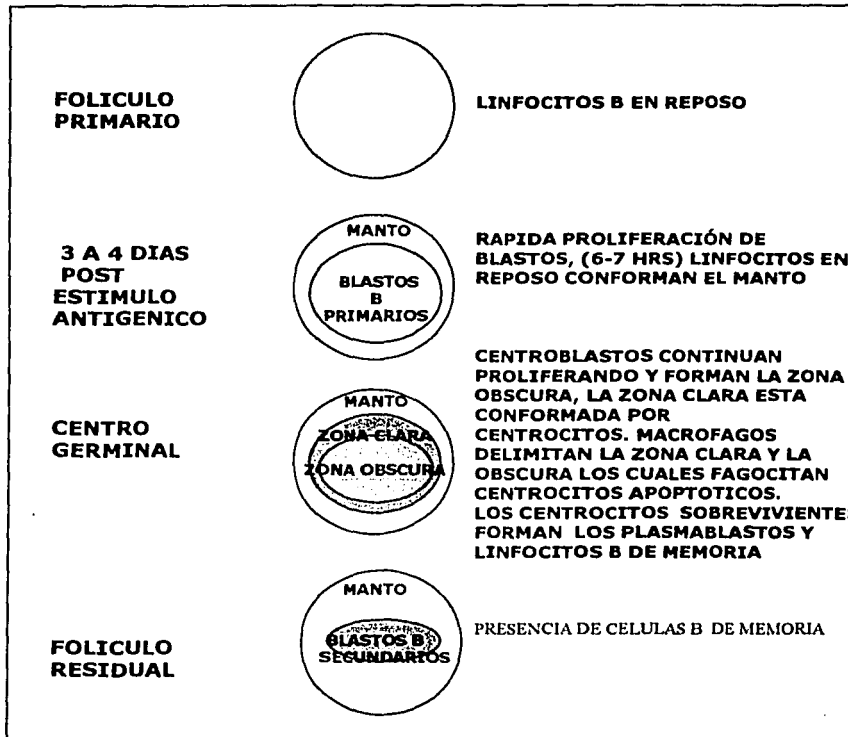
Cuando los folículos no están involucrados en respuestas inmunes, los principales elementos recirculando son los linfocitos B, los cuales pasan entre los espacios por una red de células dendríticas foliculares. El tiempo que transcurre es aproximadamente de 24 hrs. , Las células circulantes son principalmente linfocitos  $B\mu^+\delta^+$  aunque pudieran existir células  $B\mu^+\delta^-$ . Los folículos secundarios poseen células que están involucradas en procesos dependientes del antígeno o mitógeno<sup>MaacLennan 1993</sup>.

No toda la activación de linfocitos en los folículos es la misma, se pueden identificar tres tipos de respuestas foliculares. En ciertas circunstancias estas pueden coexistir. La forma más frecuente de respuesta B folicular es la formación de centros germinales, los cuales se caracterizan por respuestas T dependientes durante las tres primeras semanas de contacto con el antígeno, pudiendo reaparecer durante encuentros subsecuentes con el antígeno, sin embargo, el tamaño de los centros germinales tiende a disminuir en los contactos subsecuentes con el antígeno<sup>van den Oord 1986</sup>. En el centro germinal suceden una serie de eventos en los inducidos por el antígeno los linfocitos B proliferan clonalmente, aumenta la especificidad para el antígeno a través de la hipermutación somática de los genes  $\nu$ , las células B específicas son seleccionadas sobre la base de su afinidad por el antígeno y finalmente estas se diferencian a linfocitos de memoria o a células plasmáticas<sup>Kelsoe 1996</sup>.

Cuando los centros germinales se forman, un porcentaje pequeño de células B son desplazadas a la periferia de lo que inicialmente fue un folículo, formando el manto, la porción central (el centro germinal) esta conformado por blastos proliferando<sup>Kelsoe 1996</sup>. Por microscopia de luz se pueden identificar dos compartimentos; una zona oscura que contiene células grandes densamente "empaquetadas" que se encuentran proliferando y la zona clara en donde los linfocitos son más pequeños y menos "empacados", separados entre sí por células dendríticas, en esta zona la mayor parte de los linfocitos no están proliferando pero provienen de células que se han dividido en las ultimas doce

hrs. El reclutamiento de células vírgenes se completa en el momento que se forma el centro germinal, así mismo, la activación de células B en zonas T cesa en el momento de la formación del centro germinal (Figura 38) <sup>Kelsoc1996</sup>.

**FIGURA 38. FORMACIÓN DEL CENTRO GERMINAL**



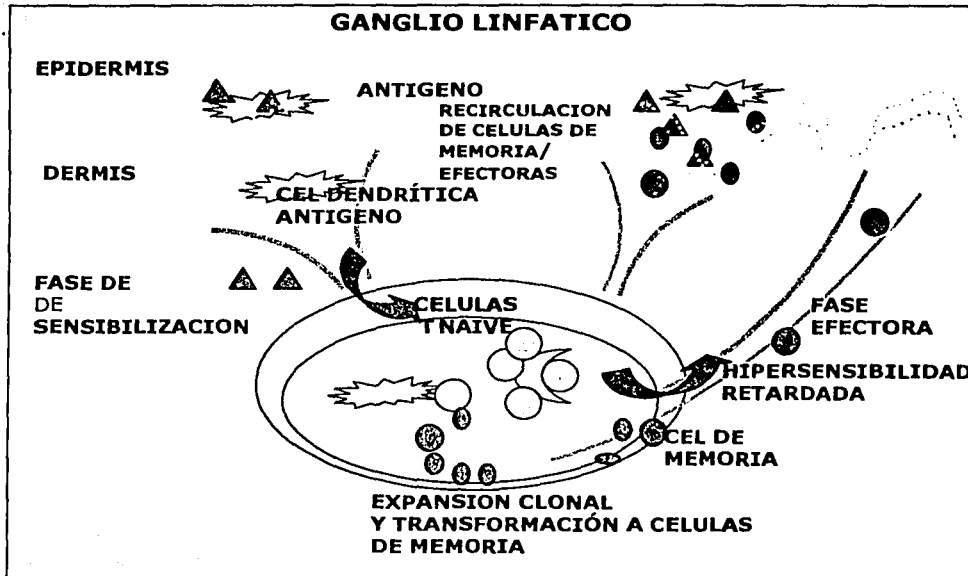
Las respuestas de células T se encuentran polarizadas por dos subtipos de estas células, el patrón TH1, caracterizado por la producción IL-2, IFN-g, y TNF-b y el patrón TH2, caracterizado por la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 (y posteriormente IL-13) Croft1 994, Roger 1997

Las células T naïve se encuentran casi exclusivamente en órganos linfoides secundarios, por lo que se infiere que la transición células naïve-células de memoria, ocurre en esta localización. La población de células naïve consiste en células estables de larga vida,

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

que se encuentran en constante movimiento entre varios órganos linfoides secundarios. Una vez en contacto con el antígeno en el contexto de la célula presentadora adecuada, las células naïve se activan, proliferan e inician cambios fenotípicos y funcionales asociados con la transición naïve – de memoria. Esta transición esta coordinada por ciertas citocinas y los contactos entre células, proveen señales co-estimuladoras<sup>Picker</sup> 1990, Schwitzer1994Luqman 1992

**FIGURA 39. ACTIVACION CELULAR EN GANGLIO LINFATICO**



Esta compleja regulación de las funciones T de memoria-efectoras se encuentra incompletamente caracterizada, pero se piensa que tejidos linfoides terciarios que conforman parte de la red linfática bajo la influencia de un determinado órgano linfoide, secundario pueden secretar elementos reguladores (solubles o celulares) que influyen el potencial funcional de las células T de memoria generadas en un órgano linfoide dado (Figura 39) Mackay1992, Paul 1994, Picker 1999

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Las células de memoria recién activadas son capaces de dejar el ganglio linfático a través de linfáticos eferentes, ingresan a la circulación y posteriormente migran a los diferentes tejidos secundarios a través de la presencia de receptores de asentamiento expresados en diferentes organos<sup>Picker 1994</sup>. La expresión de estos receptores se encuentra aumentada en sitios con procesos inflamatorios. Las células de memoria son altamente susceptibles a apoptosis y los "santuarios" protectores de las células de memoria son finitos y limitados por su capacidad para mantener la viabilidad celular<sup>Butcher 1996, Salmon 1994</sup>. Es posible que células que abandonan este ámbito protector puedan morir, particularmente aquellas que encuentran otro antígeno o co-estímulo fuera de este ambiente protector, así mismo, cuando los nichos protectores están sobre poblados, pudieran existir una competencia para ingresar a estos, y aumentar el porcentaje de células muertas hasta que nuevamente se restablezca el equilibrio<sup>Picker 1993</sup>. En casos en donde la población celular a este nivel es escasa, diferentes factores locales probablemente mantienen la viabilidad celular hasta que aumente el número de células presentes. La muerte de estas células estaría protegida al bloquear las señales de muerte, Diferentes autores han mostrado que el número de células de memoria es constante por lo que es posible que se mantenga este numero a través de la diferenciación a partir de precursores naive o bien que sea el resultado de la expansión de células de memoria en órganos periféricos por la re-exposición antigénica y la muerte de células de memoria circulantes no específicas para este antígeno lo que ocasionara la pérdida a lo largo de la vida de células de memoria cuyo antígeno específico este escasamente presente en el individuo<sup>Akbar 1994 Akbar 1993</sup>.

Las vías de maduración de linfocitos T y B en los órganos linfoides secundarios son análogas en muchos aspectos. Ambas estirpes celulares son liberadas a la circulación como células vírgenes, capaces de responder al antígeno en forma sub óptima. Sin embargo, una de las diferencias más importantes en cuanto a la maduración de las células B es el mecanismo de reconocimiento del antígeno, así mismo, las células B a diferencia de las T, sufren procesos de selección y mutación en órganos linfoides secundarios, los cuales son dependientes del antígeno<sup>MacLennan 1992, Liu 1992</sup>.

Como en las células T, el proceso de selección del repertorio de la célula B esta regulada por un micro ambiente especializado; el centro germinal. La doble funcionalidad del receptor de células B (reconocimiento antigénico y activación celular) requiere dos fases de activación; en la fase inicial, existe una respuesta primaria después de 3 a 4 días de la activación, las células naive se diferencian a células plasmáticas de vida corta y secretan IgM la cual tiene baja afinidad por el antígeno. Después de 4 a 5 días se inicia la segunda "fase" de activación, influenciada por la presencia de factores solubles provistos por otras células (Linfocitos T). En esta etapa, las células plasmáticas tienen una vida media mayor, y como consecuencia del cambio de clase y una posible re-edición del repertorio de reconocimiento del antígeno, estas células secretan mayores cantidades de inmunoglobulinas de alta afinidad (principalmente IgA, IgG y en ocasiones IgE). Los linfocitos B no diferenciados a células plasmáticas adquieren características de células de memoria y son capaces de diferenciarse a células plasmáticas en contactos subsecuentes con el antígeno<sup>Plicker 1999</sup>.

Estudios en células B circulantes en ratón sugieren la siguiente secuencia de eventos en la génesis de una respuesta inmune a un antígeno T dependiente<sup>Plicker 1999, Mac Lennan 1993</sup>.

- Los linfocitos B naive circulantes IgD+, IgM+ entran a los órganos linfoides secundarios a través de los vasos endoteliales altos.
- En ausencia de antígeno específico estas células atraviesan la zona T y/o la zona marginal. Migran a los folículos primarios o al manto de los folículos secundarios (sitio en donde se encuentran células B en reposo, excluidas del folículo secundario). Periódicamente los linfocitos B naïve, abandonan el folículo primario o el manto y reingresan a la circulación, reingresando a otro folículo primario o zona del manto en algún otro ganglio linfático. Es posible que estas células recirculen a través de los órganos linfoides secundarios, hasta su muerte o hasta el encuentro con el antígeno específico.
- Ante la presencia del antígeno en circulación o en las células interdigitantes, se interrumpe esta recirculación de linfocitos B vírgenes y los cuales empiezan a diferenciarse y proliferar. Muchas de estas células se diferencian a células plasmáticas de vida media corta, productoras de IgM, dirigiéndose a los

cordones medulares de los ganglios linfáticos o a estructuras equivalentes en otros órganos linfoides secundarios.

- En presencia de linfocitos T, otros linfocitos B vírgenes ingresan a los folículos primarios en donde proliferan en respuesta a complejos antígeno-anticuerpo. Estos blastos desplazan a los linfocitos B en reposo a la periferia formando el manto y los blastos formaran el centro. Se ha demostrado que los centros germinales son oligoclonales.
- Al inicio de la colonización del folículo por linfocitos B estimulados, se inician una serie de cambios que inducen una rápida proliferación como blastos, (tiempo de doblaje de 6-7 horas), este reemplazo induce la maduración de las células dendríticas interdigitantes lo cual contribuye al cambio en la apariencia del centro germinal al igual que la rápida proliferación de las células B (llamados ahora centroblastos). El incremento en el número de células en el centro germinal forma la zona oscura del centro germinal, localizada en el polo opuesto al seno subcapsular del ganglio linfático. El polo opuesto del centro germinal (la zona clara) esta compuesta por centrocitos y células B de núcleo hendido irregular con cromatina condensada. En la zona clara cerca de la zona oscura se encuentran macrófagos especializados, llenos de centrocitos fagocitados. Los centrocitos supervivientes dan lugar a células plasmáticas, plasmablastos y células de memoria.
- En ausencia de estímulo antigénico adicional, el centro germinal mantiene su estructura por 3 semanas después de lo cual los centros germinales empiezan a decrecer y finalmente pierden su morfología. Sin embargo las células dendríticas y los blastos de memoria persisten por un periodo de tiempo mucho mayor después de la estimulación antigénica.

Los centroblastos y centrocitos expresan CD10 y bajos niveles de CD38, los centroblastos expresan CD77. Las células B naive son IgD<sup>+</sup>/IgM<sup>+</sup> y las células B de memoria no expresan IgD en la superficie <sup>Piicker 1999</sup>.



Desde el punto de vista funcional, en los centros germinales pueden identificarse cuatro etapas de maduración: (a) expansión clonal, (b) hipermutación de los genes de Ig (centroblastos), (c) selección clonal (principalmente centrocitos), y (d) re-diferenciación a células de memoria o efectoras (plasmáticas)<sup>Fu 1999</sup>.

Las primeras dos fases proveen el repertorio expandido de genes de Ig modificados por el Ag. El tercer paso mejora y el cuarto reconfigura las clonas para conducir una respuesta efectora o de memoria. El cambio de clase es la etapa final de la función efectora y ocurre en paralelo con los eventos anteriormente descritos<sup>Fu 1999</sup>.

Las células T juegan un papel muy importante en la regulación y supervivencia de las células del centro germinal a través de CD40 y CD40L, cuya interacción es requerida para la formación de los centros germinales (como se demuestra en pacientes con inmunodeficiencia con hiper IgM ligado a X y en ratones CD40L-/- knock-out, los cuales son deficientes en CD40L)<sup>Hornér 1995</sup>.

## DESARROLLO DE ORGANOS LINFOIDES SECUNDARIOS

Los mecanismos mediante los cuales se inicia la organogénesis de los tejidos linfoides secundarios empieza a ser entendida principalmente por la disponibilidad de modelos animales.

La mayor parte de la información disponible analiza las consecuencias de la ausencia de genes que codifican para algunas citocinas y quimiocinas, tomando esta información se han propuesto algunos mecanismos a través de los cuales se inicia la organogénesis de los tejidos linfoides secundarios<sup>Ansell 2001</sup>.

Es posible que una serie de citocinas participe en la señalización para reclutar linfocitos en los órganos linfoides en formación y la presencia de diferentes citocinas promuevan la formación y definan los compartimentos T y B en estos órganos<sup>Chaplin 1998</sup>.

## PAPEL DE LAS CITOCINAS Y QUIMIOCINAS EN EL DESARROLLO DE ORGANOS LINFOIDES

Distintas moléculas y sus ligandos son esenciales en el desarrollo de órganos linfoides secundarios, entre estos, miembros de la familia de TNF/RTNF/LT son importantes

para el desarrollo de los tejidos linfoides<sup>Chaplin 1998</sup>. La linfo toxina  $\alpha 3$  (homodímero soluble de la familia de la linfo toxina alfa) promueve el crecimiento de ganglios cervicales y mesentéricos, así como de ganglios lumbares y sacros, los cuales representan drenaje de mucosas de diferentes regiones<sup>Chaplin 1996</sup>. La  $LT_{\alpha 3}$  se une a los receptores TNF1 y posiblemente a otros receptores de la familia de TNFR, y es a través de estos que ejerce su función. El heterodímero formado por las cadenas  $\alpha 2$  y  $\beta 1$  ( $LT-\alpha 2 \beta 1$ ) es responsable del crecimiento ganglionar en otros sitios y del desarrollo de tejido linfoide en tubo digestivo (placas de Peyer)<sup>Chaplin 1996</sup>. La ausencia de algunas de estas moléculas también incide en la arquitectura esplénica, como puede observarse en los ratones homocigotos *aly/aly* en los cuales no se identifica zona marginal en el bazo, no existen células dendríticas y no desarrollan ganglios linfáticos<sup>Miyawaki 1994, Shinkura 1996</sup>.

Recientemente, además de  $LT \alpha 1 \beta 2$  se ha descrito que la citocina inducida por activación-relacionada a TNF (TRANCE-OPGL, RANKL, ODF-) es indispensable para la formación de ganglios linfáticos a través de su receptor. TRANCE-R, esta citocina no es necesaria sin embargo para la formación de placas de Peyer<sup>Kim 2001</sup>. Este receptor se encuentra presente en las células inductoras de tejido linfoide (CITL) y se encuentra disminuido en ratones TRANCE- y LT- (ver adelante)<sup>Kim 2001</sup>. Las CITL son incapaces de formar grupos celulares a diferencia de lo que sucede en los ratones silvestres<sup>Ansell 2001</sup>.

La localización de los linfocitos B, T, células dendríticas y macrófagos en el tejido linfoide periférico está controlada por quimiocinas, las cuales son producidas por las células del estroma y por células de la médula ósea (Figura 40)<sup>Campell 2000</sup>. Los linfocitos B son atraídos por la quimiocina de células B para la cual los linfocitos B expresan, en forma constitutiva CXCR5<sup>Fu 1999</sup>, es posible que la fuente de esta quimiocina sean las células dendríticas foliculares<sup>Fu 1999</sup>. Aunque los linfocitos T también expresan CXCR5, lo hacen en menor nivel, lo que puede explicar el ingreso de los linfocitos T a los folículos participando en la formación del centro germinal<sup>Bromley 2000</sup>.

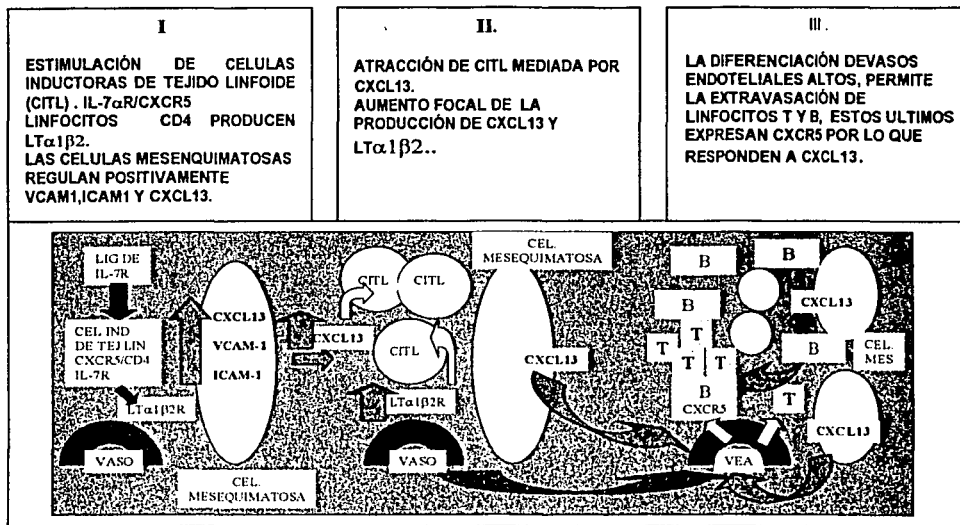
Dos quimiocinas, MIP-3 $\beta$  y la quimiocina linfoide secundaria (SLC) son responsables de la localización de los linfocitos T en las áreas T. Ambas se unen al receptor CCR7,

que esta presente en células T. En ratones carentes de CCR7 no hay formación de zonas T. SCL es secretada por células estromales presentes en las zonas T en bazo y por las células endoteliales de los vasos endoteliales altos de los ganglios linfáticos y placas de Peyer<sup>Ansell 2001</sup>.

Los linfocitos B requieren de la presencia de factores de crecimiento que sustentan su desarrollo, distintos grupos celulares presentes en la medula ósea y en el hígado fetal son capaces de inducir su producción. CXCL12 es producida por células del estroma de la medula ósea, esta quimiocina favorece la migración de células precursoras e induce el contacto cercano entre estas y las células del estroma<sup>Ma 1999</sup>. Esta quimiocina favorece así mismo la activación de la integrina  $\alpha_4\beta_1$ , lo que induce que células primitivas CD34+ se adhieran al endotelio vascular, el funcionamiento correcto inducido por la quimiocinas requiere así mismo de la presencia de su receptor CXCR4<sup>Kawabata 1999</sup>, Coulomb-L Hermin 1999.

En la timopoyesis, las quimiocinas tienen también un papel importante. Durante la maduración de los timocitos, estos realizan una serie de movimientos ordenados entre los subcompartimentos tímicos<sup>Zou 1998</sup>. Los linfocitos T dobles negativos se encuentran localizados en la corteza subcapsular, al madurar a linfocitos dobles positivos las células emigran a la corteza en donde se lleva a cabo la selección positiva. Los linfocitos seleccionados migran a la medula en donde se convierten en linfocitos unipositivos<sup>Campell 1999</sup>. Los eventos finales de maduración que incluyen la delección de clonas autoreactivas por selección negativa, se llevan a cabo en la médula<sup>Ansell 1999</sup>.

**FIGURA 40. FORMACIÓN DE ORGANOS LINFOIDES SECUNDARIOS**



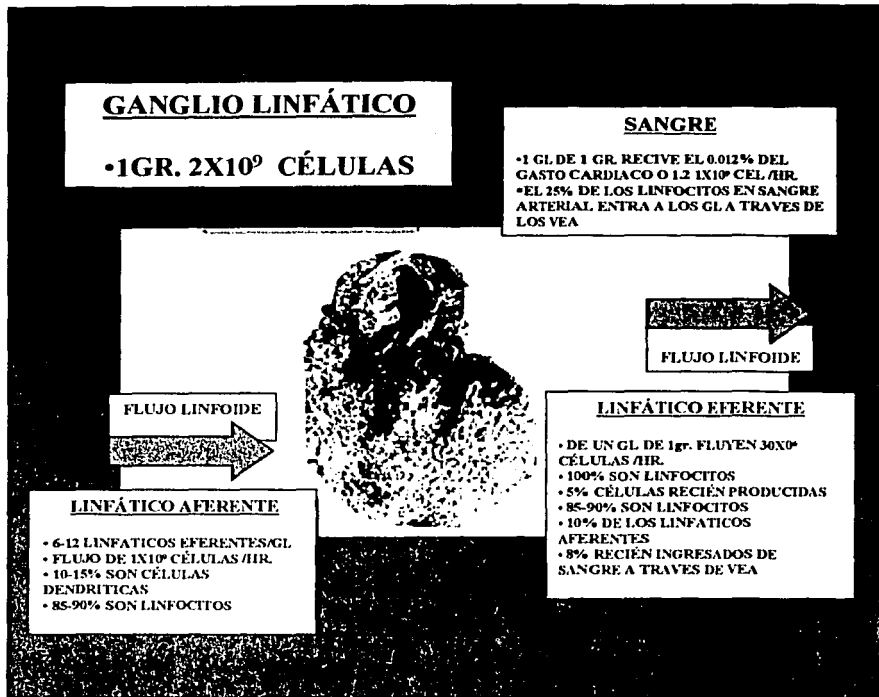
### MIGRACIÓN DE LOS LINFOCITOS A TRAVÉS DEL GANGLIO

Los linfocitos son células móviles las cuales continuamente se encuentran recirculando entre la sangre y los órganos linfoides secundarios, esta circulación favorece la llamada vigilancia inmunológica y es el mecanismo mediante el cual se difunde la respuesta inmune y la memoria inmunológica<sup>Gowans 1957, Young 1998</sup>

Además del sistema de circulación sanguínea, los vertebrados superiores poseen un segundo sistema que permite el retorno de líquidos extravasculares y proteínas a la sangre<sup>Gowans 1970</sup>. Este sistema linfático permite mantener la homeostasis y es una ruta utilizada por los diferentes elementos del sistema inmune<sup>Smith 1970</sup>. Mediante este sistema circulatorio, linfocitos presentes en diferentes tejidos, pueden ingresar nuevamente a la circulación mediante los linfáticos aferentes (pre-ganglionar) y al salir de los ganglios linfáticos recircular a través de los linfáticos eferentes (post-ganglionares)<sup>Smith 1970</sup>.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 41. COMPOSICION DE LOS DIFERENTES LINFOCITOS EN GL



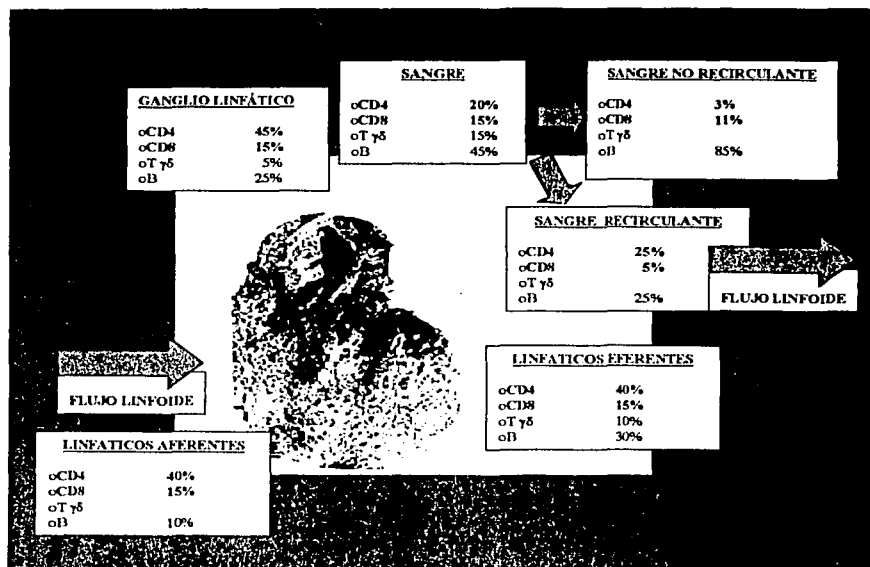
En el humano, los ganglios linfáticos se encuentran agrupados en cadenas, la vía eferente de un ganglio contribuye a suplir de células a través de la vía aferente del segundo grupo ganglionar. La circulación linfoide parece estar restringida, al menos en algunos linfocitos, cuyas características han sido descritas en otras secciones<sup>Cahill 1977</sup>.

Cada linfático aferente provee 10% de los linfocitos presentes en el ganglio linfático, cada ganglio linfático recibe  $1.2 \times 10^8$  células /hora, lo cual representa el 0.012% del gasto cardíaco<sup>Hay 1977</sup>, el 40% de los linfocitos no se encuentran en circulación. Es posible que 25% de los linfocitos circulen entrando y saliendo de los ganglios a través de los linfáticos (Figura 41)<sup>Andrade 1998</sup>.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El Porcentaje de las distintas poblaciones circulantes es variable como se ilustra.

**FIGURA 42. PORCENTAJES CELULARES EN LOS DISTINTOS COMPARTIMENTOS**



Los linfocitos ingresan al ganglio linfático a través de dos vías; el 10% a través de linfáticos aferentes y a través de las venas post capilares (vénula endoteliales altas), la migración de estos no es al azar, llevándose a cabo el proceso de ecotaxis, la organización pos migratoria de los linfocitos depende de la presencia de una serie de factores entre los cuales las quimiocinas y citocinas, tienen un importante papel como ha sido mencionado previamente<sup>Gupta 1998, Young 1997</sup>

Existe evidencia que sugiere que el IFN  $\alpha$  tiene un papel importante en la regulación de la migración de linfocitos B a través del GL. Las células B de los centros germinales carecen de receptores para la L selectina haciéndolos incapaces de migrar. Este hecho al parecer tiene como objetivo el retener células B antígeno específicas en el centro germinal durante el tiempo que se establece una respuesta inmune. se requiere para asegurar la supervivencia de los linfocitos B en los centros germinales. Se requiere

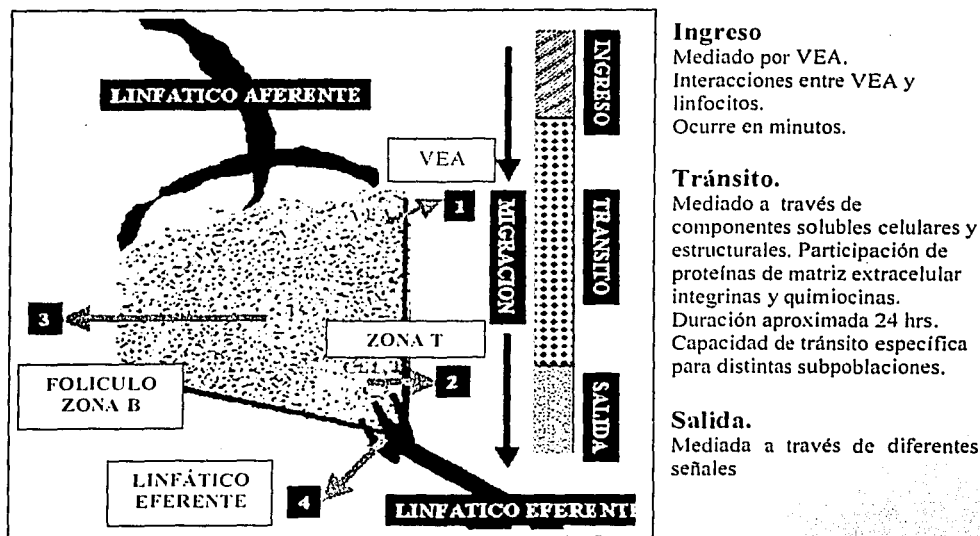
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

asegurar también la supervivencia de los linfocitos B en los centros germinales, favoreciendo la adhesión homotópica mediada por IFN  $\alpha$  y CD21 <sup>Young 1997</sup>.

Otro aspecto importante es la expresión de integrinas las cuales son necesarias durante la migración a través del ganglio y la ecotaxis <sup>Kraal 1997</sup>.

El paso siguiente en el tránsito de linfocitos a través del ganglio linfático es el menos conocido Estudios dinámicos para evaluar el tráfico linfocitario a través del ganglio indican que el tiempo máximo de estancia de un linfocito en el ganglio es aproximadamente de 24 hrs (Figura 43) <sup>Young 1998</sup>.

**FIGURA 43. MIGRACIÓN A TRAVES DEL GANGLIO**



Se piensa que los linfocitos ingresan a los órganos linfoides mediante una cascada de eventos. en esta proposición las células se adhieren al endotelio vascular y ruedan a través de interacciones entre estos mediadas por selectinas, posteriormente incrementan la actividad mediada por integrinas, lo que ocasiona la firme adhesión de las células, posteriormente bajo la influencia de factores quimiotácticos estas células son capaces de migrar a los tejidos <sup>Stamper1976. Hendrix 1987. Mebius 1993</sup>. Las selectinas expresadas por los linfocitos interactúan con las adhesinas expresadas en ganglios y otros órganos linfoides

secundarios<sup>Greitz1996</sup>. Uno de los factores quimiotáticos más importantes identificados hasta la fecha son las quimiocinas<sup>Kim 1999</sup>.

Así mismo, existen importantes diferencias en los tipos celulares que circulan y se asientan en ganglios linfáticos. Por ejemplo un porcentaje cercano al 15% de células presentes en linfáticos aferentes son células con marcadores para células dendríticas, en contraste con el hecho de que en linfáticos aferentes únicamente circulan linfocitos. En el ganglio linfático aproximadamente el 45% de las células son linfocitos CD4<sup>+</sup>, 15% CD8<sup>+</sup>, 25% CD19<sup>+</sup> y solamente 5%  $\gamma\delta$ . Estudios dinámicos del flujo linfocitario han mostrado que aproximadamente 40% de los linfocitos no son células circulantes, principalmente los linfocitos B, hecho que se refleja en la baja proporción de estas células en sangre<sup>Washington 1997, Mc Kay 1990, Abernethy 1990, Mc Kay 1992, Premier 1998</sup>.

Los linfocitos CD8<sup>+</sup>, se ha visto que migran a GL intestinales, mientras que los CD4 lo hace a su tejido de origen (GL regional). Las moléculas expresadas en linfocitos CD4 en los linfáticos aferentes y eferentes sugieren que en los primeros existen principalmente células de memoria integrina $\beta 1$ <sup>high</sup>/L-selectina<sup>low</sup>, hecho que sugiere que células naïve circulan principalmente en ganglios mientras que las de memoria lo hacen en tejidos (piel, músculo, tejido celular subcutáneo etc)<sup>Evans 1993, Costano Vvelez 1995</sup>.



## PATOLOGÍA GANGLIONAR BENIGNA

### LINFADENOPATIAS

Los crecimientos ganglionares son frecuentes y pueden detectarse en diferentes localizaciones del organismo. Clínicamente son ganglios pequeños (1 a 2 cm. de diámetro), blandos, móviles y no traducen desde el punto de vista médico enfermedad Collins 1995.

La presencia de crecimientos ganglionares mayores pueden ser secundarios a diferentes procesos infecciosos, inmunológicos, endocrinopatías, procesos malignos primarios del ganglio, o metastáticos Das 1991. En el 84% de los casos estas linfadenopatías son benignas, más de la mitad son consideradas como reactivas inespecíficas y el resto de origen infeccioso; principalmente mononucleosis infecciosa, toxoplasmosis o tuberculosis Davey 1986. En el 16% de los casos puede establecerse el diagnóstico de linfoma o metástasis Collins 1997. Aún cuando el tamaño de la adenopatía y la consistencia de estas pueden orientar clínicamente a un diagnóstico, la certeza requiere del estudio histopatológico y exámenes de laboratorio Lukes 1988.

En algunas ocasiones, el crecimiento ganglionar es detectado por procedimientos de gabinete (Radiografía de tórax o tomografía axial computada) y en estos casos su presencia habitualmente traduce un proceso patológico que requiere de un procedimiento diagnóstico Lukes 1988.

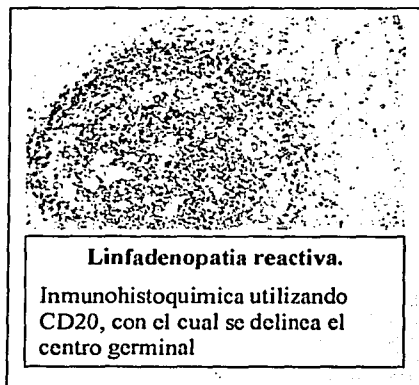
El estudio de las adenopatías reactivas es importante por dos razones; en algunos pacientes las características de estas pueden semejar clínica e histológicamente linfomas y en otras ocasiones pueden preceder a la presencia de un linfoma Dorfman 1974, Davey 1986.

En la actualidad el análisis ganglionar puede complementarse con estudios de inmunohistoquímica y técnicas moleculares, las cuales permiten definir la estirpe de las células y el estadio de diferenciación (Figura 44) Macintyre 1989. La clonalidad de las poblaciones es otra variante importante que puede analizarse molecularmente, aunque su presencia sugiere un proceso maligno existen algunas excepciones; por ejemplo en linfomas originados en pacientes transplantados frecuentemente se encuentran poblaciones policlonales, clínicamente estos tumores son muy agresivos Collins 1997. Por

otro lado , estudios inmunogenéticos han mostrado clonalidad en adenopatías asociadas al Síndrome de Sjögren, a la linfadenopatía inmunoblástica y las adenopatías secundarias a la infección por VIH <sup>Alonso 1978, Kassan 1978, Santana1972</sup> . Si bien es posible que en estos casos exista un riesgo elevado para el desarrollo de linfomas la asociación no está claramente establecida.

Los procesos ganglionares reactivos, son analizados principalmente en base a la arquitectura ganglionar (Tabla 3), en ocasiones es posible elaborar una correlación etiológica y las características funcionales de las células presentes son muy pocas veces consideradas.

#### FIGURA 44. IDENTIFICACIÓN CELULAR POR INMUNOHISTOQUIMICA



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**TABLA 3. ENFERMEDADES ASOCIADAS CON LINFADENOPATIA**

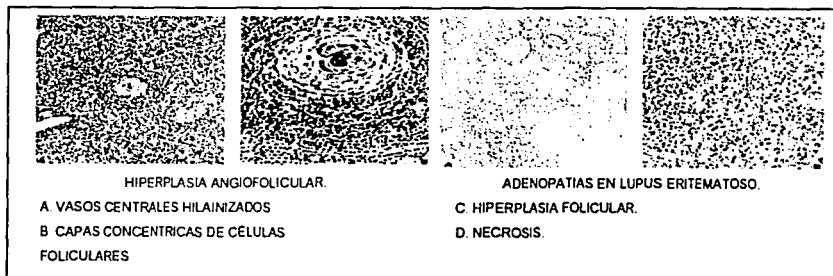
<b>AGENTE ETIOLÓGICO</b>	<b>ARQUITECTURA GANGLIONAR</b>
<p><b><u>INFECCIOSAS</u></b></p> <p><b>VIRALES:</b> MONONUCLEOSIS <b>BACTERIANAS:</b> ESTREPTOCOCO, SÍFILIS, TUBERCULOSIS, <b>HONGOS:</b> HISTOPLASMOSIS <b>CLAMYDIA:</b> LINFOGRANULOMA VENEREO <b>PARASITOSIS:</b> TOXOPLASMOSIS <b>RICKETSIAS:</b> TIFO</p>	<p><b><u>HIPERPLASIA FOLICULAR</u></b></p> <p>ARTRITIS REUMATOIDE SÍNDROME DE SJÖGREN SÍNDROME DE STILL ENFERMEDAD DE KIMURA LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO PROCESOS GRANULOMATOSOS ENFERMEDAD DE WHIPPLE INFECCIÓN POR HIV HIPERPLASIA ANGIOFOLICULAR PSEUDOTUMOR INFLAMATORIO SECUNDARIA A DIFENILHIDANTOINA</p>
<p><b><u>INMUNOLÓGICAS</u></b></p> <p>ARTRITIS REUMATOIDE LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO HIPERSENSIBILIDAD A DROGAS LINFADENOPATÍA ANGIOINMUNOBLASTICA</p>	<p><b><u>HIPERPLASIA INTERFOLICULAR</u></b></p> <p>ENFERMEDAD DE WHIPPLE ADENITIS VIRAL SÍNDROME HEMOFAGOCITICO VIRAL LINFADENOPATIA DERMATOPATICA HISTIOCITOSIS SINUSOIDAL HISTIOCITOSIS X</p>
<p><b><u>NEOPLÁSICAS</u></b></p> <p><b>HEMATOLÓGICAS:</b> LEUCEMIAS, LINFOMAS, ENFERMEDAD DE HODGKIN <b>METASTÁSICAS</b></p>	<p><b><u>HIPERPLASIA DIFUSA</u></b></p> <p>LINFADENOPATIA ANGIOINMUNOBLASTICA LINFADENOPATIA INMUNOBLASTICAREACCIONES A DROGAS SARCOIDOSIS LESIONES VASCULARES PROLIFERATIVAS.</p>
<p><b><u>ENDOCRINOPATIAS</u></b></p> <p>HIPERTIROIDISMO</p>	
<p><b><u>MISCELÁNEAS</u></b></p> <p>ENFERMEDAD DE CASTELMAN SARCOIDOSIS ENFERMEDAD DE KIKUSHI ENFERMEDAD DE KAWASAKI HISTIOCITOSIS X</p>	

## HIPERPLASIAS GANGLIONARES

Desde el punto de vista fisiológico se sabe muy poco de los eventos que inducen los cambios en la arquitectura ganglionar. Las hiperplasias se caracterizan por una proliferación celular reversible, puede involucrar diferentes sitios anatómicos del ganglio <sup>Dorfman 1974</sup>; los folículos, que constituyen zonas predominantemente pobladas por linfocitos B y las regiones paracorticales o interfoliculares, en las cuales predominan linfocitos T <sup>Fishlede 1987, Lipford 1987</sup>.

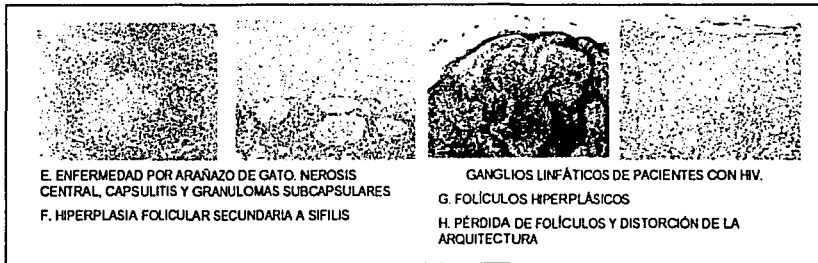
**PATRÓN FOLICULAR,** En este tipo de hiperplasia numerosos folículos crecidos distribuidos en la corteza, paracorteza y la unión córtico-medular. Los centros germinales se encuentran hiperplásicos y morfológicamente están constituidos por células grandes y pequeñas, en ocasiones con múltiples mitosis. En la zona marginal de los centros germinales se encuentra una franja de linfocitos pequeños que claramente delimitan el folículo del resto del parénquima. El patrón folicular es el tipo principal de hiperplasia en niños, linfadenitis de tipo luético, reumatoide y la hiperplasia angiofolicular (Figuras 45-a y 45-b) <sup>Fox 1943, Norris 1996, Pileri 1992, Campbell 1977, Hartsock 1970, Chadburn 1989, Ewing 1985, Keller 1972, Frizzera 1971</sup>.

FIGURA 45-a. HIPERPLASIAS FOLICULARES



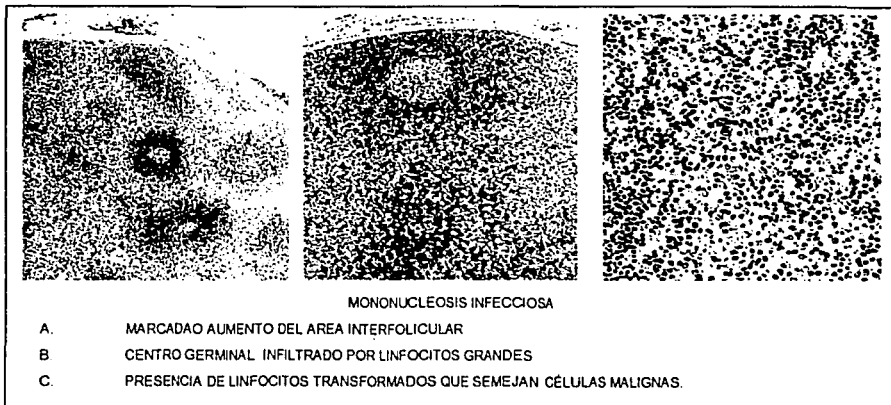
TE CON  
FALLA DE ORIGEN

**FIGURA 45-b. HIPERPLASIAS FOLICULARES**



**PATRON SINUSOIDAL**, se caracteriza por el crecimiento de los sinusoides que conforman el parénquima ganglionar. Existe una proliferación de histiocitos, la medula se encuentra aumentada de tamaño y en ocasiones se encuentran células plasmáticas formando cordones Swerdlow 1992. El patrón sinusoidal se encuentra frecuentemente en zonas linfoportadoras a tumores malignos y algunos procesos infecciosos (Figura 46) Salvador 1971, Childs 1987

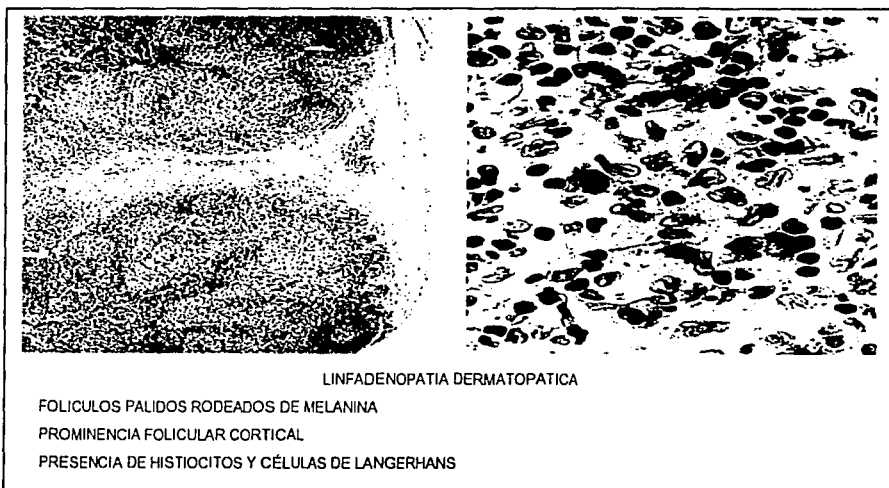
**FIGURA 46. HIPERPLASIAS SINUSOIDALES.**



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**PATRON DIFUSO** existe pérdida de la arquitectura normal del ganglio. El parénquima del ganglio se encuentra constituida por hojas de linfocitos, inmunoblastos y ocasionalmente macrófagos. Las vénulas post capilares se encuentran prominentes. Este tipo de hiperplasia es común en infecciones virales, linfadenopatía dermatopática y en la linfadenopatía inmunoblástica (Figura 47) Krishnan 1993, Abbondanzo 1995, Mitchell 1992

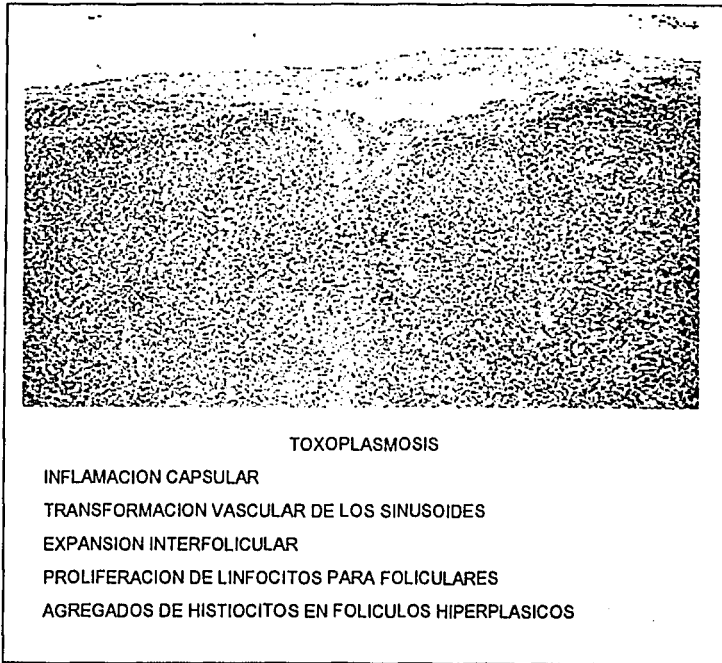
**FIGURA 47. HIPERPLASIAS DIFUSAS.**



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**PATRON MIXTO**, es una combinación de hiperplasia folicular y difusa. Existen folículos aumentados de tamaño, presencia de centros germinales, proliferación interfolicular de inmunoblastos, en ocasiones sinusoides dilatados y proliferación de histiocitos. Este tipo de proliferación es frecuente en mononucleosis infecciosa y en la linfadenitis por toxoplasma (Figura 48). <sup>Dorfman 1973</sup>.

**FIGURA 48. HIPERPLASIAS MIXTAS**



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## PATOLOGÍA GANGLIONAR MALIGNA

Las neoplasias presentes en los ganglios linfáticos pueden ser primarias del gánglio (linfomas) o bien haberse originado en otro tejido. Las neoplasias que se originan en los ganglios poseen características similares a las originadas en otros órganos; son clonales, invade tejidos sanos y destruye la arquitectura normal <sup>Dorfman 1974, Davey1986</sup>.

## NEOPLASIAS DEL SISTEMA INMUNE

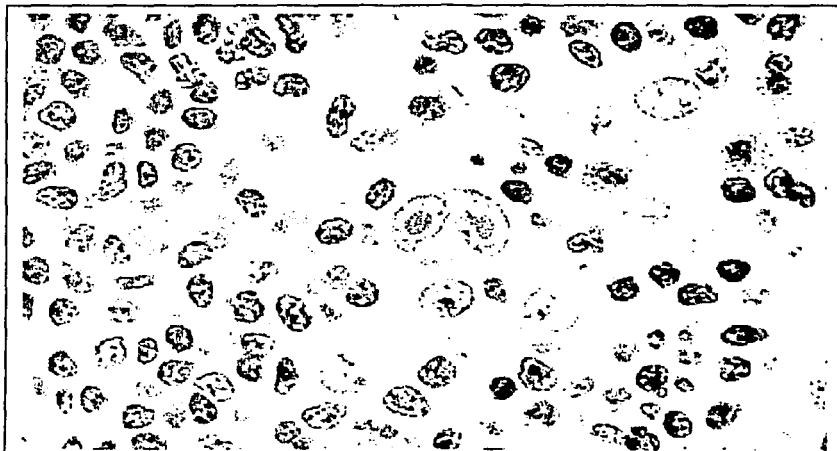
Los linfomas son tumores del sistema inmune; el conocimiento de sus características morfológicas, comportamiento y patogénesis es complejo <sup>Armitage 1999</sup>. Los linfomas se han dividido en Enfermedad de Hodgkin y Linfomas no-Hodgkin <sup>Lukes 1986, Lennert1988, Harris1994, Davey1986, Glick1980</sup>.

## ENFERMEDAD DE HODGKIN

La enfermedad de Hodgkin tiene como característica histológica la presencia de células de Reed Stenberg <sup>Agarsson 1989, Casey 1989, Glick1976</sup> (Figura 49)

FIGURA 49. CÉLULAS DE REED STEMBERG

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



ENFERMEDAD DE HODGKIN  
CÉLULAS DE REED STEMBERG



Es posible que las células de Reed Stenberg sean de origen linfoide, sin embargo, su caracterización ha sido sumamente difícil <sup>Glick 1976, Glick 1980, Poppema 1980, Times 1986, Falini 1987, Agarsson 1989, Casey 1989, Glick 1976.</sup>

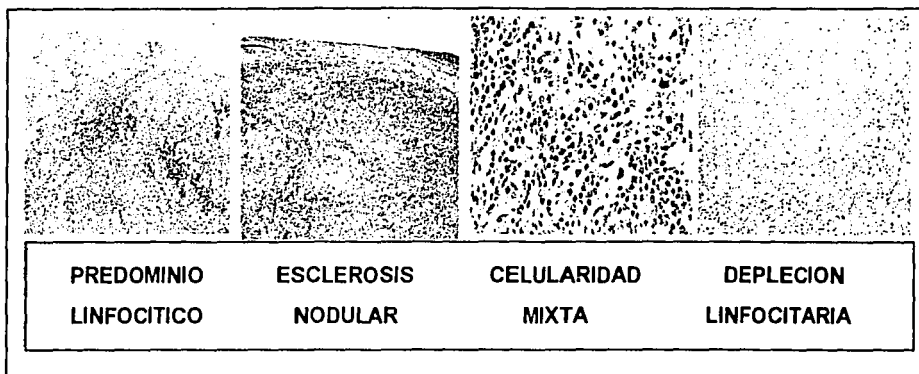
La clasificación utilizada inicialmente para la Enfermedad de Hodgkin (EH), fue descrita por Lukes-Butler y posteriormente fue modificada en la conferencia de Rye, describe cuatro tipos de enfermedad de Hodgkin; Predominio linfocítico, esclerosis nodular, celularidad mixta y depleción linfocitaria (Figura 50) <sup>Lukes 1966, Lukes 1966.</sup>

Clinicamente existen adenopatías que involucran principalmente los ganglios cervicales y supraclaviculares, frecuentemente existen datos sistémicos; fiebre, astenia y malestar general. La presencia de infección por virus de Epstein Barr ha sido correlacionada con la presencia de este linfoma <sup>Kaplan 1980, Knowles 1988, Shibata 1991, Andriko 1997.</sup>

La EH predominio linfocítico representa el 5% de los casos, es más frecuente en varones jóvenes, involucra principalmente ganglios cervicales y axilares y su pronóstico es bueno <sup>Trudel 1987</sup>. El 60% de los enfermos con EH tienen el tipo esclerosis nodular, es más frecuente en adultos jóvenes y frecuentemente existe masa mediastinal <sup>Keller 1968</sup>. La EH celularidad mixta se presenta en el 30% de los casos y en etapas más avanzadas que las dos anteriormente descritas <sup>Lukes 1966, Mauch 1983</sup>. Del 1 al 5% de los casos con EH tienen la variedad depleción linfocitaria, la cual frecuentemente se acompaña de datos sistémicos y al diagnóstico la enfermedad esta diseminada, posiblemente esta variedad sea la que confiere el pero pronóstico a los pacientes <sup>Neiman 1973, Greer 1986</sup>

Las características clínicas, histológicas e inmunológicas de este grupo de enfermedades resultan muy interesantes, sin embargo no serán analizadas en este trabajo.

**FIGURA 50. CLASIFICACION DE LA ENFERMEDAD DE HODGKIN**



### LINFOMAS NO HODGKIN

Los linfomas no Hodgkin, son un grupo heterogéneo de neoplasias las cuales han sido agrupadas de acuerdo diferentes clasificaciones, principalmente relacionadas a sus características histológicas (Lukes-Collins, Kiel, Working Formulation) <sup>Lukes1988, Lennert1992, Harris1994, Proposed World Health Organization 1997</sup>. Recientemente se han incluido en la clasificación características inmunofenotípicas, genéticas e incluso moleculares (REAL) <sup>Harris 1994</sup>.

Algunos agentes infecciosos, principalmente virales, se han asociado al desarrollo de estos tumores; especial atención ha tenido la asociación con el virus de Epstein Barr y la presencia de Linfoma de Burkitt, Enfermedad de Hodgkin, Linfoma de células NKT, etc. <sup>Hanto 1981</sup>. Enfermos con padecimientos crónicos o recibiendo tratamientos con drogas inmunosupresoras (inmunodeficiencias congénitas o adquiridas, enfermedades autoinmunes y la exposición a radiaciones o agentes químicos), desarrollan con mayor frecuencia linfomas <sup>Alonso1987, Santara 1992, Kassan1978</sup>.

La presencia anormalidades genéticas son frecuentemente detectadas en estos padecimientos, translocaciones de genes específicos han sido descritas en los linfomas <sup>Lee 1989, Gaulard 1992, Horsman 1995, Sander 1993, LoCoco 1993, Yano 1992</sup>. El estudio del linfoma desde el punto de

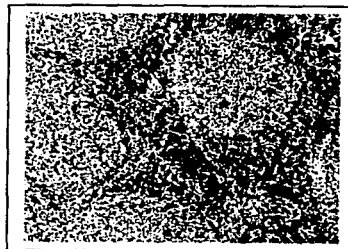
**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

vista inmuno-funcional ha sido pobremente abordado, sin embargo, pudiera revertir una importancia fundamental para el entendimiento de esta neoplasia.

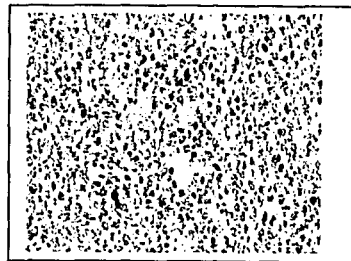
Los linfomas B son los linfomas más frecuentes. Este grupo de patologías están constituidos por linfocitos B en diferentes etapas de maduración The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997, en la Figura 51 A-E se ejemplifican algunas de las características histológicas de este grupo de linfomas. En este grupo de padecimientos existen claros ejemplos de anomalías cromosómicas características, como en los linfomas de Burkitt endémicos Siegelman 1985, de Jong D 1989.

### FIGURA 51. LINFOMAS DE CÉLULAS B

**A. LINFOMA FOLICULAR** Baler 1992 Leech 1975, Yunis 1987



**B. LINFOMA DE CÉLULAS DEL MANTO** Norton 1995

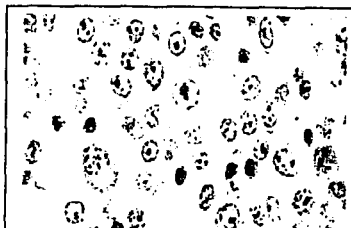


**C. LINFOMA DE LA ZONA MARGINAL** Nizze 1991



**D. LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS**

**GRANDES** Hui 1988



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

E. LINFOMA DE BURKITT <sup>Magrath 1997</sup>



Los linfomas T/NK-cell son menos frecuentes que los linfomas B, constituyen el 15% del total de estas neoplasias. Se dividen en fenotípicamente maduros e inmaduros. La mayoría de los linfomas T son ganglionares en contraste con los NK que son extra ganglionares <sup>Harris 1995, Harris 1994</sup>.

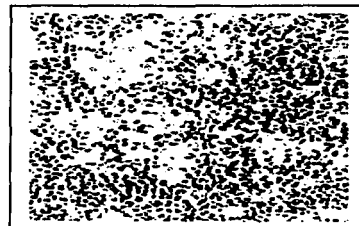
La clasificación REAL de los linfomas, considera a las neoplasias de células T y de células NK, la misma entidad, ya que su contraparte celular normal se origina de un precursor común que expresa CD3ε <sup>Harris 1994, Spits 1995</sup>. Clínica, inmunológica y morfológicamente existe una gran similitud en sus características, en las Figuras 52 A-E, se muestran algunos ejemplos de estos tipos de linfomas.

Los linfomas NK "verdaderos" expresan CD56+ y algunos marcadores de células T, CD3 intracitoplasmático debido a la presencia intracitoplásmica de CD3ε truncado: pueden diferenciarse de los linfomas T porque estos no expresan CD3, cadenas αβ o τδ en la superficie y no rearreglan los genes para el receptor de la célula T <sup>Emile 1996</sup>.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**FIGURA 52. LINFOMAS T/NK**

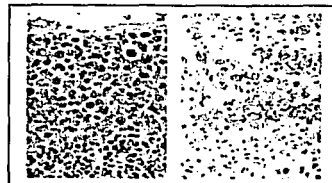
**A. LINFOMA T PERIFERICO** Patsouris 1988



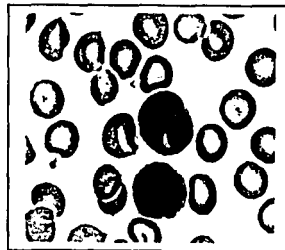
**B. LINFOMA T ANGIOINMUNOBLASTICO** Suchi 1987



**C. LINFOMA ANAPLASICO DE CÉLULAS GRANDES. CD30+** Chott 1990, Kinney 1993

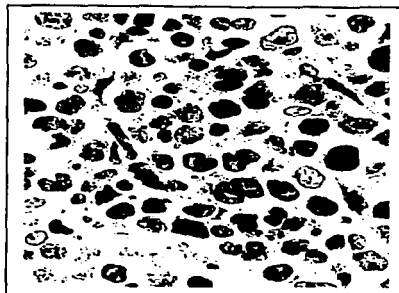


**D. CÉLULAS CIRCULANTES DE LEUCEMIA LINFOMA DE CÉLULAS T** Shimoyama 1991, Jaffe 1984, Yoshida 1984



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

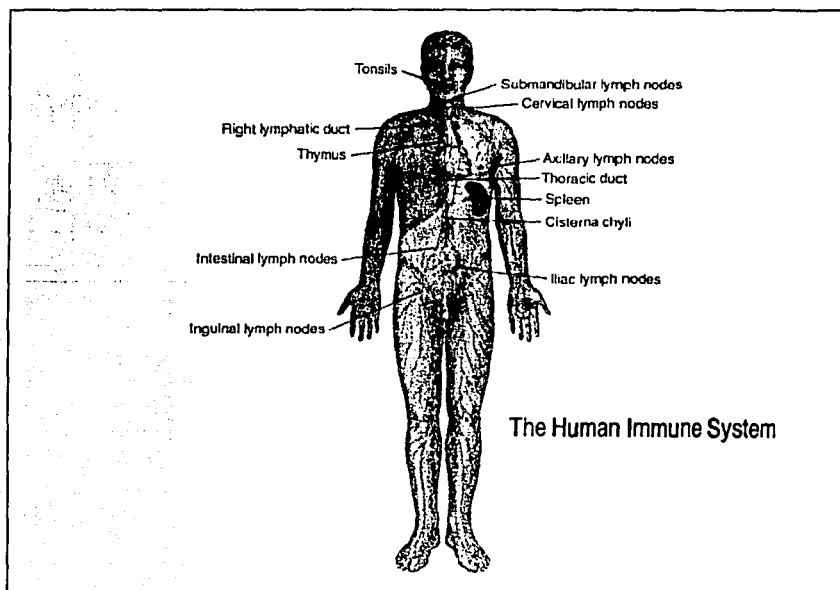
**E. GANGLIO LINFOIDE INFILTRADO POR CÉLULAS TRANSFORMADAS DE SÍNDROME DE SEZARY. CARACTERÍSTICAS DE INMUNOBLASTOS NUCLEOLO CENTRAL, ABUNDANTE CITOPLASMA** Winkler 1984, Wood 1995



## METASTASIS GANGLIONARES

El ganglio linfático así mismo puede ser asiento de metástasis de tumores originados en otros sitios. Los ganglios linfáticos constituyen elemento muy importantes en el sistema inmune, están distribuidos en pequeños grupos en sitios estratégicos a donde drenan vasos linfáticos de diferentes localizaciones anatómicas (Figura 53).

FIGURA 53. DISTRIBUCIÓN DE LA RED LINFÁTICA GANGLIONAR



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los ganglios linfáticos regionales han sido considerados como barreras para evitar la diseminación de la enfermedad<sup>Abe 1972, Weiss 1984</sup>. Sin embargo, existen puentes linfáticos y venosos que sobrepasan los ganglios linfáticos, permitiendo en ocasiones, la diseminación linfática y venosa del tumor<sup>Cady 1984</sup>. En la actualidad es cada vez más

frecuente la visión del ganglio linfático en su papel fisiológico y no meramente anatómico

Las células tumorales en general aparecen primero en el seno marginal, de donde penetran a los sinusoides, a la médula, a la corteza. Aunque inicialmente puede existir una interfase entre el tumor y las células linfoides, eventualmente el tumor puede remplazar la totalidad del parénquima ganglionar. La localización anatómica de las metástasis ganglionares es un importante indicador del sitio de origen del tumor <sup>Ritcher 1979</sup>.

- **Ganglios linfáticos cervicales**, particularmente cervicales posteriores y yugulares altos, representan el área linfoportadora de la cabeza y el cuello y pueden por lo mismo contener células malignas originadas en nasofaringe (FIGURAS 54 A y 54 B), amígdalas, lengua, piso de boca, tiroides, laringe, piel de la cara y cuero cabelludo <sup>Giffner 1977</sup>.
- **Ganglios linfáticos escalenos**, representan la cadena yugular profunda y son el sitio de metástasis de carcinomas intratorácicos, los ganglios escalenos izquierdos son también el sitio de drenaje de tumores intra abdominales.
- **Ganglios supraclaviculares** son sitio frecuente de metástasis para neoplasias abdominales. Los supraclaviculares izquierdos de carcinoma gástrico y se denomina Ganglio de Virchow.
- **Ganglios axilares** generalmente pudieran ser consecuencia en la mujer de tumores originados en la glándula mamaria..
- **Ganglios inguinales**. son sitios de metástasis de tumores originados en la piel de extremidades inferiores, cérvix, vulva, vagina, piel del tronco, recto, ano, ovario y pene.
- **Ganglios pélvicos** son sitios de metástasis de próstata, testículos, tracto genital femenino y piel de extremidades inferiores (Figura 54 C).

Estos patrones metastáticos si bien son frecuentes, en ocasiones pudieran no representar tumores en la localización esperada. De la misma manera la apariencia histológica de las metástasis es sugestiva del sitio primario, por ejemplo, los adenocarcinomas pueden tener patrón glandular, los cánceres epidermoides presencia de queratina, cuerpos de psamoma en tumores tiroideos etc. En ocasiones, existe gran dificultad para establecer el diagnóstico por lo que se requieren técnicas adicionales de inmunohistoquímica etc (Figura 55).

**FIGURA 54.**

**A. CARCINOMA METASTASICO A CUELLO**



**B. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE  
CARCINOMA NASOFARINGEO METASTASICO  
A GANGLIO**



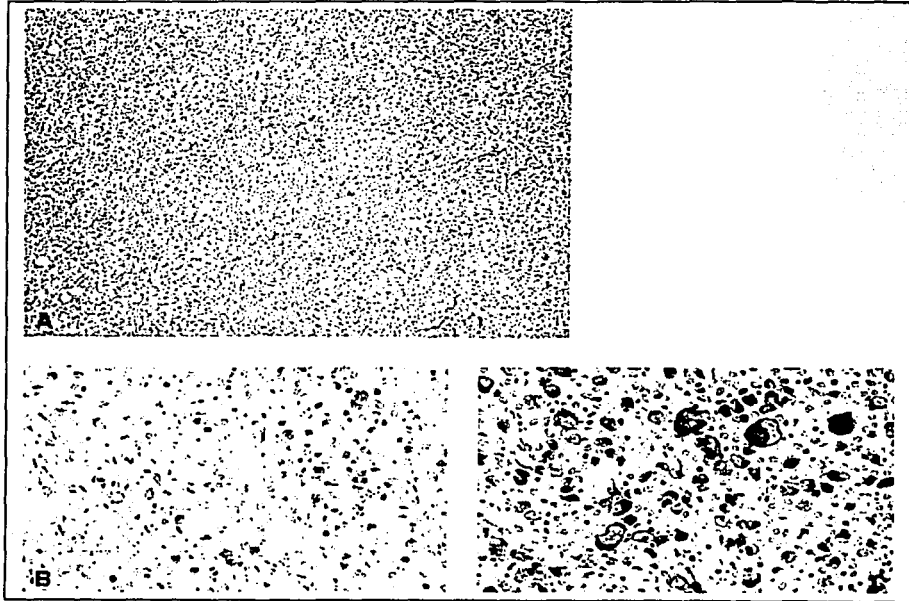
**C. SEMINOMA METASTASICO. PRESENCIA  
DE NICHOS TUMORALES RODEADOS  
DE INFILTRADO INFLAMATORIO**



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



FIGURA 55.



Carcinoma metastático a ganglio, en donde se observa un crecimiento difuso, (a). El análisis inmunohistoquímico (b), mostró una reacción negativa para CD45 (antígeno común leucocitario). La reacción utilizando un anticuerpo dirigido contra citoqueratina resulto fuertemente positiva (c). Eestableciendo el diagnostico de carcinoma metastático a ganglio.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## MECANISMOS DE METASTASIS GANGLIONARES

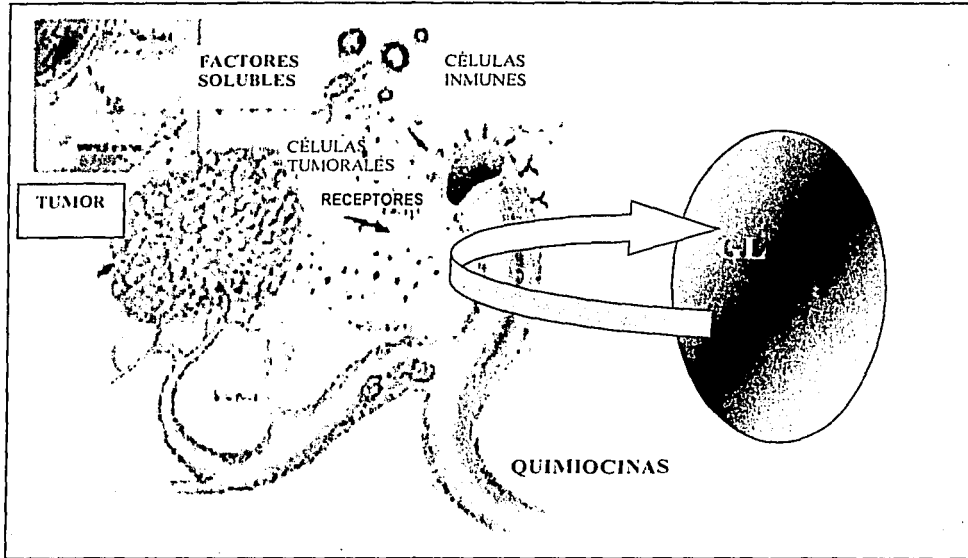
El o los mecanismos a través de los cuales las células neoplásicas ingresan a los ganglios posiblemente no es al azar<sup>Nicolson 1993</sup>, pudiera tratarse de un proceso órgano específico y en el momento actual se desconocen la mayoría de los eventos que determinan la migración selectiva<sup>Nicolson 1993, Wang 1998, Yeatman 1993</sup>

Desde el punto de vista inmune las metástasis ganglionares representan uno de los mayores desafíos ya que las células tumorales ingresan a un órgano en donde existen todos los elementos necesarios para el desarrollo de una respuesta inmune, esta supuesta ventaja funcional y numérica a favor del sistema inmune, frecuentemente no es exitosa e incluso permite en ocasiones que las células tumorales ingresen a la circulación utilizando las mismas vías que los leucocitos y dando oportunidad de que estas tengan acceso a toda la economía<sup>Müller 2001, Campbell 20005, Forster 1999, 6-58, Hujajen1985</sup>

Recientemente ha sido descrito uno de los posibles mecanismos mediante los cuales las células tumorales metastatizan a ganglios linfáticos. La expresión anómala de ciertos receptores en la superficie de las células tumorales pudiera utilizar el gradiente creado por ciertas quimiocinas para dirigir el tránsito de los leucocitos<sup>Müller 2001, Zlotnik 2000, Koshibi2000</sup>. En particular se ha visto que células de cáncer de mama expresan CXCR4 y CCR7 los cuales son esenciales para la regulación del tráfico celular y homeostasis tisular<sup>Müller 2001, Zlotnik 2000</sup>. En condiciones normales la interacción entre CXCR4 y su ligando CXCL12, es fundamental para la migración de células hematopoyéticas y no hematopoyéticas *in vivo*, y la ausencia de CXCR4 y CCL12 en ratón se acompaña de alteraciones cardiovasculares hematopoyéticas y en sistema nervioso central<sup>Nagasawa 1996, Ma 1998, Tachibana 1998</sup>

La expresión anormal de receptores para quimiocinas y otros factores que dirigen el tránsito leucocitario a órganos linfoides secundarios parece tener un importante papel en la migración de las células tumorales a estos órganos<sup>Koshiba 2000</sup>

**FIGURA 56. PARTICIPACIÓN DE LAS QUIMIOCINAS EN EL  
DESARROLLO DE METASTASIS GANGLIONARES**



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# **DISEÑO EXPERIMENTAL**

## DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizó un estudio prospectivo, comparativo en el que se analizaron mediante diferentes estrategias células mononucleares de: a) Sangre y b) Ganglios linfáticos regionales.

Se incluyeron tres grupos de pacientes con cáncer en quienes, como parte del tratamiento, se efectúan disecciones ganglionares regionales y donde es frecuente la presencia de metastasis.

Seleccionamos estudiar tres tipos de neoplasias las cuales poseen características particulares en relación a grupo de edad, factores de riesgo y tipo de tratamiento:

1. Los ganglios regionales de pacientes con neoplasias de cabeza y cuello (CyC) son ganglios que se encuentran en una zona en la que frecuentemente existen estímulos antigénicos de tipo infeccioso, las neoplasias epidermoides de CyC, metastatizan principalmente a ganglios de cuello y los pacientes no reciben tratamiento previo que pudiera modificar las características de los linfocitos presentes en el ganglio.
2. Los ganglios de pacientes con cáncer de mama frecuentemente están involucrados y las pacientes pueden o no recibir tratamiento con quimioterapia lo que pudiera incidir en las características de los linfocitos residentes en el ganglio.
3. Los obtenidos de enfermas con cáncer de cervix también se encuentran en áreas con frecuentes agresiones antigénicas continuas y se encuentra asociados al VPH. La indicación quirúrgica de estas enfermas hace remota la afección ganglionar regional

#### CARACTERIZACIÓN DE LAS POBLACIONES CELULARES EN GANGLIOS LINFÁTICOS DE PACIENTES CON CÁNCER

---

4. Como controles se analizaron ganglios de enfermos sin cáncer y sometidos a un proceso quirúrgico del cual se obtuvieron ganglios.

Dado las características de los ganglios, y por obvias razones éticas, nunca se obtuvieron ganglios de individuos sanos.

En sangre, se analizaron controles sanos y muestras de todos los individuos de los que se obtuvieron ganglios.

El análisis ganglionar incluyó la evaluación de parámetros estructurales, fenotípicos y funcionales de la siguiente manera:

Histología ganglionar, y en algunos casos se realizó inmunohistoquímica utilizando marcadores pan T y pan B.

Inmunofenotipo de las células, analizando principalmente marcadores que definen células involucradas en respuestas celulares.

Características celulares con respecto a su capacidad para responder a mitógenos "T"; proliferando y modificando su estatus dentro del ciclo celular.

Finalmente se realizó una correlación entre los resultados, el comportamiento clínico del los tumores y la literatura mundial, lo que nos permite sugerir algunas conclusiones importantes en el estudio y papel de los ganglios linfáticos en cáncer.

# **JUSTIFICACION Y OBJETIVOS**

## JUSTIFICACION

Los ganglios linfáticos constituyen uno de los sitios anatómicamente diseñados para optimizar el contacto entre células involucradas en el sistema inmune y diferentes antígenos.

El estudio de los ganglios linfáticos regionales de pacientes con neoplasias frecuentemente metastásicas a estos, nos ofrece la posibilidad de entender las características de los linfocitos residentes en ganglios linfáticos localizados en las regiones linfoportadoras de las neoplasias estudiadas y el análisis de estos de manera dinámica, tratando de analizar posibles mecanismos de falla para la eliminación de células tumorales.



CARACTERIZACIÓN DE LAS POBLACIONES CELULARES EN GANGLIOS  
REGIONALES DE PACIENTES CON CÁNCER

**OBJETIVO**

El objetivo del trabajo fue el análisis dinámico y funcional de los ganglios linfáticos regionales realizando una correlación con los métodos tradicionales en el estudio de ganglios regionales en pacientes con cáncer y los parámetros para evaluar la competencia inmune de los pacientes con cáncer.

**PACIENTES, MATERIAL Y  
METODOS**

## SELECCIÓN DE PACIENTES

En un periodo comprendido entre Noviembre de 1995 a Noviembre de 1998, se estudiaron 88 pacientes programados a recibir tratamiento quirúrgico, que incluyera disecciones ganglionares. Tres grupos de enfermos fueron analizados; 30 pacientes con cáncer epidermoide de Cabeza y cuello (CECC) de quienes se obtuvieron ganglios cervicales de los distintos niveles (Tabla 4); 48 pacientes con cáncer de mama (CM), de quienes se obtuvieron ganglios axilares (Tabla 5) y 10 pacientes con cáncer cérvico uterino (CACU), de quienes se analizaron ganglios pre-sacos, para-aórticos e iliacos (Tabla 6).

Cada grupo de pacientes ofreció distintas características inherentes al tipo de neoplasia: Los pacientes con CECC fueron adultos mayores, vírgenes al tratamiento, con antecedentes de tabaquismos y/o alcoholismo, la mayor parte ellos tuvieron algún grado de desnutrición. El diagnóstico histológico en todos los casos fue de carcinoma epidermoide, de distintas localizaciones (Tabla 4). En el caso de las mujeres con CM, todas las pacientes estudiadas fueron sometidas a mastectomía y disección ganglionar axilar. La etapa clínica en todos los casos fue III, en 29 pacientes se administro quimioterapia neoadyuvante. Esta consistió, en 21 pacientes con FAC [5-Fluoro-uracil, adriamicina y ciclofosfamida por tres ciclos, 5 pacientes recibieron Taxol, 4 pacientes CISCA [cis-platino, ciclofosfamida, adriamicina] y 2 pacientes adriamicina y ciclofosfamida. En 19 pacientes la cirugía fue el tratamiento inicial (Tabla 5). Finalmente en las mujeres con CACU, la etapa clínica de los tumores fue IB1 o IIA, no habían recibido terapias citoreductoras previamente, y en dos casos se encontraron datos citológicos sugestivos de infección por el virus de papiloma humano (Tabla 6). Como controles se utilizaron ganglios linfáticos de pacientes sometidos a cirugías del cuello por padecimientos no-malignos (tiroidectomías) (Tabla 7). El protocolo fue aprobado por los Comités Científicos y Ético del Instituto. Las características de los

## PACIENTES, MATERIAL Y METODOS

pacientes fueron analizadas consultando el expediente clínico de donde se obtuvieron los datos relevantes.

**TABLA 4. CARACTERÍSTICAS DE PACIENTES CON CANCER DE CYC**

NUMERO	30		
GENERO	Masculino Femenino		
	25 5		
EDAD	Mediana (Rango)		
	61 (25-86)		
DIAGNOSTICO	Carcinoma epidermoide		
	30		
<b>LOCALIZACIÓN DEL TUMOR</b>			
	<b>SITIO</b>		
	<b>NUMERO</b>		
LARINGE	9		
CAVIDAD ORAL	20		
LENGUA MOVIL	(7)		
TRIGONO RETROMOLAR	(3)		
ENCIA	(10)		
OROFARINGE	1		
TONSIL	1		
<b>ESTADIO CLINICO</b>			
	T2/N1-2	T3/NJ-N2	T4/N1
LARINGE	3	4	2
CAVIDAD ORAL	9	6	5
OROFARINGE	0	0	1
<b>CARACTERISTICAS GANGLIONARES</b>			
NUMERO DE GANGLIOS ANALIZADOS	38		
METASTASICOS	20		
HIPERPLASIA SINUSOIDAL	18		

**Tabla 5. CARACTERÍSTICAS DE PACIENTES CON CANCER DE MAMA**

NUMERO	48
EDAD	51
DIAGNOSTICO CA canalicular infiltrante CA lobulillar	30 18
<b>TRATAMIENTO PREVIO</b>	
QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE	29
SIN TRATAMIENTO	19
<b>TIPO DE QUIMIOTERAPIA</b>	
CISCA (Platino, Ciclofosfamida, Adriamicina)	4
TAXOL	5
ADM/CFA (Ciclofosfamida, Adriamicina)	2
FAC (5-Fluoracilo, Ciclofosfamida, Adriamicina)	21
<b>CARACTERISTICAS GANGLIONARES</b>	
NUMERO DE GANGLIOS METASTASICOS	57 37
HIPERPLASIA SINUSOIDAL	20

## PACIENTES, MATERIAL Y METODOS

TABLA 6. CARACTERÍSTICAS DE PACIENTES CON CANCER CERVICO -UTERINO

<b>PACIENTES</b>	
<b>NUMERO</b>	<b>10</b>
<b>EDAD</b> <b>Mediana</b>	<b>41</b>
<b>CARACTERISTICAS GANGLIONARES</b>	
<b>NUMERO DE GANGLIOS ANALIZADOS</b>	<b>57</b>
<b>METASTASICOS</b>	<b>37</b>
<b>HIPERPLASIA SINUSOIDAL</b>	<b>20</b>

## PACIENTES, MATERIAL Y METODOS

TABLA 7. Características de Controles

CONTROLES	
NUMERO	5
GENERO: Masculino Femenino	3 2
EDAD Mediana (rango)	48 (35-65)
DIAGNOSTICO Bocio no-toxico Hipertrofia linfática	2 3
HIPERPLASIA FOLICULAR	5

## MÉTODOS

### I. PREPARACION DE LINFOCITOS

#### A. Muestras de Ganglios Linfáticos

Los ganglios linfáticos fueron obtenidos en el quirófano en condiciones estériles. El material fue provisto por el cirujano a cargo del procedimiento, e incluyo los grupos de pacientes ya descritos. Se procesaron en forma estéril, bajo campana de flujo laminar. Se disecó la muestra eliminando la grasa circundante y se lavo esta con PBS.

El ganglio se corto transversalmente, para obtener dos muestras de dimensiones similares; una muestra se etiqueto y fijo en formol para llevarse al departamento de Patología para el análisis histológico. El segundo fragmento se colocó en una caja de Petri estéril con medio RPMI, utilizando agujas hipodérmicas, la muestra se disgregó hasta obtener una suspensión celular. La muestra fue pasada a través de una malla de acero inoxidable con el objeto de eliminar fragmentos no disgregados, finalmente se colectó la suspensión celular para realizar la separación de células mononucleares mediante gradiente de Ficoll/Hypaque

Boyum A 1968



## MATERIALES, MATERIAL Y METODOS

### B. Muestras de sangre

En forma simultánea se obtuvieron mediante veno-punción 20 ml. de sangre, la cual fué recolectada utilizando vacío en tubos de vidrio estériles recubiertos con heparina (VACUTAINER Systems Beckton Dickinson, Franklin Lakes NJ). La muestras se mantuvieron a temperatura ambiente y se procesaron el mismo día de haberse recibido.

### OBTENCION DE CELULAS MONONUCLEARES

Las suspensiones celulares obtenidas de ganglios linfáticos fueron centrifugadas y el botón celular resuspendido en: (a) 10ml de RPMI para posteriormente realizar el gradiente con Ficoll/Hypaque. (b) en aquellos ganglios en donde microscópicamente había metástasis, las células fueron resuspendidas en 5 ml. de medio y procesadas como a continuación se describe y (c) la sangre fue diluida en 2 volúmenes de PBS previos a realizarse el gradiente. En tubos estériles cónicos de 50 o 15 ml. se colocaron 15 o 5 ml de Ficoll/Hypaque (Ficoll-Paque Pharmacia, Uppsala Sweden). La sangre diluida (35ml) se dispensó sobre el Ficoll/Hypaque, evitando romper el gradiente. En el caso de las muestras de ganglios sin tumor macroscópico, 10 ml de la suspensión celular se dispensaron sobre los 5 ml de Ficoll/Hypaque en tubos cónicos de 15 ml. La suspensión de células de los ganglios con tumor macroscópico, en caso de que un porcentaje mayor al 50% del ganglio estuviera libre de tumor) fueron procesadas utilizando un gradiente discontinuo de Ficoll/Hypaque; en tubos cónicos de 15 ml. Se colocaron 5 ml de Ficoll/Hypaque no diluido, seguido de 5 ml. de Ficoll/Hypaque al 75% (3 volúmenes de Ficoll y 1 volumen de RPMI), dispensando finalmente la suspensión celular. Las muestras fueron centrifugadas a 300 xg durante 30 minutos sin utilizar freno en la centrifuga Boyum A 1968

## PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

### **COLECCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES.**

Se obtuvo la capa intermedia ("buffy coat") utilizando una pipeta estéril. Esta se transfirió a un tubo cónico. Las células mononucleares se resuspendieron con un volumen de 25 ml de PBS y se centrifugaron 10 minutos a 300g, sin utilizar freno, el sobrenadante fue decantado y el botón celular resuspendido. El procedimiento se repitió 3 veces, al final de lo cual se procedió a contar las células utilizando azul trypan, ajustando el número de células requerido para los diferentes ensayos.

### **CULTIVO CELULAR, CONDICIONES DE CULTIVO**

Para aquellos ensayos en los cuales se requirió cultivo, las células mononucleares fueron incubadas en medio RPMI 1640, suplementado con aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio, penicilina, estreptomina y 10% de suero bovino fetal (FCS) (todo de GIBCO, Grand Island NY). La incubación se llevó a cabo a 37 ° C en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>. El tiempo máximo de cultivo empleado fueron 72 hrs.

## INMUNOTIPIFICACION

La inmunotipificación se realizó obteniendo las células mononucleares mediante gradiente de Ficoll/Hypaque (ganglios) o bien, lisando los eritrocitos y marcando directamente los leucocitos (este último se utilizó en algunas muestras de sangre). Se ajustó la concentración celular a  $5 \times 10^5$  en 100  $\mu$ l de RPMI, colocándose en tubos de 12x75 mm (Beckton Dickinson) rotulados con el número de muestra y el anticuerpo a emplearse. A cada tubo se añadió 1  $\mu$ g/ml del anticuerpo correspondiente y fueron centrifugados a 1000 rpm por 5 minutos, estos se colocaron en hielo y se incubaron durante 30 minutos. Posteriormente, las células fueron lavadas en dos ocasiones con PBS y finalmente resuspendidas en 500  $\mu$ l de PBS/2% formaldehído. Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta el momento de analizarse en el citómetro. Para cada análisis se tuvo un control negativo (células sin anticuerpo y/o fluorescencia) y control de Isotipo (células más el fluorocromo correspondiente para los anticuerpos utilizados) <sup>Holmes K 1991</sup>.

## CITOMETRIA DE FLUJO

La Citometría de Flujo incluye un sistema de flujo que expone a las células de la muestra a un haz de luz excitador en una sola fila. Se recolecta la luz y cualquier fluorescencia emitida por esta interacción es detectada, así como el uso de colorantes para teñir moléculas intracelulares específicas; convirtiéndose estas en señales eléctricas, para su posterior análisis brindando información cuantitativa sobre las características específicas de la célula en estudio.

Mediante la Citometría se pueden realizar medidas físicas y químicas. a) Las medidas físicas son: tamaño, volumen, índice de refracción, viscosidad, granularidad; y b) las medidas químicas son contenido de ADN y ARN, proteínas, enzimas, etc. A partir de una suspensión celular, en el citómetro de flujo se pueden analizar diversas medidas de manera simultánea a velocidad de más de 5000 cél/seg.

La combinación de fluorocromos acoplados a un anticuerpo permite que al utilizar dos ó más colores acoplados a un anticuerpo particular, se pueda analizar en forma simultánea la presencia de varios (2-4) anticuerpos en células individuales.

El análisis de las muestras se realizó en un FACSsort equipado con un Laser de 15 mW de argón, enfriado con aire, de 488nm. El equipo fue calibrado utilizando perlas CALBRITE™ y ajustado utilizando el programa AutoCOMP™ (Todo Becton-Dickinson, San Jose California). El tamaño y la granularidad fueron los parámetros inicialmente utilizados para la localización de las poblaciones de linfocitos. En los casos en los que se identificaron más de una población celular, el análisis de cada una de ellas se realizó por separado. Los distintos fluorocromos fueron leídos utilizando los siguientes filtros, 518 nm (fluorescencia verde), 560 nm (fluorescencia naranja) and 650 nm (fluorescencia rojo). Se utilizó una compensación electrónica para eliminar la fluorescencia superpuesta. Los resultados de 10

## PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

000 eventos fluorescentes detectados se mostraron en escala logarítmica de 4 decenas, utilizando el citómetro Beckton Dickinson FACSort conectado a una computadora Hewlett-Packard 340, el análisis se realizó utilizando el programa LYSYS II software (Becton Dickinson Immunocytometry systems). En el caso de ganglios linfáticos, el resultado fue expresado como la media del porcentaje +/- desviación estándar (SD). Los obtenidos de células mononucleares se reportaron como números absolutos de células/mm<sup>3</sup> Yokoyama 1991.

### PROCEDIMIENTO

La suspensión celular se pasó a través de una boquilla en un flujo rodeado de solución salina o agua. La vibración de la punta de la boquilla originó que el flujo se rompiera en una serie de gotas, cuyo tamaño permitió el paso de una sola célula. Las células marcadas con distintos fluorocromos se excitaron por un haz de luz Láser, la cual emitió señales fluorescentes que fueron cargadas eléctricamente en un campo de alto voltaje entre placas de reflexión, separándose así en tubos colectores Yokoyama 1991.

### CALIBRACIÓN

En un tubo se añadió 1 gota de microesferas sin marcar (blanco) + 1ml de PBS, al siguiente tubo 1 gota de cada una de las microesferas con los distintos fluorocromos empleados + 1ml de PBS, se agitaron suavemente con un vortex por unos segundos y se ingresaron al programa AutoCOMP. Mediante este procedimiento se ajusto el voltaje de los tubos multiplicadores (tubo del blanco), se compensaron las fluorescencias y se probó la sensibilidad utilizando el tubo 2. Una vez que se realizó esto, se procedió a leer las muestras.

## IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

Los estudios de células dendríticas han sido difíciles debido a la baja frecuencia en sangre y en ganglios linfático no estimulados, es necesaria la utilización de una serie de marcadores y estrategias encaminadas a la identificación de estas células. CD123 identifica CD generadas a partir de progenitores CD34+ y a partir de células de Langerhans. Una segunda población de células puede ser identificadas por ser CD11c<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> lin<sup>dim/negativa</sup>. Estas células dendríticas se encuentran en centros germinales, están presentes también en sangre y son idénticas a las células dendríticas CD33<sup>bright</sup>CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>.

En este estudio se trataron de identificar dos tipos de células dendríticas CD123+ y CD11c+. Desde el punto de vista técnico, otras células linfoides expresan estos marcadores, ambos tipos celulares son DR+. La identificación de células dendríticas dependió de la baja expresión de algunos marcadores de superficie.

1. Se seleccionaron poblaciones celulares por tamaño y granularidad
2. Se identificaron células lin+DR+/lin-DR+
3. Fueron seleccionadas células lin-
4. Se identificaron las células seleccionadas (lin-) y fueron analizadas utilizando CD123 y CD11c.

## INICIO DEL EQUIPO Y LIMPIEZA DEL CITÓMETRO

Al encender el equipo se siguió el siguiente orden: encendido del regulador, encendido del FACS, seguido de la computadora, el monitor y finalmente la impresora.

## PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

Al término del trabajo diario se realizó limpieza del equipo y en forma mensual en forma profunda .

### ENSAYO DE PROLIFERACION

La capacidad para proliferar en respuesta a Fitohemaglutinina de las células mononucleares de sangre y de células obtenidas de ganglios linfáticos fue evaluada utilizando un método colorimétrico no radiactivo.

El XTT (sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6nitro) benzene sulfonic acid hydrate) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Germany), es una sal de tetrazolium utilizada para la cuantificación de células viables. El XTT es metabolizado por células activas formando un colorante soluble en agua; la sal de formazan, la cual emite una longitud de onda detectada a 460 nm. Este ensayo fue descrito por Scudeiro en 1988 para cuantificar, mediante espectrofotometría, crecimiento y viabilidad celular en ausencia de radioactividad.

Al metabolizarse el XTT cambia el color amarillo de este, por un color naranja característico del formazan. Este cambio únicamente ocurre en células viables. Un aumento en el número de células, resulta en un aumento de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial en la muestra, hecho que incrementa la cantidad de formazan formado.

#### Metodología:

Se colocaron  $0.5 \times 10^6$  células mononucleares en 80  $\mu$ l en RPMI completo y se incubaron por duplicado durante 72 hrs. en placas de cultivo de 96 pozos, fondo plano, en presencia de concentraciones variables ( 0, 0.01, 0.1, 1.0 and 10  $\mu$ g/ml) de fitohemaglutinina (PHA, Murex Biotech Limited, Dratford, England) [20  $\mu$ l]. Al cabo de este periodo, 50  $\mu$ l of XTT (sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6nitro) benzene

## MATERIALES, REACTIVOS Y MÉTODOS

sulfonic acid hydrate) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Germany) se añadieron a cada pozo e incubaron las placas durante 4 hrs. Finalmente la incorporación del colorante se leyó a 450nm utilizando un lector de ELISA (Tecan Spectra Classic, Austria). Los resultados fueron expresados como la media +/- desviación estándar (DE).

### CICLO CELULAR

El método empleado se basa en la obtención de núcleos celulares mediante la técnica de digestión enzimática y un detergente, utilizando un fluorocromo con afinidad por el ADN como Ioduro de Propidio (IP). Este se intercala en la doble cadena de ADN y es excitado por un láser de 488 nm. La enzima RNasa se emplea para degradar el ARN, quedando únicamente la doble cadena de ADN, dentro de la cual se introduce el IP. La emisión roja del IP se encuentra alrededor de los 600 nm. Las células empleadas pueden provenir ya sea de una suspensión celular o bien de tejidos frescos ó en cortes de parafina <sup>Nogush1991, Shankey 1993</sup>

### RECOLECCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

Se emplearon de  $5 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$  células por muestra que fueron almacenadas en tubos de 25x75mm. A cada uno de los tubos se les adicionó 1 ml de etanol al 80% frío se taparon y se conservaron a 4°C hasta su procesamiento.

### PROCEDIMIENTO.

Las células fijadas en etanol se lavaron 2 veces con PBS pH 7.2-7.4 durante 10 minutos a 1200 r.p.m. Una vez lavadas se les adiciono a cada tubo 100µl de la solución A. Se agitó suavemente e incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Al término se agregó 80µl de la solución B, se agitó suavemente e incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los tubos fueron cubiertos con papel aluminio y colocados en hielo.



## RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Posteriormente se agregaron 80µl de la solución C, se agitaron suavemente e incubaron 10-15 min. a 4°C. Para ser analizados por citometría de flujo en un lapso no mayor a 2 hrs  
Nogush 1991, Shankey 1993

### ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS EN EL CITÓMETRO DE FLUJO.

Para el análisis de las muestras se empleo un Citómetro de Flujo FACSsort Becton Dickinson equipado con un láser de argón que emite a 488 nm de longitud de onda. Para la adquisición de las muestras se emplea el software Cell Quest y para el análisis se emplea el software Mod Fitt. Se ajustaron las condiciones de voltaje de los fotomultiplicadores y amplificadores para los parámetros de intensidad de FL2 (560 nm), duración de centelleo de fluorescencia (FL2-W) y el área bajo la curva de FL2/FL2W (FL2-A). Se analizaron un mínimo de 20,000 eventos por muestra, a velocidad baja y sin utilizar vortex.

Para el análisis se realizaron histogramas de Contenido de ADN (FL2-A) contra el número de células y los porcentajes de las poblaciones en etapas G0/G1, S, y G2+M son calculados con el software Mod Fitt.  
Nogush 1991, Shankey 1993

### HISTOLOGIA E INMUNOHISTOQUIMICA

#### HISTOLOGIA

El fragmento ganglionar fijado en formol, fue llevado al departamento de patología en donde fue incluido en parafina. El bloque de parafina fue cortado cada 4-5 micrones y colocado en laminillas. Las laminillas fueron teñidas con hematoxilina y eosina y analizados en forma rutinaria por el patólogo, analizando:

- a. Reemplazo tumoral
- b. Ganglios linfáticos metastásicos

## REACTIVOS, MATERIAL Y MÉTODOS

c. Hiperplasia histosinusoidal etc.

### **INMUNOHISTOQUIMICA**

Laminillas de vidrio fueron lavadas y cubiertas con poli-L-lisina, se colocó una muestra del tejido en cada laminilla, se analizaron 4 laminillas por ganglio. La muestra de ganglio incluida en parafina fue desparafinada al hornear las laminillas a 60°C por una hora, al cabo de lo cual las laminillas fueron re-hidratadas. La actividad de peroxidasa endógena fue bloqueada con peróxido de hidrógeno, durante cinco minutos., después de lo cual las laminillas fueron lavadas en baño-buffer. El excedente de agua se eliminó y se incubaron las laminillas con solución bloqueadora, la muestra se incubó por cinco minutos después de lo cual se lavaron nuevamente.

Se utilizaron anticuerpos pan T (CD45) y pan B (CD20) y control negativo (DAKO). El anticuerpo se incubó por 30 minutos en un ambiente húmedo después de lo cual nuevamente fueron lavadas las laminillas. Al finalizar, estas fueron incubadas nuevamente con el segundo anticuerpo peroxidado, posteriormente se lavaron y se incubaron 10 minutos más con estreptavidina, se lavaron las laminillas y finalmente se incubaron por 10 minutos con el substrato-cromógeno. La contra-tinción se llevó a cabo con hematoxilina-eosina, incubándose por 2 minutos. Al finalizar el proceso, se montaron las laminillas en medio acuoso a base de glicerina.

### **ESTADISTICA**

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa InStat GraphPad software. Las medianas para cada uno de los ensayos realizados fueron comparados con el control

**PACIENTES, MATERIAL Y METODOS**

respectivo y analizados utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. Fueron consideradas diferencias estadísticamente significativas aquellas  $> 0.05$

## MATERIALES

### ANTICUERPOS MONOCLONALES

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales para caracterizar las subpoblaciones de linfocitos T: CD2, CD3, CD4 y CD8, marcados con FITC, RPE o RPE-Cy5 (DAKO Carpenteria CA). Anticuerpos que detectan los receptores de célula T para el reconocimiento del antígeno  $\alpha/\beta$  y  $\gamma/\delta$  (CALTAG Burlingame CA). Anti - CD45RO-RPE, CD45RA-FITC (CALTAG Burlingame CA) se utilizan para determinar la proporción de células naïve y de memoria. La presencia de células asesinas naturales (NK) se demostró con anticuerpos anti-CD16, CD56 ((DAKO FITC o RPE) y CD57-FITC (Serotec, Kidlington, Oxford, England) se utilizó para evaluar células NKTs. Los linfocitos B fueron detectados utilizando anti -CD19-RPE (DAKO). En algunos casos fue posible identificar células dendríticas activadas, utilizando CD123, CD11c, HLA-DR y Lin 1 ( CD3, CD14, CD16,CD19,CD20, CD56) [Beckton.Dickinson] Se utilizaron controles negativos que incluyeron: IgG1-FITC, IgG1-RPE e IgG1-RPE/CY5 (DAKO). IgG2b RPE o FITC (CALTAG)

**PACIENTES, MATERIAL Y METODOS****CONTROLES NEGATIVOS:****a. Triple Fluorescencia. IgG1/FITC (murina), IgG1/RPE (murina), IgG1/RPE-Cy5(murina) [X 0956 DAKO Carpenteria CA.]**

Este control negativo para citometría de flujo es la combinación de los siguientes anticuerpos monoclonales:

IgG1/FITC (Anticuerpo Monoclonal murino, clono DAK-GO1, conjugado con el isómero 1 de isotiocianato de fluoresceína) IgG1/RPE (Anticuerpo Monoclonal murino, clono DAK-GO1, conjugado con R-Ficoeritrina)

IgG1/RPE-Cy5 (Anticuerpo Monoclonal murino, clono DAK-GO1, conjugado con un fluorocromo de transferencia de energía que consiste en el colorante CCY5 unido en forma covalente a R-ficoeritrina. La absorbancia de la energía luminosa de 488 nm emitida por RPE es transferida a Cy5 y se emite a 670nm).

**b.Control negativo conjugado con RPE-Cy5. IgG1 murino) [X 0955 DAKO Carpenteria CA.]** Anticuerpo Monoclonal murino, clono DAK-GO1, conjugado con un fluorocromo de transferencia de energía que consiste en el colorante CCY5 unido en forma covalente a R-ficoeritrina. La absorbancia de la energía luminosa de 488 nm emitida por RPE es transferida a Cy5 y se emite a 670nm.

**c. Control negativo conjugado con RPE. IgG1 murino[X 0928 DAKO Carpenteria CA.]**

Es un anticuerpo monoclonal (IgG1) murino purificado (clono DAK-GO1) conjugado a R-ficoeritrina.

**d.Control negativo conjugado con RPE. Fragmento F(ab')<sub>2</sub> de inmunoglobulina cabra-anti-ratón[R 0480 DAKO Carpenteria CA.]**

**PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS**

El anticuerpo utilizado para la conjugación con RPE fue absorbido en fase-sólida para remover anticuerpos que reaccionan en forma cruzada con inmunoglobulinas humanas y suero fetal bovino. El anticuerpo posteriormente se purifica por cromatografía de afinidad, utilizando semillas de agarosa recubiertas con inmunoglobulinas murinas. Es anticuerpo aislado por afinidad es degradado con pepsina y el fragmento  $F(ab')_2$  y aislado por filtración con gel. Finalmente el fragmento  $F(ab')_2$  se conjuga con RPE.

**e. Control negativo IgG1 murino conjugado con FITC. [X 0927 DAKO Carpenteria CA.].**

Es un anticuerpo (IgG1) monoclonal murino (clono DAK-GO1) conjugado con el isómero 1 de isotiocianato de fluoresceína

**f. Control negativo conjugado con FITC. Fragmento  $F(ab')_2$  de inmunoglobulina cabra-anti-ratón [F 0479 DAKO Carpenteria CA.].**

El anticuerpo utilizado para la conjugación con FITC fue absorbido en fase-sólida para remover anticuerpos que reaccionan en forma cruzada con inmunoglobulinas humanas y suero fetal bovino. El anticuerpo posteriormente se purifica por cromatografía de afinidad, utilizando semillas de agarosa recubiertas con inmunoglobulinas murinas. Es anticuerpo aislado por afinidad es degradado con pepsina y el fragmento  $F(ab')_2$  y aislado por filtración con gel. Finalmente el fragmento  $F(ab')_2$  se conjuga con FITC.

**g. Control negativo IgG 2b murino conjugado con FITC o RPE. [CALTAG Lab. Burlingame CA.].**

**h Control negativo IgM murina conjugado con FITC [MCA 692F Serotec Kidlington, Oxford, England.].**

## PACIENTES, MATERIAL Y METODOS

### 2. CARACTERIZACION

#### A. DAKO. Carpenteria CA. USA.

##### a. ANTI-CD2 FITC (Clono MT910+), ANTI-CD19 RPE (Clono HD37) (FR894) (ISOTIPO IgG Kappa)

Anti CD2, MT910, es un anticuerpo monoclonal murino conjugado con el isómero 1 de isotiocianato de fluoresceína. Este anticuerpo reacciona con la mayoría de las células T en diferentes tejidos normales y neoplásicos. El antígeno CD2 es una glicoproteína de 50 kDa, monómero, que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas, se encuentra presente en la mayoría de las células T circulantes, algunos monocitos y células NK. Esta molécula es el receptor (LFA-2) responsable de la unión de eritrocitos a carnero y la formación de rosetas <sup>Howard 1981</sup>.

Anti-CD19, es un anticuerpo monoclonal (IgG1) murino purificado conjugado a R-ficoeritrina. HD37, CD19, detecta células B en diferentes tejidos. CD19 es una glicoproteína de 90 kDa que reacciona con células B en diferentes etapas de su maduración. El gen de CD19 se ha clonado, el antígeno es una proteína transmembranal al menos dos dominios extracelulares parecidos a las inmunoglobulinas. Los dominios intracitoplásmicos tienen semejanza con dos proteínas codificadas por el virus de Epstein-Barr y con el oncogene NT1 <sup>Stamenkovic 1988</sup>.

##### b. ANTI CD3 RPE y RPE-Cy5 (Clono UCHT1) (R 0810, C 7067) (Isotipo IgG kappa)

Anti CD3 es un anticuerpo monoclonal murino conjugado con R-ficoeritrina y con un conjugado con un fluorocromo de transferencia de energía que consiste en el colorante CCY5 unido en forma covalente a R-ficoeritrina. La absorbancia de la energía luminosa de 488 nm emitida por RPE es transferida a Cy5 y se emite a 670nm.)

## PACIENTES, MATERIAL Y METODOS

El anti- CD3 reacciona con el antígeno CD3 presente en la mayor parte de las células T. El RCT/ $\zeta$ /CD3 es una compleja estructura presente en la superficie de la célula T. Este consiste en dos heterodímeros del receptor;  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$  y un homodímero invariante;  $\zeta$ . CD3 esta constituido por tres cadenas invariantes con masas moleculares que varían de 18 a 28 kDa.  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ . La mayoría de los anticuerpos están dirigidos contra la cadena de 20 kDa.  $\epsilon$  Tunnacliffe 1989

CD3 esta asociado al receptor para antígeno de la célula T en la superficie celular <sup>Clevers 1988</sup>. El complejo CD3 y el homodímero  $\zeta$ , transducen señales de activación al interior celular posterior al reconocimiento del antígeno a través de su receptor. CD45, una proteína-tirosina,-fosfatasa es un potente regulador de las señales de transducción inducidas por el complejo CD3 <sup>Clark 1989</sup>.

CD3 se detecta en timocitos tempranos, su presencia probablemente representa uno de los primeros signos de diferenciación T <sup>Campana 1987</sup>. En timocitos corticales esta presente en forma intracitoplásmica <sup>Beverley 1981</sup> para posteriormente aparecer en la superficie celular <sup>Swerdlow 1988</sup>. Este anticuerpo reacciona con la mayoría de las células T e diferentes tejidos, normales y neoplásicos <sup>McMichael 1987</sup>.

**c. TRIPLE COLOUR REAGENT. ANTI-CD8/FITC (DK25+), ANTI-CD4/RPE (MT310+), ANTI-CD3 RPE/Cy-5 (UCHT1) [TC 641]; ANTI- CD4/RPE-Cy5 (MT310+) [C 7069]; ANTI-CD8/RPE (DK25+) [R0806]. IgG1 Kappa.**

Anti CD3, es un anticuerpo monoclonal murino conjugado con un conjugado con un fluorocromo de transferencia de energía que consiste en el colorante CCY5 unido en forma covalente a R-ficoeritrina. La absorbancia de la energía luminosa de 488 nm emitida por RPE es transferida a Cy5 y se emite a 670nm.). Reconoce células T y sus características fueron descritas con anterioridad.



## PACIENTES, MATERIAL Y METODOS

Anti CD4 es un anticuerpo monoclonal murino conjugado con R-ficoeritrina con un conjugado con un flourocromo de transferencia de energía que consiste en el colorante CY5 unido en forma covalente a R-ficoeritrina. La absorbancia de la energía luminosa de 488 nm emitida por RPE es transferida a Cy5 y se emite a 670nm.). El antígeno CD4 es una glicoproteína de 59kDa, presente en la mayoría de células T- ayudadoras, que también se ha descrito como receptor para el virus VIH<sup>Ledbetter 1981, Dalglish 1984</sup>. La región extracitoplásmica se asocia a las moléculas clase II y la región intracitoplásmica se asocia a p56<sup>lck</sup>. Esta molécula regula la función del complejo CD3/RCT<sup>Biddison 1983, Veillette 1989</sup>.

CD4 aparece tempranamente durante la diferenciación intratímica de los timocitos, inicialmente se co-expresa con CD1 y CD8 en los timocitos corticales.<sup>Reinherz 1980</sup>. Posteriormente, mediante el proceso de selección negativa estos expresan CD4 o CD8. CD4 también es expresado por monocitos y macrófagos y algunas células malignas de origen T<sup>Wood 1983, Bournsell 1981</sup>.

Anti CD8 es un anticuerpo monoclonal murino conjugado con R-ficoeritrina y con el isómero I de isotiocianato de fluoresceína. La cadena  $\alpha$  de CD8, es una proteína de 32kDa, presente en linfocitos T supresores/citotoxos<sup>Ledbetter 1981</sup>. Es receptor de moléculas Clase I y su región intracitoplásmica se une a la tirosina cinasa p56<sup>lck</sup>. Esta molécula regula la función del complejo CD3/RCT<sup>Biddison 1983, Veillette 1989</sup>. En el timo se encuentra presente en la mayoría de los linfocitos corticales.

**d.ANTI – RECEPTOR Fc GAMMA II, CD16/FITC (Clono DJ 130c) [F 7011]. IgG1 Kappa.**

CD16 es un anticuerpo monoclonal murino, conjugado con el isómero I de isotiocianato de fluoresceína. CD16 es una glicoproteína de 45-75 kDa (idéntico al receptor Fc de baja afinidad para el complejo IgG=Fc $\gamma$ RIII) se expresa en células NK, neutrófilos y basófilos.

## PACIENTES, MATERIAL Y METODOS

Existe como una proteína anclada a glicosil-fosfatidil (FcγRIII<sub>PMN</sub>) en células polimorfonucleares (PMN) y como una proteína transmembranal (FcγRIII<sub>NK</sub>) en células NK Ueda 1989.

### **e.DUAL COLOUR ANTI-CD3/FITC (UCHT1+), ANTI-CD56/RPE (MOC-1)[FR790] IgG1 Kappa.**

Anti CD3, es un anticuerpo monoclonal murino conjugado con el isómero 1 de isotiocianato de fluoresceína,

Anti CD56, es un anticuerpo monoclonal murino conjugado con R-ficoeritrina.. Se expresa en un subtipo de linfocitos capaces de lisar blancos no restringidos por el CPH (Schubert; 1989). CD56 es idéntica a la molécula de adhesión (N-CAM) involucrada en adhesiones heterotópicas célula-célula. Tiene cuando menos tres isoformas, el centro polipeptídico de CD56 es la isoforma de 140kDa de NCAM, la cual se glicosila de diferentes formas para producir las proteínas maduras (masa molecular de 135 a 220 kDa). No participa en forma directa en la función citotóxica de las células NK, sin embargo, al parecer media la adhesión homotópica entre las células NK y líneas tumorales Cunningham 1987.

## PACIENTES, MATERIAL Y METODOS

**B. CALTAG**

**a. ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI RECEPTOR DE CELULA T  $\alpha/\beta$ - RPE.  
(Clono BM031) [MHAB04]. Isotipo IgG2b.**

Anti  $\alpha/\beta$ , es un anticuerpo monoclonal murino conjugado con R-ficoeritrina.

**b. ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI RECEPTOR DE CELULA T  $\gamma/\delta$  RPE.  
(Clono 5<sup>o</sup>6.E9) [MHGD04]. Isotipo IgG1.**

Anti  $\gamma/\delta$ , es un anticuerpo monoclonal murino conjugado con R-ficoeritrina.

**c. ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-CD45RA/FITC. (Clono MHCD45RA01).  
Isotipo IgG1.**

Anti CD45RA es un anticuerpo monoclonal murino conjugado con el isómero I de isotiocianato de fluoresceina,

**d. ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-CD45RO/RPE (Clono MHCD45RO04)  
Isotipo IgG2a.**

Anti CD45RO un anticuerpo monoclonal murino conjugado con R-ficoeritrina.

## PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

### C. SEROTEC

#### a. ANTI CD57/FITC (ClonoTB01) Isotipo IgM.

Anti-CD57 es un anticuerpo murino conjugado con el isómero I de isotiocianato de fluoresceína. Anti-CD57 es purificado a partir de ascitis por cromatografía de intercambio de iones. Los ratones (Balb/c) de los cuales se obtiene la ascitis son inmunizados con células humanas de neuroblastoma. El anticuerpo monoclonal se obtiene a partir de la fusión de bazos de BALB/c con la línea de mieloma P3.X63.Ag8652. CD57 se expresa en células NK y en un subtipo de células T.

## PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

**D. BECTON DICKINSON**

**a. Linage Cocktail 1(lin 1) (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56). FITC (Clono CCD3SK7,CD163G8,CD19SJ25C1,CD20 127[IgG<sub>1</sub> Kappa]. CD14 MφP9, CD56 NNCAM16.2 [IgG<sub>2b</sub> Kappa].340546**

Este cocktail, contiene clones de anticuerpos que en combinación identifican linfocitos T y B, monocitos, eosinófilos y neutrófilos. Las células dendríticas y los basófilos pueden ser identificadas del resto de las células por ser negativas al marcador.

**b. CD11c 340544 APC**

CD11c reconoce monocitos y macrófagos. Es específico para la subunidad  $\alpha$ Mr 150-kDa del heterodímero CD11c/CD18, también conocida como CR<sub>4</sub>.

Clono S-HCL-3 se deriva de la hibridación del mieloma murino con células obtenidas de células de ratón CD1 inmunizadas con preparaciones membranales de leucemia de células peludas.

**c. CD123(Anti IL-3R $\alpha$ ) PE30545. Clono9F5.**

El anticuerpo CD123 se une a la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-3. Reconoce en forma selectiva, células COS transfectadas con IL-3R $\alpha$ . El CD123 se expresa en una subpoblación de células dendríticas de sangre, en un subtipo de células progenitoras, monocitos, eosinófilos y basófilos.

**PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS****d. HLA-DR PerCP 347364. Clono L243**

El anticuerpo contra HLA-DR reconoce antígenos clase II del CPH, reacciona con un epítoto no polimórfico de HLA-DR y tiene reacción cruzada con moléculas HLA-DP y HLA-DQ.

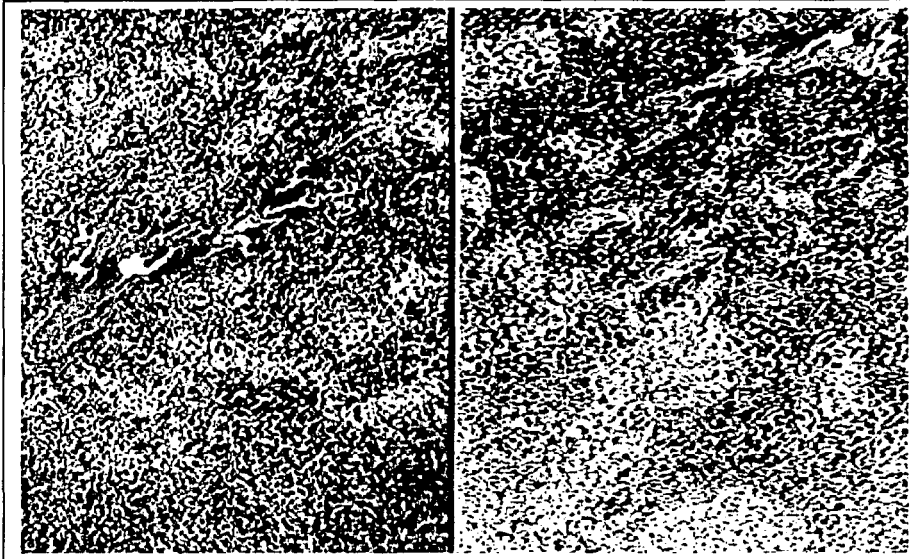
# **RESULTADOS**

## **HISTOLOGIA E INMUNOHISTOQUIMICA**

Los ganglios obtenidos de pacientes sin cáncer mostraron un patrón histológico caracterizado por folículos prominentes, descrito como hiperplasia folicular. Por razones éticas, ganglios “normales” no hiperplásicos no fueron estudiados.

El análisis microscópico de los ganglios linfáticos obtenidos de pacientes con cáncer epidermoide de cabeza y cuello mostró distintas alteraciones; La mayor parte de los ganglios linfáticos eran voluminosos y mostraban cambios caracterizados por folículos prominentes, centros germinales que ocupaban la mayor parte del folículo. Las zonas correspondientes a los linfocitos T también mostraban una mayor densidad celular y en algunas zonas alternaban con sinusoides dilatados que contenían cantidades variables de macrófagos morfológicamente activados (Figura 56).



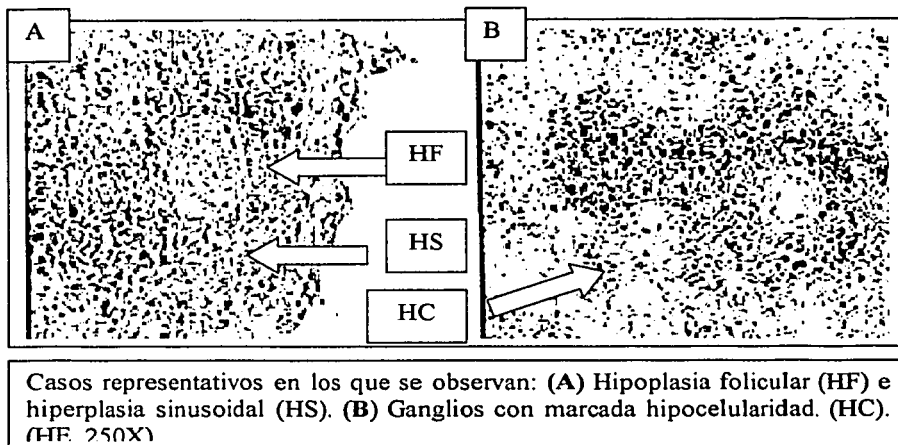
**FIGURA 56. GANGLIOS HIPERPLÁSICOS EN NEOPLASIAS DE CYC**

Evaluación histológica de ganglios de pacientes con neoplasias de cabeza y cuello. La figura muestra dos casos representativos de ganglios teñidos con hematoxilina-eosina, en los que se observa hiperplasia histiosinusoidal (sinusoides dilatados).

En algunos de los ganglios cercanos al sitio del tumor primario se observó una disminución en la población de linfocitos, frecuentemente los folículos fueron de menor tamaño (Figura 57 A), en comparación con los de los ganglios regionales obtenidos de sitios más distales del tumor (Figura 56). Así mismo, los centros germinales de los ganglios cercanos mostraron una mayor hipocelularidad (Figura 57 B). Con frecuencia se observaron algunas células adiposas en la periferia y un incremento en tejido conectivo (Datos no mostrados).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

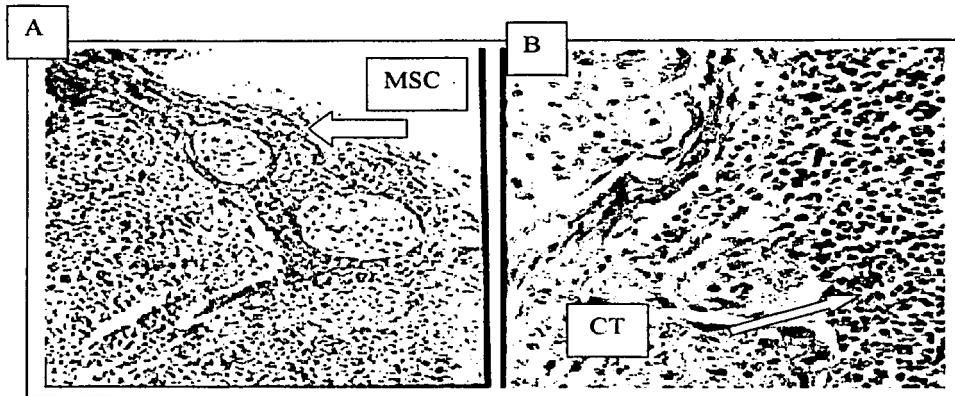
**FIGURA 57. HIPOPLASIA FOLICULAR E HIPOCELULARIDAD EN GANGLIOS REGIONALES**



Finalmente, algunos ganglios (53%) mostraron metástasis. La localización de las células neoplásicas dentro del ganglio fue variable; En ocasiones se encontraron confinadas a los sinusoides, en otros, estas lo infiltraban difusamente, sustituyendo parcial o completamente las estructuras normales (Figura 58) Es importante enfatizar que sólo fueron incluidos en el análisis ganglios en los que aproximadamente de 50 a 70% de estos estaba libre de tumor.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**FIGURA 58. PRESENCIA DE METÁSTASIS EN GANGLIOS REGIONALES DE CYC**

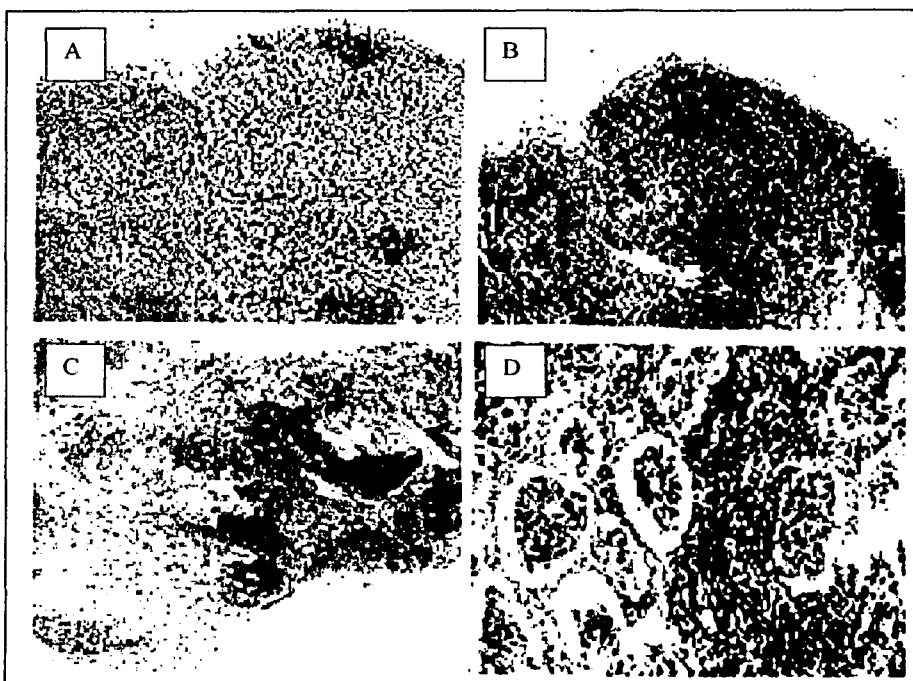


(A) metastasis subcapsular e hiperplasia sinusoidal (nivel I), (250X, HE). (B) Contactos celulares entre el tumor y las células linfoides (300X, HE).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los ganglios axilares de pacientes con cáncer de mama, mostraron en forma adicional a lo mencionado en los de cabeza y cuello, un porcentaje superior de infiltración grasa. Algunos ganglios obtenidos presentaban así mismo fibrosis, la cual fue interpretada como efecto secundario a la quimioterapia. Es muy importante mencionar que a diferencia de los ganglios obtenidos de pacientes con otras neoplasias, y por la importancia en el pronóstico del número de ganglios positivos en estas pacientes, solo se analizó un fragmento ganglionar (Figuras 59 A, 59 B, 59C y 59D).

#### FIGURA 59. HISTOLOGIA DE GANGLIOS EN CANCER DE MAMA



Muestras representativas de ganglios axilares obtenidos de pacientes con cáncer de la mama que muestran : (A) Ganglio con hiperplasia. (B) Hiperplasia Folicular (250X, HE). (C) Hiperplasia histiosinusoidal (250X, HE). (D) Contactos celulares entre trombos tumorales y células linfoides (300X, HE)

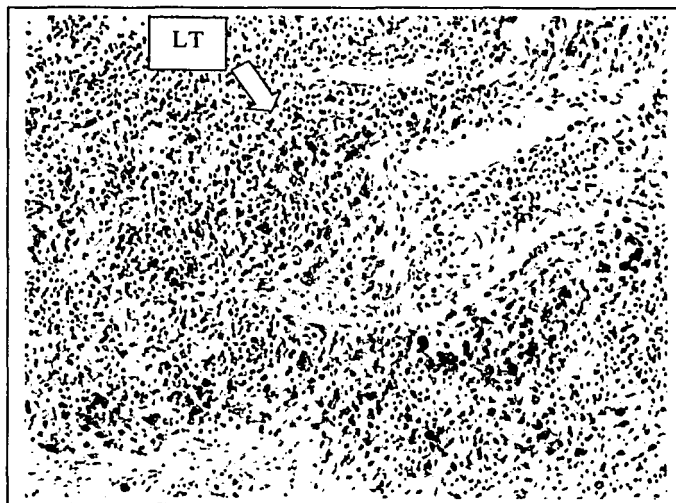
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los ganglios pélvicos en general presentaban macroscópicamente un mayor tamaño, las características histológicas de estos en los casos sin metástasis era un patrón de hiperplasia histiosinusoidal, no se apreciaron ganglios con hipoplasias foliculares ni hipocelulares como en los tumores anteriormente descritos.

En conclusión, mediante el análisis histológico no se pudo identificar un patrón específico de interacción entre las células tumorales y las células residentes de los ganglios linfáticos analizados.

Algunos cortes representativos fueron seleccionados y se realizó análisis inmunohistoquímico. Los resultados de estos confirmaron las observaciones histológicas de hipoplasia folicular en algunos casos, sin embargo, no se documentaron alteraciones en la distribución ganglionar de células T o B (Figura 60).

**FIGURA 60. INMUNOHISTOQUIMICA**



Ganglio linfático representativo del análisis inmunohistoquímico utilizando CD45. Se muestra la presencia de células positivas (T), con una distribución ganglionar preservada.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

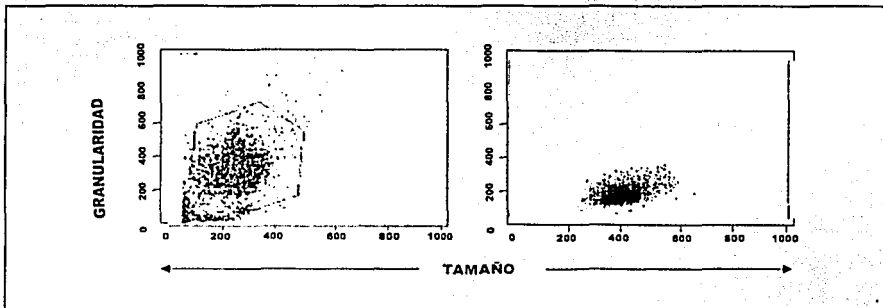
## INMUNOFENOTIPO GANGLIONAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO

### TAMAÑO CELULAR

#### Controles sin cáncer

El análisis inicial evaluando tamaño y granularidad mostró que las células obtenidas de estos ganglios se agrupaban formando un grupo homogéneo localizado entre 200 and 600-FSC-HFSC-Height (escala lineal), Figura 61

**FIGURA 61. TAMAÑO Y GRANULARIDAD DE CMN GANGLIOS DE CONTROLES SIN CÁNCER**



Evaluación por citometría de flujo de tamaño y granularidad de células mononucleares de ganglios linfáticos de controles sin cáncer. Las células se encuentran agrupadas en un grupo homogéneo.

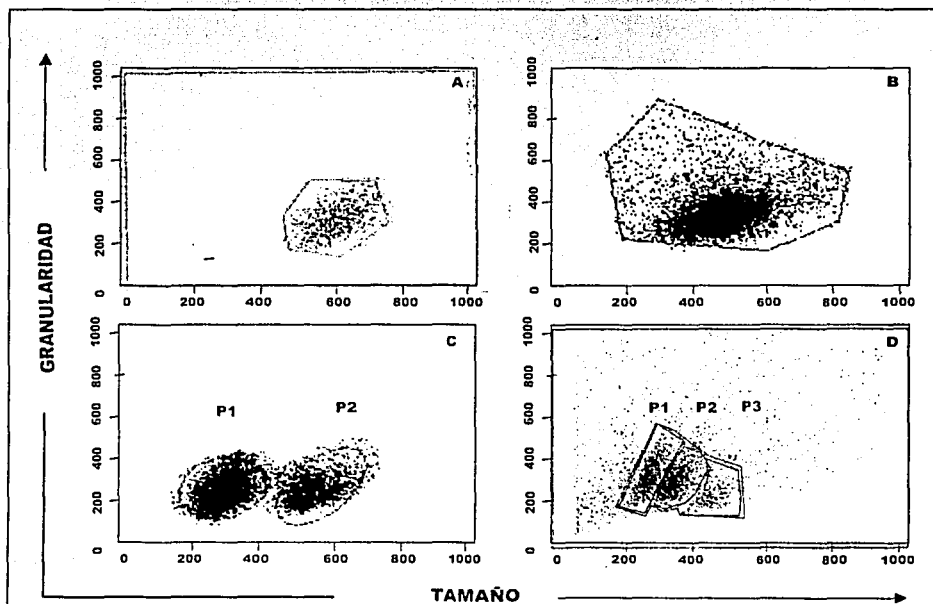
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Cáncer de cabeza y cuello

Al igual que en los ganglios controles, la mayoría de los pacientes (Figuras 62 A y 62 B), se agrupaban en un grupo homogéneo; sin embargo, el tamaño de las células de acuerdo a su localización en la gráfica fue mayor [localizado entre 300 and 700-FSC-HFSC-Height (escala lineal)]. En 13 ganglios (43%) de pacientes con cáncer de cabeza y cuello, dos o tres poblaciones fueron detectadas, las cuales serán referidas como P1, P2 (Figura 62 C), and P1, P2, P3 (Figura 62D).

El promedio de eventos detectados por el citómetro fue parecido en ganglios controles (5462.14 eventos), y en los ganglios de pacientes con cáncer (5963.52 eventos). Los ganglios con más de una población tuvieron un número mayor de eventos (~7378) que se encontraban distribuidos entre los diferentes grupos: P1 (3106), P2 (2507) and P3 (1765).

**FIGURA 61. TAMAÑO Y GRANULARIDAD DE CMN GANGLIOS DE PACIENTES CON CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO**



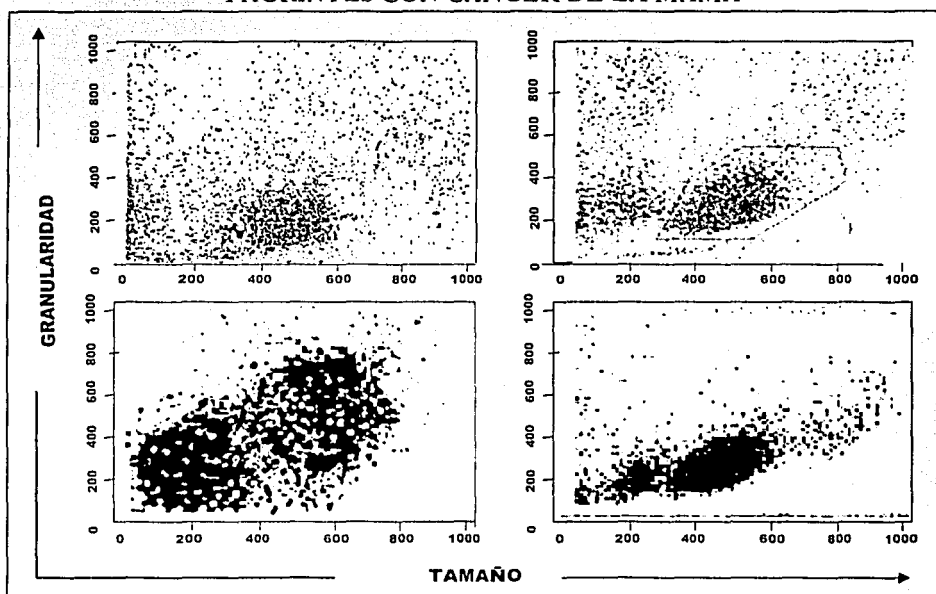
Evaluación por citometría de flujo de tamaño y granularidad de células mononucleares de ganglios linfáticos de pacientes con cáncer de CyC. (A) y (B). Las células se encuentran agrupadas en un grupo homogéneo. En algunos pacientes se encontró la presencia de dos, (C) [P1 y P2], o tres (D) poblaciones [P1, P2 y P3] definidas por tamaño y granularidad. La figura muestra datos representativos de cuatro pacientes diferentes.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Cáncer de Mama

Al igual que en los ganglios de pacientes con neoplasias epidermoides y controles sin cáncer, las células formaban un solo grupo relativamente homogéneo aunque de mayor tamaño y en menor porcentaje que el grupo de pacientes anteriormente descritos se pudieron identificar dos poblaciones celulares (Figuras 62 A, 62 B, 62 C, 62 D).

**FIGURA 62. TAMAÑO Y GRANULARIDAD DE CMN GANGLIOS DE PACIENTES CON CÁNCER DE LA MAMA**



Evaluación por citometría de flujo de tamaño y granularidad de células mononucleares de ganglios linfáticos de pacientes con cáncer de CyC. (A) y (B). Las células se encuentran agrupadas en un grupo. En algunos pacientes se encontró la presencia de dos, (C) [P1 y P2], o tres (D) poblaciones [P1 . P2 yP3] definidas por tamaño y granularidad. La figura muestra datos representativos de cuatro pacientes diferentes.

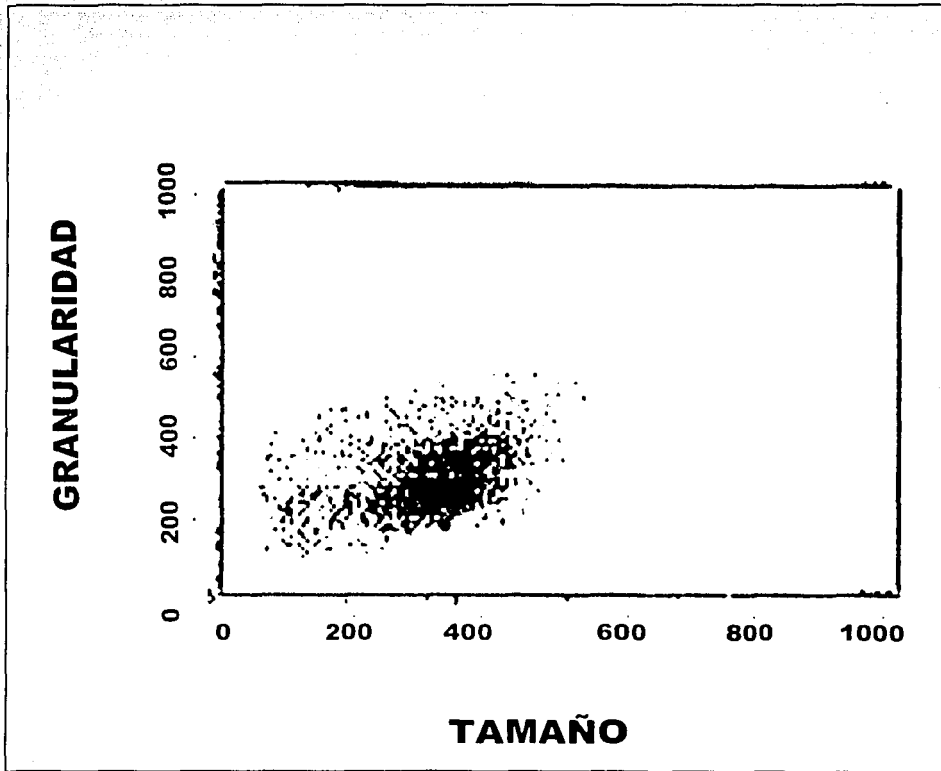
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Cáncer de Cérvix**

Todos los ganglios analizados formaban una población homogénea en tamaño y granularidad (Figura 63)

**FIGURA 63 TAMAÑO Y GRANULARIDAD DE CMN GANGLIOS DE PACIENTES CON CANCER DEL CUELLOUTERINO**



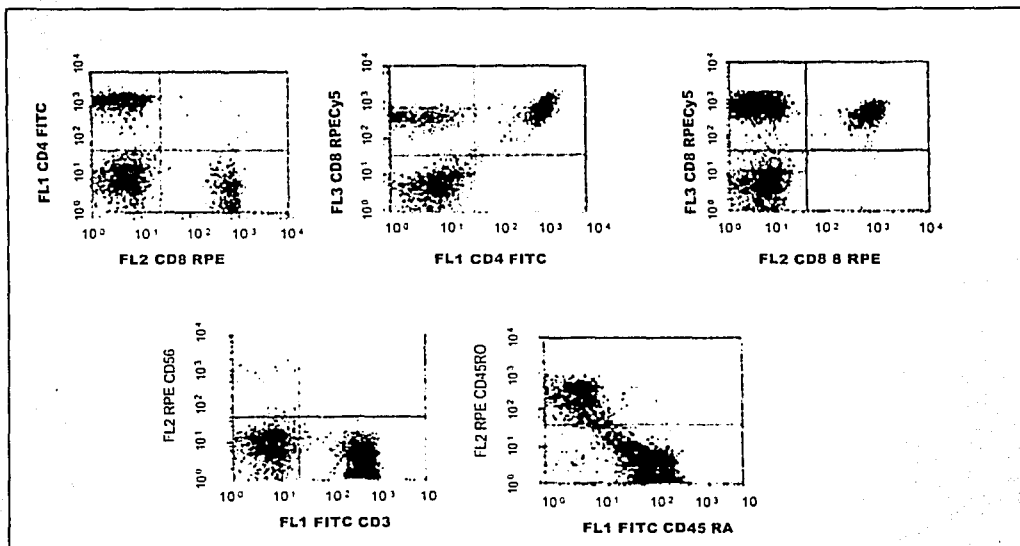
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## INMUNOFENOTIPO

### Controles sin cáncer

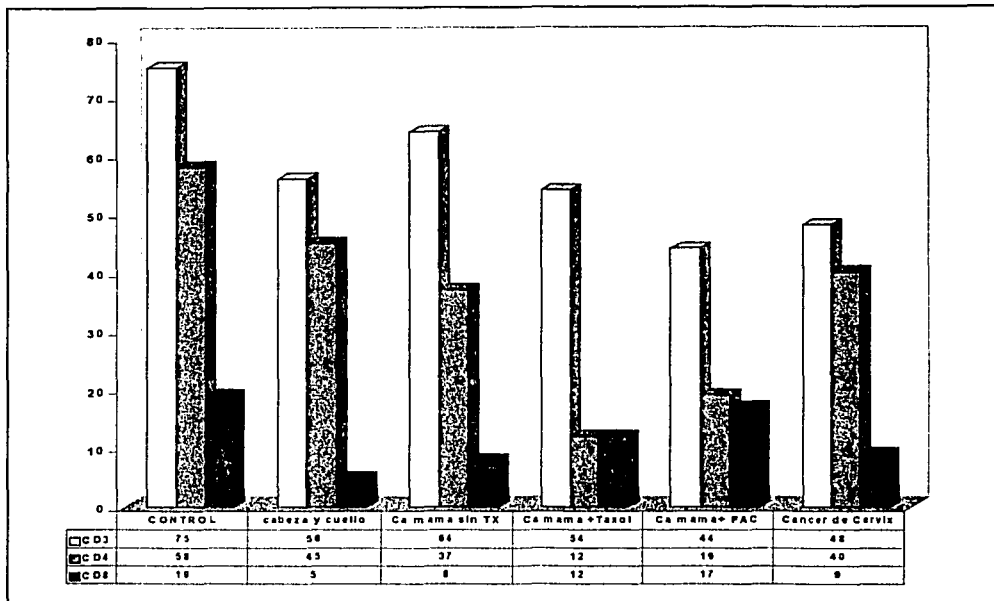
El análisis de la superficie de las células mononucleares obtenidas de ganglios controles mostró lo siguiente: células positivas para CD3/CD4 y CD8:CD3+ (76%), CD4+ (58%) y CD8+ (19%), Figuras 64 y 65 y una proporción CD4/CD8 de 3:1 (Tabla 8).

FIGURA 64. CARACTERÍSTICAS CITOFUOROMÉTRICAS DE CMN DE GANGLIOS CONTROL



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

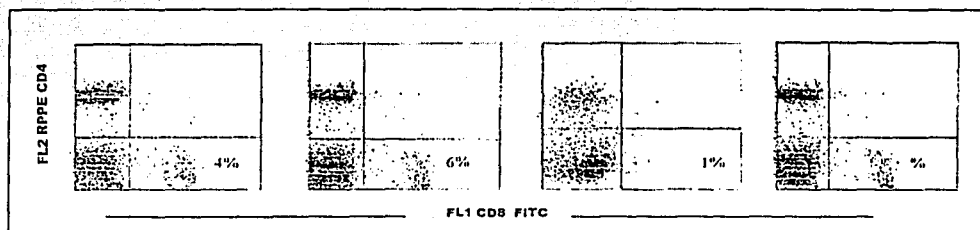
**FIGURA 65. DISTRIBUCIÓN DEL PORCENTAJE DE LAS DISTINTAS POBLACIONES DE LINFOCITOS EN CASOS Y CONTROLES**



## Cáncer de cabeza y cuello

Los ganglios linfáticos de pacientes con cáncer de cabeza y cuello mostraron una disminución no significativa de sus porcentajes (al compararlos con los controles) en células T CD3<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> (56% y 45%, respectivamente) (Figura 66 y Tabla 8); Sin embargo, el porcentaje de los linfocitos CD8<sup>+</sup> fue significativamente menor que en los controles (5%, P<0.001) e incluso que en ganglios obtenidos de pacientes con otros tipos de cáncer (Figura 66 y Figura 67). La proporción de células CD4/CD8 fue en consecuencia mayor de 9:1 (Tabla 8). Todas las localizaciones en este grupo de pacientes mostraron cambios similares, sin embargo, en casos en los cuales se obtuvieron dos ganglios del mismo paciente (n=8), los ganglios mas cercanos al tumor (Nivel I) mostraron una disminución mayor de células CD8<sup>+</sup> con respecto a ganglios más de los niveles III (Tabla 8).

**FIGURA 66. DISMINUCIÓN EN EL PORCENTAJE DE CÉLULAS CD8+ EN GL REGIONALES DE CYC**



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

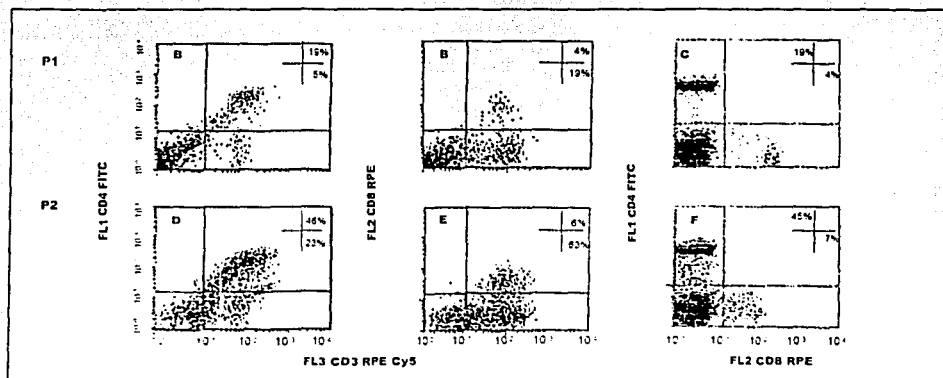
**Tabla 8. Subpoblaciones de linfocitos en GL de CyC**

	A					B					
	Numero de pacientes	CD3 (%)	CD4 (%)	CD8 (%)	Numero de Pacientes	Nivel I			Nivel III		
						CD3 (%)	CD4 (%)	CD8 (%)	CD3 (%)	CD4 (%)	CD8 (%)
<b>Ganglios Control</b>	5	76	58	19*	0						
<b>Ganglios Regionales de CyC</b>	22	56	45	5* P<0.001	8	49	36** P<0.05	4	54	45**	7

Valor medio de los porcentajes de subpoblaciones de linfocitos en ganglios linfáticos regionales de pacientes con neoplasias epidermoides de cabeza y cuello, y de ganglios controles de pacientes sin cancer. A. En 22 pacientes se obtuvo un solo ganglio B. En ocho pacientes se obtuvieron dos ganglios. El ganglio cercano al tumor corresponde al nivel II y el distal a este, al nivel III.

En los ganglios linfáticos en los que se identificaron dos o tres poblaciones mostraron una mayor complejidad en el análisis. Las células en la P1 tenían un menor tamaño (con respecto a P2 o P3) (Figura 67A), con bajo porcentaje de células que expresaban en la superficie  $C3'CD8^+$  (Figuras 67B, 67C), las características fueron muy similares a los encontrados en los ganglios con un solo grupo de células. Las P2 y P2-P3, tuvieron un tamaño mayor ( $P2 > P1$ ,  $P3 > P2$  Y  $P1$ ), la expresión de marcadores de superficie mostraron una mayor heterogeneidad y la intensidad de la fluorescencia emitida fue también variable. En ganglios con una sola población, la suma del porcentaje de células  $CD4^+$  y células  $CD8^+$  fue equivalente al porcentaje de células que expresaron  $CD3$  en la superficie, en los ganglios con P2 y P2-P3 en porcentaje de células  $CD3^+$  fue mayor (~17%) que el resultado de la suma de los porcentajes de linfocitos  $CD3^+CD4^+$  y  $CD3^+CD8^+$  (Figuras 67D, 67E y 67F). Pensamos que estas células  $CD3^+$  podrían expresar algún otro receptor que nos permitiera conocer su estirpe por lo que realizamos una evaluación adicional con marcadores de células NK (ver más adelante).

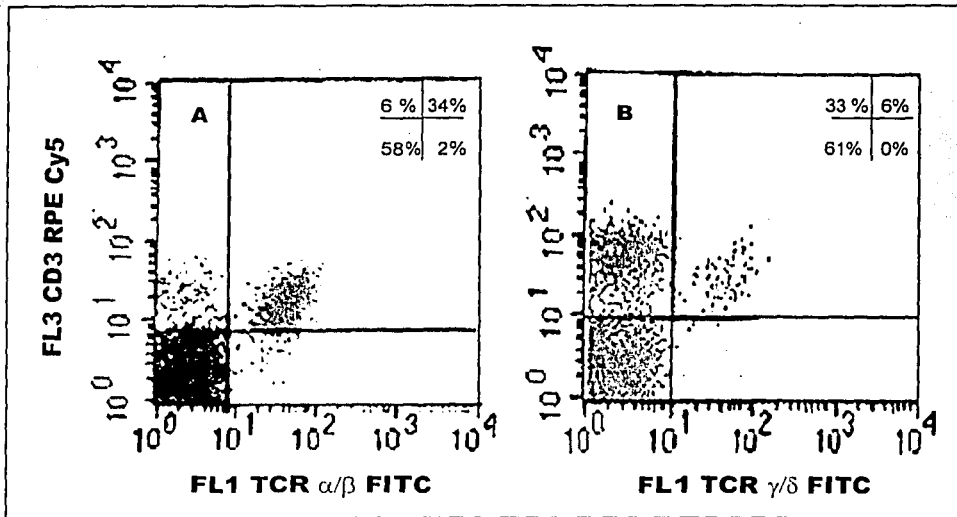
**FIGURA 59. EXPRESION DE ANTIGENOS DE SUPERFICIE EN LAS DISTINTAS POBLACIONES CELULARES**



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En cuanto al receptor para antígeno de las células T, la mayoría de las células T en P1 expresaban solamente las cadenas  $\alpha/\beta$  (Figura 68A), en algunos ganglios (3/10) las poblaciones P2 o P2 y P3 había porcentajes relativamente altos (1.7-7.4%) de células que expresaban las cadenas  $\gamma/\delta$  del receptor para antígeno de la célula T (Figura 68B).

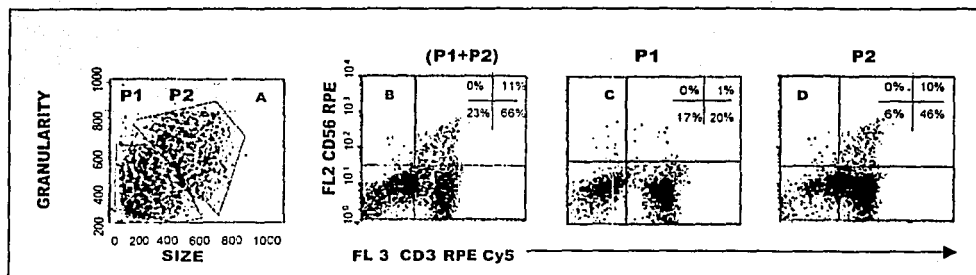
**FIGURA 68. EXPRESION DE LOS RECEPTORES PARA ANTIGENO DE LA CÉLULA T.**



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

La heterogeneidad en tamaño y granularidad de algunas de las células obtenidas algunos de los ganglios, sugiere que otras células del sistema inmune con posible actividad antitumoral pudieran estar presentes. Para explorar esta posibilidad, se analizaron las distintas poblaciones con algunos anticuerpos monoclonales específicos para marcadores de células NK (CD16, CD56). Estos se utilizaron solos o en combinación con CD3 para determinar si algunas de las células  $CD3^+CD4^+CD8^-$  correspondían al tipo celular que co-expresa CD3 y algún marcador de NKs. En el análisis de los ganglios con una sola población celular, un porcentaje  $<1\%$  eran células NK  $CD16^+$  o  $CD56^+$ , sin embargo, en los ganglios con dos o tres poblaciones un porcentaje mayor (4-20%) de los marcadores que identifican células NK (Figura 69).

**FIGURA 69. PRESENCIA DE CÉLULAS NK "CLÁSICAS" EN GANGLIOS DE PACIENTES CON CANCER DE CYC**

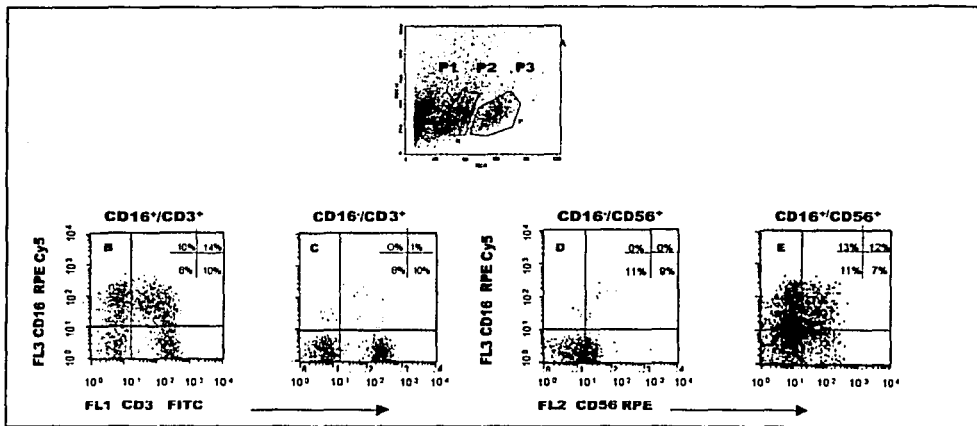


La expresión de marcadores para células NK clásicas fue compleja, se identificaron diferentes poblaciones, las cuales expresaban los siguientes antígenos de superficie:  $CD16^+CD3^-$ ,  $CD56^+CD3^-$ ,  $CD16^+CD56^-$ ,  $CD16^-CD56^+$ ,  $CD16^+CD56^+$  (Figuras 70 H-I), la heterogeneidad de estas células incluyó también la diferentes intensidades en la fluorescencia que emitían. Una diferencia importante entre las células P1 y P2 con P3



consistió en el hecho de que en esta ultima población celular solamente se detectaron células NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> (Figura 70J). En este trabajo no se exploró si existen diferencias funcionales entre estas células.

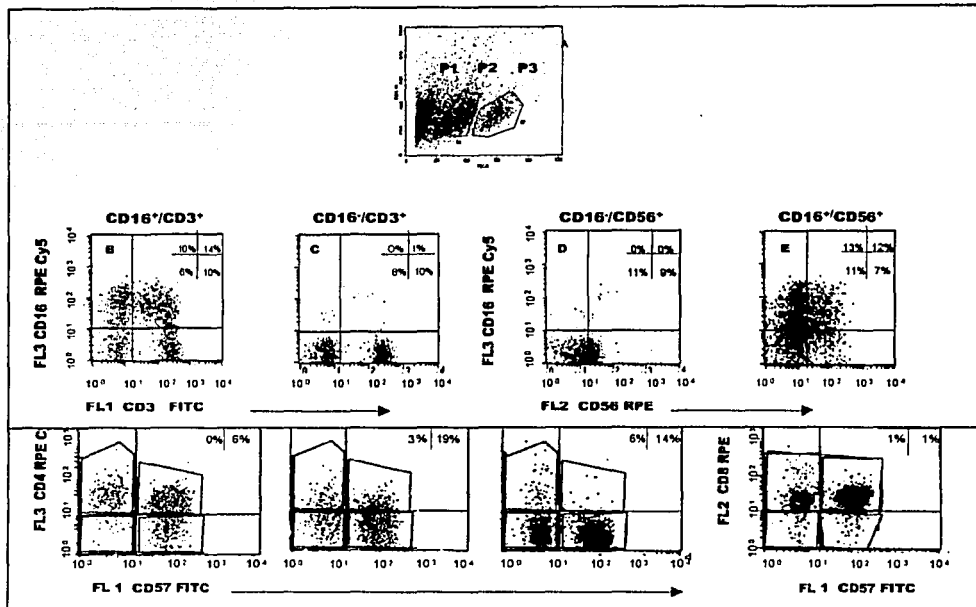
**FIGURA 70. HETEROGENEIDAD DE LAS POBLACIONES NKs EN GANGLIOS DE CYC**



La heterogeneidad de los ganglios estudiados incluyó, además el hecho de que en algunos (5/38) se encontraron células que expresaron en su superficie la molécula CD57, que se encontró co-expresada con CD3, CD4 o CD8 ( CD57<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>, CD57<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (Figura 71 B, 71 C) o CD57<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (Figura 71 E). En el caso de la mayoría de las células CD4<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup>, un porcentaje importante de estas se encontraron en la región P1 (Figura 71 B), en contraste las células CD57<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> se detectaron en la región P3 lo que sugiere que estas son células más grandes.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**FIGURA 71. CELULAS NKT EN GANGLIOS LINFÁTICOS DE CYC**



La heterogeneidad poblacional encontrada en los ganglios nos sugirió que independientemente de la imagen histológica observada, la cual no mostró mayor heterogeneidad a la descrita en la sección de histología, posiblemente existieran cambios importantes en el o los tipos celulares presentes en los ganglios lo cual pudiera incidir en el funcionamiento "normal" del ganglio.

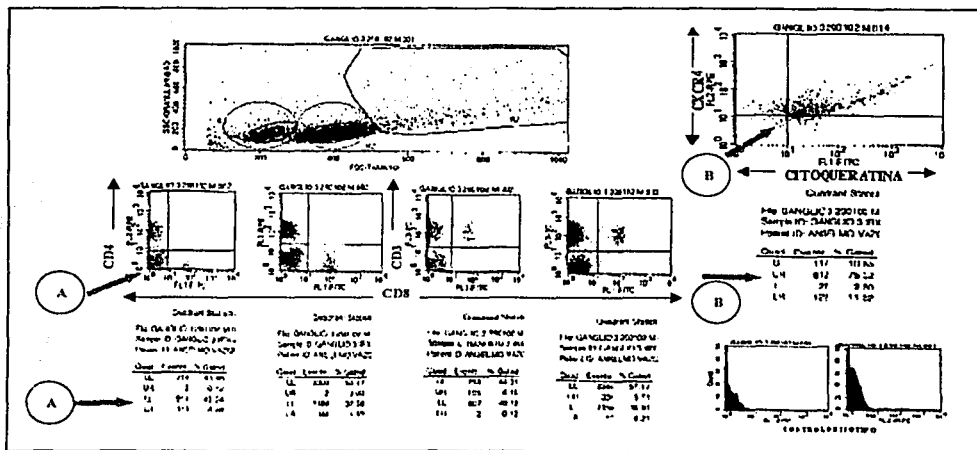
El impacto de la presencia de células tumorales en ganglios histológicamente positivos, posiblemente contribuyera a las alteraciones descritas, sin embargo como se mencionó aún en ganglios sin metástasis histológicamente detectables, se observaron alteraciones numéricas y funcionales (ver más adelante), por lo que decidimos explorar la presencia de metástasis evaluando células citoqueratina positivas en el ganglio. En forma adicional se realizó un doble marcaje utilizando CXCR4 tratando de correlacionar la participación de

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

quimioquinas en el proceso metastásico. La Figura 72 muestra el análisis de un ganglio diagnosticado histológicamente como hiperplásico en el que se detectaron tres poblaciones celulares, el número total de eventos analizados en las tres regiones fue de 10,000; 60% de las células se encontraron en la región 2, 15% en la región 1 y el resto en la región 3 (datos no mostrados). El porcentaje de células CD8+ en regiones 1 y 2 fue 6%, aproximadamente, el 40% de las células fueron CD4+ y el resto de las células en ambas regiones fueron CD3-CD4-CD8-. Llama la atención que el total de las células CD3-CD4-CD8- presentes en la región 1 expresaron citoqueratina+/CXCR4+, hecho que sugiere la presencia de 1% de células epiteliales, posiblemente neoplásicas que pudieran alterar el funcionamiento normal del ganglio.

Seis ganglios adicionales han sido analizados utilizando esta estrategia, cuatro francamente metastáticos y dos sin metástasis histológicas siendo los resultados de estos últimos parecidos a los presentados.

**FIGURA 72. DISMINUCIÓN EN EL PORCENTAJE DE CÉLULAS CD8+ EN GL REGIONALES DE CYCMETASTASICOS (PRESENCIA DE CELULAS CITOQUERATINA +)**



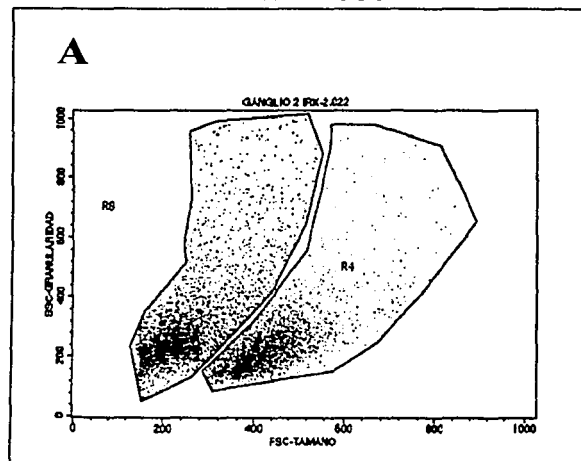
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### Células Dendríticas

La posibilidad de que algunas de las células presentes en los ganglios con dos o más poblaciones pudieran corresponder a células dendríticas fue sugerida por el análisis histológico (por la presencia de ganglios con hiperplasia sinusoidal y la presencia de "macrófagos" activados). Esta posibilidad no se pudo confirmar por histología, por la falta de marcadores de inmunohistoquímica específicos para esta población celular. Sin embargo, dada la disponibilidad en el laboratorio de marcadores para citometría, decidimos analizar esta posibilidad, y se estudiaron CMN de tres ganglios linfáticos.

Como se describe en la sección de métodos, las poblaciones celulares fueron analizadas por tamaño y granularidad. Se identificaron dos poblaciones celulares en los ganglios analizados (P1 y P2) por tamaño y granularidad, Figura 73A. Posteriormente se identificaron las células  $\text{lin}^- \text{DR}^+$  y  $\text{lin}^- \text{CD123}^+$ ,  $\text{lin}^+ \text{CD11}^+$ , en ambas regiones (Figuras 73B y 73C). Las células  $\text{lin}^- \text{DR}^+$  fueron analizadas para identificar las células dendríticas  $\text{CD11}^+$  (Figura 73D-1 y 73E-1) y las  $\text{CD123}^+$  (Figura 73D-2 y 73E-2). El mayor porcentaje de células dendríticas se encontró en las células de menor tamaño y mayor granularidad y principalmente se trató de  $\text{CD123}^+$ .

**FIGURA 73A. IDENTIFICACION DE CELULAS DENDRITICAS EN GANGLIOS LINFATICOS**



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

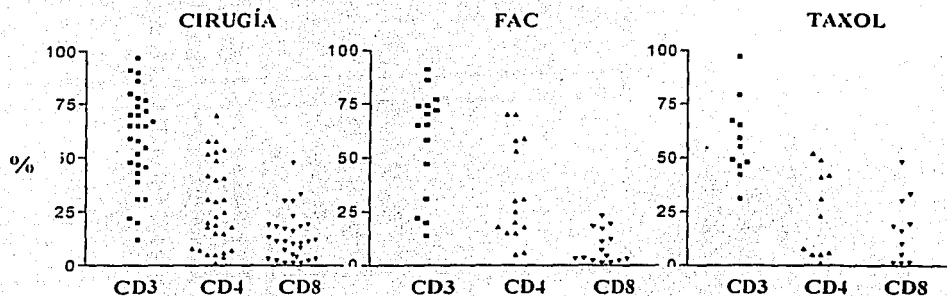


### Cáncer de Mama

Los ganglios obtenidos de este grupo de enfermas mostraron algunas diferencias con respecto a controles sin cáncer y a los ganglios de pacientes con neoplasias epidermoides. Estas, estuvieron relacionadas no solo a la presencia de metástasis en el ganglio sino también al tratamiento con quimioterapia y al esquema de tratamiento utilizado (Figuras 65 y 74).

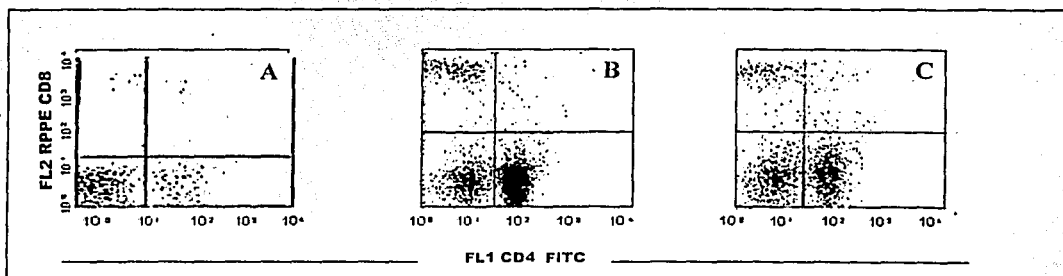
En contraste con la disminución observada en el porcentaje de CD8, este grupo de enfermas mostró una disminución mayor en el porcentaje de linfocitos CD4, la cual fue más acentuada en las enfermas que recibieron quimioterapia (Figuras 65 y 74). El porcentaje de células mononucleares CD3+ fue de 64% para las pacientes sin quimioterapia previa; 54% en el grupo de ganglios obtenidos de pacientes que recibieron Taxol; y 44% en las pacientes que recibieron FAC (P<0.05 en relación al control).

**FIGURA 74. DISTRIBUCION DE LAS POBLACIONES CELULARES EN PACIENTES CON CANCER DE MAMA.**



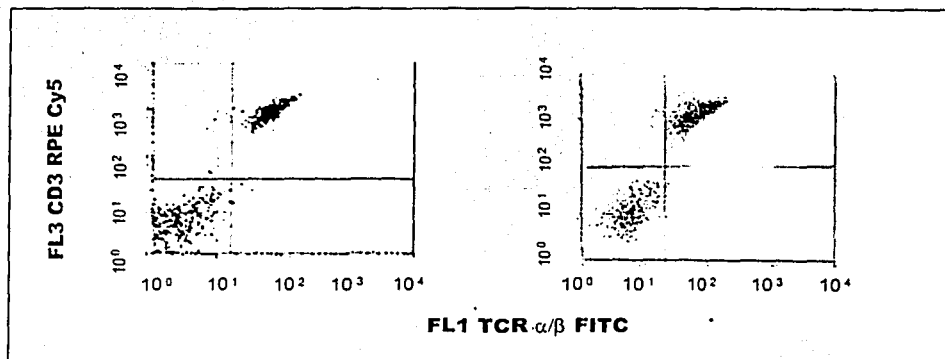
Los porcentajes de células CD4 en pacientes sin tratamiento previo fueron de 37% (Figura 75 B), el grupo con Taxol neoadyuvante 12 % (Figura 75 A)( $P < 0.001$ ), y el de las pacientes que recibieron FAC, 17% (Figura 75 C) ( $P < 0.001$ ). Finalmente, existió una disminución en CD8, que fue ligeramente menor que la encontrada en los pacientes con cáncer de cabeza y cuello, y mostró una variación en relación al tratamiento de las pacientes: (a) sin tratamiento 8% ( $P < 0.01$ ), (b) Taxol 12%, y (c) FAC 19%.

**FIGURA 75. DISTRIBUCIÓN DE CD4/CD8 EN GANGLIOS DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA +/- QUIMIOTERAPIA**



En las CMN obtenidas de los GL de este grupo de pacientes no se observaron células expresando las cadenas  $\gamma\delta$  del receptor para antígenos de la célula T (Figura 76).

**FIGURA 76. EXPRESIÓN DEL RCT  $\alpha/\beta$  EN GANGLIOS DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA .**

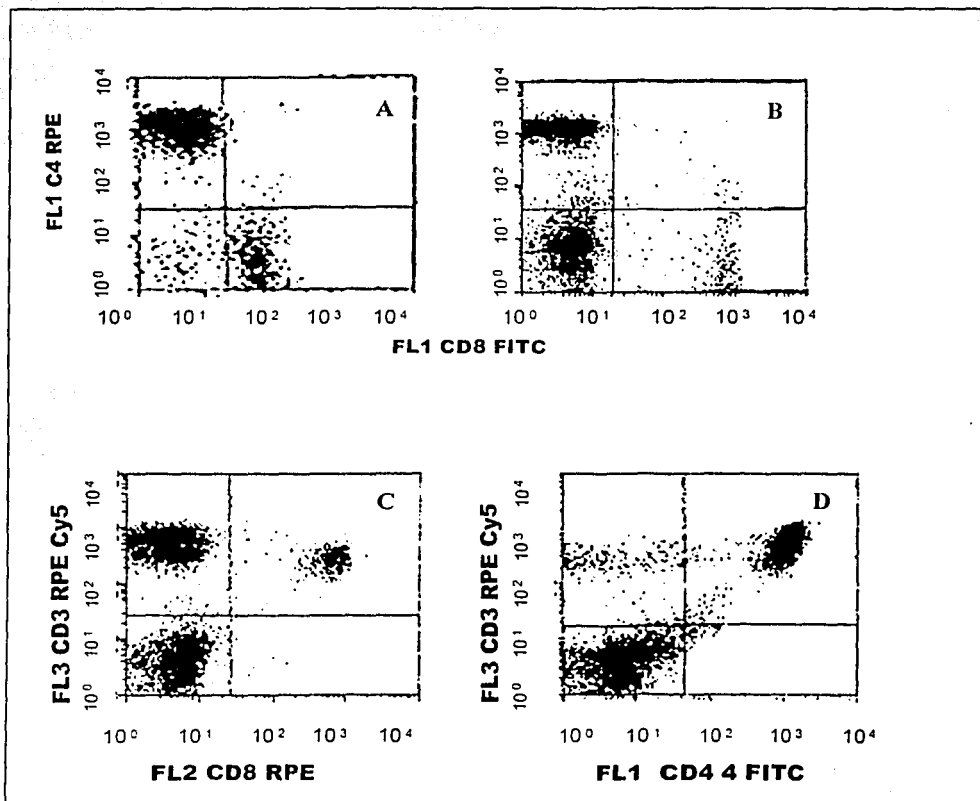


**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**

**Cáncer de Cérvix**

Los ganglios obtenidos de este grupo de enfermas mostraron diferencias con respecto a controles y los de los otros tipos de neoplasias: CD3 (48%) ( $P < 0.01$ ), CD4 (40%) y CD8 (9%) (Figuras 65). La Figura 77 muestra los resultados de tres casos representativos; (A) paciente 1, CD4 RPE 45%, CD8 FITC 12%, (B) paciente 2, CD4 RPE 40%, CD8 FITC 8%, y (C) paciente 3, CD3+Cy5 43%, CD3+/CD8+(DP) 9%, (D) CD3+Cy5 12%, CD3+CD4+ (DP) 40%.

**FIGURA 77. EXPRESIÓN DE CD3/CD4/CD8 EN GANGLIOS PELVICOS**

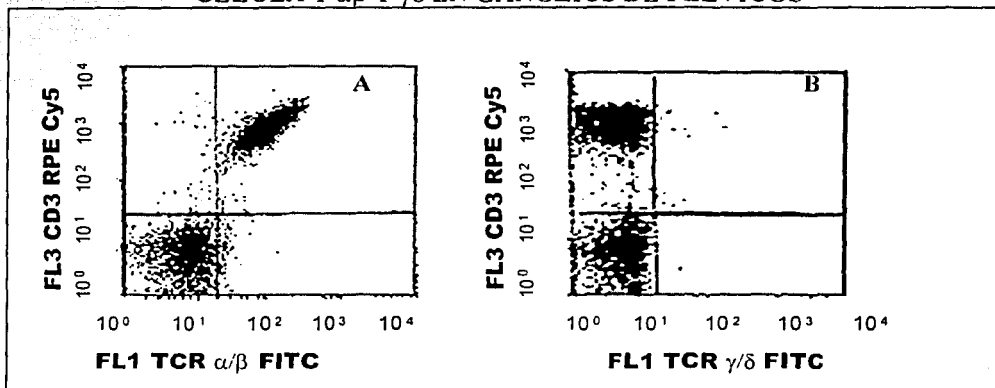


TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



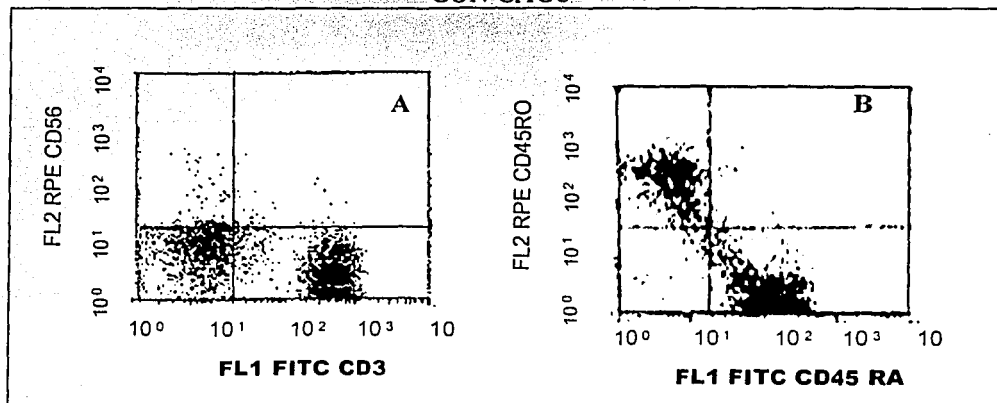
Todos Los GL analizados expresaron las cadenas  $\alpha\beta$  del receptor para antígeno de la célula T (Figura 78 A) y los porcentajes de células que expresaron las cadenas  $\gamma\delta$  fue menor al 2% (Figura 78B).

**FIGURA 78. EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES PARA ANTIGENO DE LA CÉLULA T  $\alpha\beta$  Y  $\gamma\delta$  EN GANGLIOS DE PELVICOS**



Finalmente los porcentajes de células CD16+ fueron menores al 5% en todos los casos analizados (Figura R79 A), y el patrón de la expresión de células CD45RA/RO (Figura R79B) fueron parecido al encontrado en ganglios normales y sangre (datos no mostrados).

**FIGURA 79. CARACTERIZACION DE GANGLIOS PÉLVICOS DE PACIENTES CON CACU.**



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### Inmunofenotipo en células mononucleares de sangre

La evaluación de células mononucleares de sangre utilizando los distintos marcadores de superficie, mostró una disminución del número absoluto de CD3, CD4 y CD8 al comparar controles sanos (38 individuos), esta disminución fue mayor en el grupo de pacientes con cáncer de cabeza y cuello y cáncer cérvico uterino. Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 9).

**Tabla 9. Subpoblaciones de linfocitos en CMN de sangre**

	CD3 (cels/mm <sup>3</sup> )	CD4 (cels/mm <sup>3</sup> )	CD8 (cels/mm <sup>3</sup> )
CONTROLES	1891+/-200	1173+/-150	628+/-220.2
CA MAMA	1799+/-233	1027+/-148	681+/-214
CA CYC	1405+/-300	874+/-79.5	415+/-186
CACU	1535+/-234	882+/-112	457+/-113

La tabla muestra los promedios de las subpoblaciones de linfocitos de los pacientes en quienes se analizaron ganglios linfáticos.

## CICLO CELULAR

En condiciones basales los ganglios linfáticos obtenidos de individuos sin cáncer y la de células mononucleares de sangre de individuos normales, controles sin cáncer y de pacientes con las distintas neoplasias analizadas contenían un porcentaje parecido de células en las fases  $G_1/S/G_2-M$  del ciclo celular.

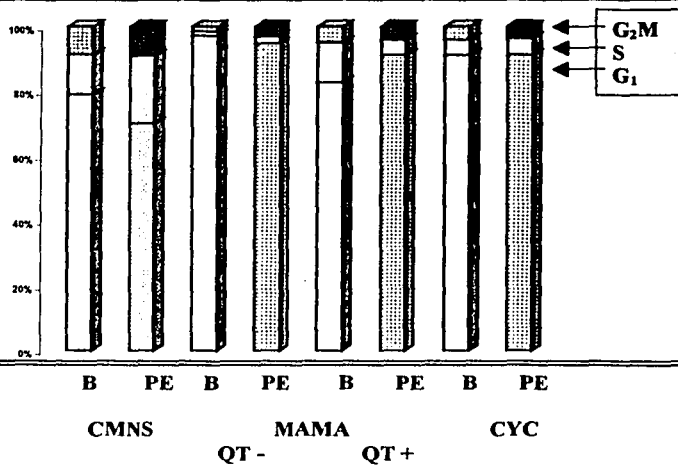
La estimulación de las células utilizando fitohemaglutinina de acuerdo a lo descrito en la sección de material y métodos, indujo la replicación de las células mononucleares de sangre obtenida de controles sanos (38 individuos), controles sin cáncer (5 pacientes) y de pacientes con los distintos tipos de neoplasias estudiados (52 pacientes) (Tabla 10). Este hallazgo fue documentado al evaluar la capacidad de replicarse de acuerdo con el incremento de células presentes en fase S y  $G_2-M$ .

**Tabla 10. ANALISIS DEL CICLO CELULAR**

	Numero	$G_1$	S	$G_2-M$
CMN SANGRE				
BASAL	32	83	13	9
POST-PHA		70	21	10
CMN DE GL (MAMA) QT+	24			
BASAL		83	12	5
POST-PHA		90	7	3
CMN DE GL (MAMA) QT-	10			
BASAL		96	2	2
POST-PHA		95	2	3
CMN DE GL (CYC)				
BASAL	18	89	3	8
POST-PHA		90	5	5

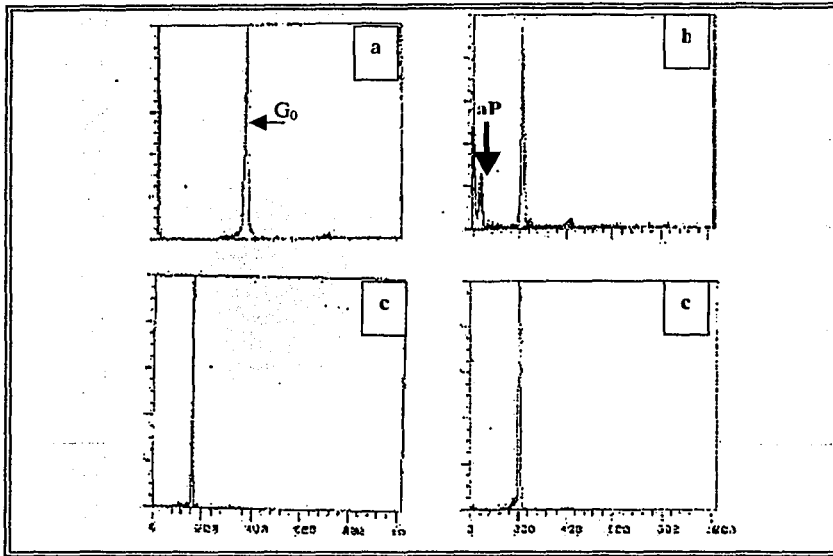
En contraste con los datos obtenidos al estimular mononucleares de sangre, las células mononucleares de ganglios mostraron algunas diferencias: Fueron evaluables 24 ganglios linfáticos obtenidos de pacientes con cáncer de mama que habían recibido quimioterapia neoadyuvante, 10 ganglios de pacientes con cáncer de mama sin tratamiento previo y 18 ganglios de pacientes con neoplasias de cabeza y cuello. Las diferencias de los ganglios evaluados radicarón en el número de células obtenidas o a razones técnicas (contaminación de los cultivos). No se evaluaron ganglios de pacientes sin cáncer ni de pacientes con cáncer cérvico uterino.

**Figura 80. DIFERENCIAS EN LA CAPACIDAD DE INDUCIR PROLIFERACIÓN EN CMN DE SANGRE Y GL**



De los 52 ganglios analizados se identificaron distintos comportamientos; las muestras basales de los ganglios de pacientes con cáncer de mama quienes habían recibido quimioterapia neoadyuvante (28) tenían características similares a las de sangre, en contraste, en ganglios de pacientes vírgenes a tratamiento (de mama y cabeza y cuello, n=28) un mayor porcentaje de células se encontraban en la fase G<sub>1</sub> (Tabla 10, Figuras 80 y 81). La estimulación con Fitohemaglutinina fue incapaz de inducir proliferación celular como se demuestra en los porcentajes de células en fase S o G<sub>2</sub>M (Tabla 10, Figuras 80, 81b y 81d). Una observación frecuente utilizando el microscopio invertido durante el periodo de cultivo, fue la presencia de “células” de menor tamaño con respecto a los controles, la posibilidad de inducción de apoptosis en estas células fue considerada y sugerida por imágenes como la observada en la Figura 81b, sin embargo, no fue analizada específicamente.

**Figura 81. HISTOGRAMAS PRE Y POST ESTIMULACIÓN DE CMN DE GL**



Características pre y post estimulación con PHA de células mononucleares de ganglios de pacientes con cáncer de Cx.C. (A) Histograma pre-estimulación; la mayor parte de las células (96%) se encuentran en fase  $G_0$  del ciclo celular. (B) Post estimulación, no existen células iniciando proliferación, 98% de las células continúan en fase  $G_0$ , se aprecia un pico que pudiera corresponder a células apoptóticas [aP]. (C) ganglio pre y (D) post estimulación que muestran nuevamente la mayor parte de las células en fase  $G_0$ . Ganglios control y células de sangre mostraron un incremento de células en fases S y G2M al ser estimuladas (datos no mostrados).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## PROLIFERACION CELULAR

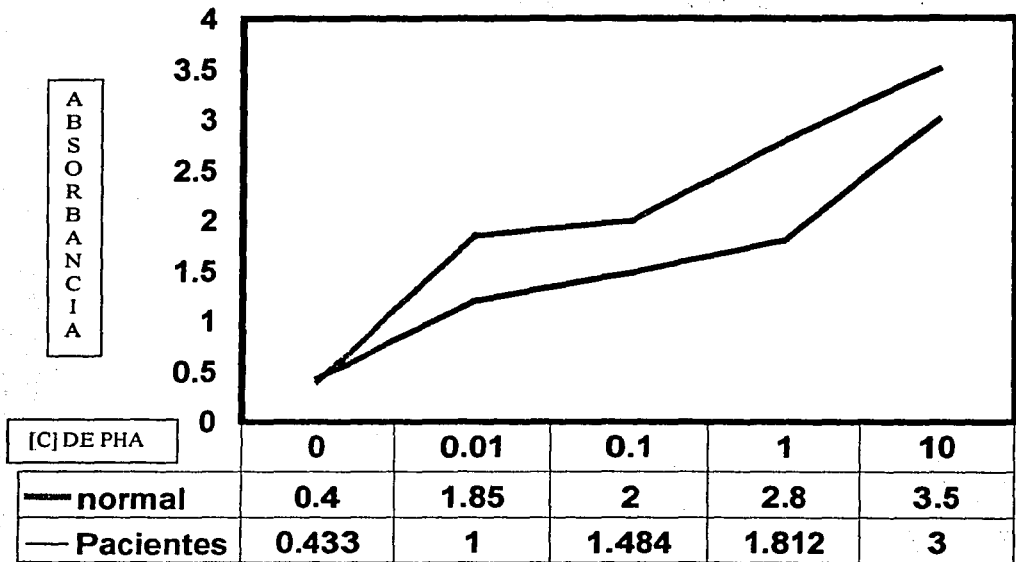
Las alteraciones observadas en el análisis del ciclo celular fueron corroboradas al analizar la capacidad de las células mononucleares obtenidas de ganglios linfáticos para proliferar en respuesta a mitógenos (PHA).

La Figura 82 muestra los resultados del análisis de células mononucleares de sangre en casos y controles, ambos grupos de pacientes respondieron en forma parecida a las distintas concentraciones de PHA, aunque existió una ligera disminución en el grupo de pacientes con cáncer, esta no alcanzó significancia estadística. El análisis microscópico de las células no mostró diferencias entre pacientes y controles.

En el caso de las células obtenidas de gánглиos, las células requirieron dosis mayores de mitógenos para responder (controles), y en los pacientes la proliferación obtenida fue mínima incluso, con dosis máximas de mitógenos (Figura 83). En algunos casos se estimularon las células con IL-2 sólo y en combinación con IFN  $\gamma$ , la respuesta obtenida fue mínima. En la evaluación microscópica, se observaron abundantes células muertas post-estímulo.

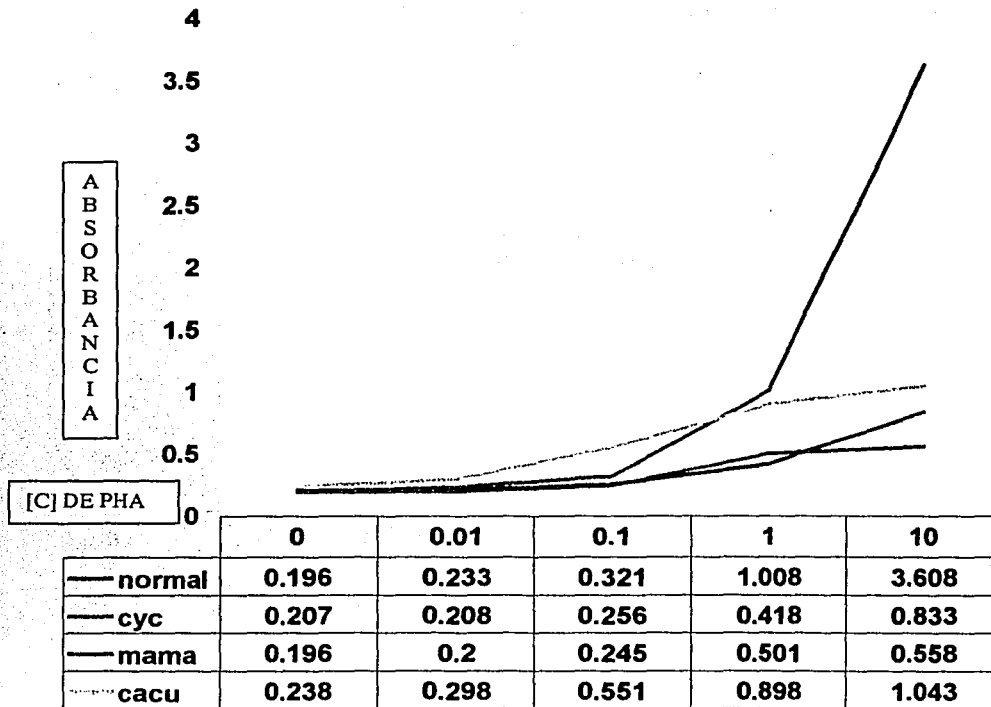
Es importante mencionar que la sensibilidad del método utilizado parece ser menor a la que se encuentra con timidina radioactiva, aún cuando en la literatura este es uno de los métodos más utilizados para la evaluación de la proliferación y/o viabilidad celular.

FIGURA 82 . PROLIFERACIÓN DE CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**FIGURA 83. PROLIFERACION DE CELULAS MONONUCLEARES DE GANGLIOS**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# **DISCUSSION**

## DISCUSION

Los ganglios linfáticos constituyen sitios fundamentales para la iniciación y el mantenimiento de las respuestas inmunes. Aunque en el humano no se conocen muchos de los eventos que suceden durante una respuesta inmune *in situ*, estudios realizados en animales sugieren que se trata de un proceso dinámico que requiere de ciertas condiciones locales y ambientales para desarrollarse en forma exitosa.

Se ha sugerido que aproximadamente  $1.2 \times 10^8$  linfocitos ingresan al ganglio linfático por hora, provenientes de los linfáticos aferentes y de las venas post capilares (vasos endoteliales altos). Es posible que esta migración no ocurra al azar, sino que la presencia de ciertos factores solubles condicionen y seleccionen el tipo de células que ingresan a estos. La estancia aproximada de un linfocito en el ganglio es de 24 hrs<sup>Young 1998</sup>. Los linfocitos que son estimulados por antígenos se retienen en el ganglio un lapso mayor, mientras que el resto reingresan a la circulación. No todos los tipos celulares tienen la misma capacidad para circular, este hecho se refleja en los porcentajes celulares presentes en los órganos linfáticos secundarios y en sangre<sup>Young 1998</sup>. En ganglios normales no estimulados, aproximadamente el 45% de las células son linfocitos CD4<sup>+</sup>, 15% CD8<sup>+</sup>, 25% CD19<sup>+</sup> y solamente 5%  $\gamma\delta$ <sup>Young 1998</sup>. Los linfocitos CD8<sup>+</sup> tienden a migrar a GL intestinales, mientras que los CD4<sup>+</sup> lo hace a su tejido de origen (GL regional). Aproximadamente 40% de los linfocitos no son células circulantes, principalmente los linfocitos B, hecho que se refleja en la baja proporción de estas células en sangre<sup>Young 1998</sup>.

Las clonas de linfocitos reactivos son estimuladas a diferenciarse en células efectoras o de memoria y se expanden. Los linfocitos de memoria, que expresan integrina $\beta 1$ <sup>high</sup>/L-selectina<sup>low</sup> tienden a migrar a tejidos regionales. En los linfocitos naïve, que expresan integrina $\beta 1$ <sup>low</sup>/L-selectina<sup>high</sup> son retenidos un mayor tiempo en el ganglio y porcentaje menor reingresa a la circulación<sup>Jenkins 2001</sup>. El ingreso, tránsito y salida de los linfocitos del ganglio linfático depende de las moléculas de superficie expresadas por éstos y está influenciado por señales provistas por citocinas, quimiocinas, proteínas de matriz extracelular y células endoteliales vasculares y linfáticas<sup>Fu 1999, Stamper 1976, Tangemann 1998, Zlotnik 2000, Young 1999, Constanos-Vetz 1995</sup>.

Utilizando los mismos o mecanismos similares a los que dirigen el tránsito de los linfocitos hacia los GL, las células tumorales pueden ingresar a los ganglios linfáticos, la expresión en la superficie de receptores de quimiocinas en las células tumorales ha mostrado ser uno de los factores que permiten el ingreso de células tumorales a los ganglios linfáticos y a otros órganos <sup>Muller 2001</sup>. Una vez alojadas las células tumorales en los GL, factores similares permitirían que estas pudieran acceder a otros tejidos o permanecer en el ganglio linfático <sup>Muller 2001</sup>.

La estancia de células tumorales en el ganglio claramente representa un elemento que altera el funcionamiento normal de éste. Es posible que siendo sitios de optimización de respuestas inmunes, la identificación de células tumorales establezca mecanismos eficientes de destrucción, principalmente tomando en cuenta que células inmunes antígeno -específicas- restringen su circulación regionalmente. Sin embargo, frecuentemente, los linfocitos normales son desplazados del ganglio y éste es remplazado por distintos porcentajes de células tumorales.

En el momento actual, el estudio de ganglios linfáticos en pacientes con cáncer es estático y aunque clínicamente su importancia como factor pronóstico esta bien establecida, su papel en el control del tumor es controvertida. Estudios recientes analizando los ganglios centinela, por inmunohistoquímica o PCR para detectar células tumorales en el ganglio, independientemente del número de estas y el aspecto histológico del ganglio, es considerados como factores de mal pronóstico en el control del tumor y en la supervivencia del paciente <sup>Santin 2000</sup>. Es hasta hace poco tiempo que este fenómeno ha sido visto desde un punto de vista "funcional" explorando la posibilidad de sensibilización de células linfoides específicas contra el tumor <sup>Santin 2000</sup>.

Aún más importante en el análisis ganglionar regional de pacientes con cáncer es el enfocar los esfuerzos para encontrar número de ganglios positivos a la presencia del tumor, haciendo a un lado la importancia de los ganglios sin metastasis, los cuales en general se encuentran "hiperplásicos", el significado de la hiperplasia es todavía menos entendido y considerado en pacientes con cáncer, su papel en el control o progresión de la enfermedad no esta establecido.

La propuesta de este trabajo fue tratar de entender e integrar regional y sistémicamente el papel que el sistema inmune tiene en el paciente con cáncer, haciendo hincapié que en todos los compartimientos anatómicos, la respuesta inmune es un proceso dinámico. Este enfoque, pensamos pudiera ayudar a un mejor entendimiento de la patología ganglionar.

El análisis histológico de los ganglios mostró datos sugestivos de respuesta inmune regional contra el tumor u otro tipo de antígeno, en ganglios con y sin metastasis de los distintos tumores. Algunos de los ganglios mostraron, sin embargo, hipoplasia de folículos e incluso hipocelularidad, ambos hallazgos fueron frecuentes y nunca reportados como tales en el análisis de rutina realizado por los patólogos de la Institución. El significado de la hipocelularidad presente en ganglios regionales de pacientes con cáncer de CyC y dela mama, pudiera estar correlacionada con los hallazgos funcionales de este estudio.

Aunque varios tipos de antígenos pudieron haber estimulado los ganglios, las anomalías funcionales encontradas sugieren la participación de las células tumorales directamente o a través de factores producidos por estas pudieron haber favorecido las alteraciones encontradas.

En comparación con ganglios de sujetos controles sin cáncer y de los porcentajes celulares reportados en la literatura, existieron alteraciones importantes en todos los ganglios de pacientes con cáncer. En pacientes con neoplasias epidermoides de cabeza y cuello la mayor alteración encontrada fue la disminución de linfocitos CD8<sup>+</sup>. En contraste, en los ganglios obtenidos de pacientes con cáncer de mama, la mayor alteración observada fue en los porcentajes de linfocitos CD4<sup>+</sup>, en este grupo de enfermas la afección estuvo acentuada por el tratamiento neoadyuvante, y por el tipo de quimioterapia recibido. En comparación con los resultados CD4 y con los hallazgos en pacientes con neoplasias de cabeza y cuello la alteración en los porcentajes de las células CD8<sup>+</sup> fue mayor en pacientes sin tratamientos previos, en pacientes con terapia neoadyuvante las cifras fueron parecidas a la de los controles. Este hallazgo pudiera sugerir que factores directamente relacionados con el tumor pudieran incidir en los porcentajes de linfocitos CD8<sup>+</sup>.

Los datos obtenidos en este trabajo evidencian la complejidad y la heterogeneidad de respuesta en los ganglios linfáticos desde el punto de vista dinámico-funcional, mientras que histológicamente no se detectaron variaciones importantes entre estos, el tipo de tumor y los tratamientos previos pudieran incidir en forma importante en la conformación funcional del ganglio.

El impacto de la presencia de células tumorales en ganglios histológicamente positivos, posiblemente contribuyera a las alteraciones descritas, sin embargo, como ya se mencionó aún en ganglios sin metástasis histológicamente detectables se observaron alteraciones numéricas y funcionales. Los datos encontrados sugieren la presencia de números relativamente bajos de células tumorales o factores solubles que lleguen al ganglio, posiblemente modifiquen la homeostasis ganglionar.

Entre los factores responsables de la disminución del porcentaje de linfocitos CD8<sup>+</sup>; algunos autores han reportado una disminución selectiva de linfocitos CD8<sup>+</sup>; condicionada a la estimulación antigénica crónica y a la inducción de señales de muerte como un mecanismo para mantener el equilibrio numérico de linfocitos <sup>Lapointe 1992, Whiteside 1998, Slonn-Lancaster 1993, Freitas 2000</sup>. La posibilidad de que antígenos tumorales pudieran ser la fuente de esta estimulación requiere ser explorada.

El decremento en los porcentajes de linfocitos CD8<sup>+</sup> pudiera ser, así mismo, consecuencia de alteraciones inducidas por linfocitos CD4<sup>+</sup>. Algunos de los resultados sugieren esta como una posibilidad importante; Existió una disminución significativa en la capacidad de proliferación celular en todos los grupos de pacientes la mayoría de las células en cultivo fueron células CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, hecho que sugiere que la disfunción de estas células repercute en los otros subtipos celulares <sup>Altifed 200, Matloubian 1994, Tataka 1989</sup>.

Dada la importancia que los linfocitos CD4<sup>+</sup> poseen como reguladores de las respuestas antígeno específicas, su participación en las respuestas antitumorales deben ser mejor estudiadas, estudios en ratones knockout han mostrado la importancia de estas células en la inmunidad tumoral <sup>Pardoll 1998</sup>. Es posible que linfocitos CD4<sup>+</sup> específicos en contra de algunos antígenos tumorales pudieran ser tolerizados durante la progresión tumoral <sup>Stavenley O'Carroll 1998</sup>. Estos linfocitos fueron incapaces de proliferar o producir

citocinas en respuesta a un antígeno, incluso en presencia de células dendríticas <sup>Pardoll 1998</sup>, es posible que la anergia mediada a través de CD4 sea más eficiente que a través de otras vías <sup>Pardoll 1998</sup>.

En los pacientes con cáncer de mama las alteraciones observadas ofrecen una complejidad adicional para ser analizadas. Existe la repercusión de la quimioterapia en el funcionamiento y número de células presentes, es posible, de acuerdo a lo reportado en la literatura, que los linfocitos CD4+ sean más susceptibles que otros tipos celulares presentes en el ganglio al daño inducido por quimioterapia, hecho que posiblemente se refleja en la disminución en el porcentaje de estas células en pacientes tratadas. Sin embargo, el hecho de que existe una disminución en linfocitos CD8+ en pacientes sin tratamiento, apoya factores inherentes al tumor como responsables de la disfunción o alternación en el ganglio. La presencia de porcentajes de linfocitos CD8+ en pacientes post quimioterapia, similares a los de los controles sin cáncer pudiera ser consecuencia de un equilibrio resultado de la disminución de CD4, pero pudiera también apoyar el papel de un elemento "supresor" inducido por los linfocitos CD4.

Un elemento adicional responsable de la disfunción es la producción de citocinas como la IL-10, que pudieran alterar la capacidad de respuesta de las células presentes en el ganglio. <sup>Moore 2001, Akbar 1993, Altfeld 2000, Matloubian 1994, Tataka 1989, Terabe 2000</sup>

Es posible que algunas de las células CD4+ encontradas pertenezcan a la subpoblación de células supresoras CD4<sup>+</sup>/CD57<sup>+</sup> células (NKT) <sup>Terabe 2000</sup>, la presencia de éstas no fue analizada en todos los ganglios, sin embargo, en ocho casos analizados de pacientes con cancer epidermoide de CyC, se encontraron células que expresaban CD57. La mayoría de estas fueron CD57<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>, y este hallazgo se correlacionó con la presencia de células CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> en la región P2.

Estos resultados, y los encontrados en la literatura, sugieren que la presencia de estas células NKT pudieran haber alterado la función de otras células hematopoyéticas presentes en el ganglio linfático y como consecuencia haber facilitado el asentamiento de células. Con nuestros resultados no podemos descartar si esto refleja un estado de anergia o simplemente condiciones funcionales diferentes.

La continua llegada de linfocitos al GL sugiere que en ganglio existe una población heterogénea de células, entre estas linfocitos T  $\gamma/\delta$ . El papel que estas células tienen en GL regionales en neoplasias necesita ser estudiado con mayor detalle, el hecho de que estas células fueron encontradas casi en forma exclusiva en pacientes con neoplasias de CyC, lo que traduce la localización de los ganglios analizados, pudiera sugerir la atracción de un porcentaje mayor de estas células a través de señales de "stress", como consecuencia de la disminución de linfocitos CD3+/CD8+, pudiendo representar un mecanismo inmune alternativo dirigido contra células tumorales presentes en el ganglio <sup>Land 1999</sup>. Sin embargo, la posibilidad de que su presencia sea consecuencia de la gama antigénica presente en dicha región anatómica debe, también ser considerada.

La detección de más de una población celular identificadas por citometría por tamaño y granularidad, y las imágenes histológicas en las que se observo la presencia de "histiocitos" en los sinusoides, sugiere que algunas de estas células pudieran ser células dendríticas presentadoras de antígenos. La complejidad para evaluar estas células y la ausencia de un marcador específico impidió que se realizara en todos los ganglios, sin embargo, se estudiaron tres ganglios de pacientes con neoplasias de cabeza y cuello y llamó la atención la presencia de un pequeño porcentaje de estas células, principalmente células lin<sup>+</sup>DR<sup>+</sup>123<sup>+</sup> (receptor de IL-3). Una población de células dendríticas identificada únicamente en humanos expresa niveles elevados de CD123 y CD4, sin expresar CD11c. Estudios *in vitro* han demostrado la presencia de estas células en sangre y amígdalas, requieren de IL-3 para crecer y una señal de activación provista por CD40L para madurar. Es posible que estimulen a linfocitos CD4+ a diferenciarse a células TH2 <sup>Grouard 1997, Oliveus 1997</sup>, en contraste con las CDe mieloides (CD11<sup>+</sup>) que inducen la diferenciación a TH1 <sup>Rissoan 1999</sup>. La posibilidad de que en estos paciente las células tumorales presentes en GLR fueran la fuente de antígenos que indujeran la diferenciación de estas células, ha sido sugerida por algunos autores <sup>Cohen 2001</sup>.

Dado que en la literatura el análisis fenotípico y funcional de estas células se limita a células estudiadas *n vitro*, es necesario continuar estudiando estas células y correlacionar este hallazgo con parámetros histológicos y clínicos. El porcentaje tan bajo de estas células detectado, no sabemos si es patológico o bien si un mínimo



número de células son requeridas, ya que no existen estudios *in vivo*, sin embargo, no descarta la posibilidad de que reflejen el intento de montar una respuesta inmune regional. Estas alteraciones fenotípicas tuvieron un impacto en la capacidad para proliferar de las células mononucleares obtenidas, lo cual posiblemente refleje un estado de anergia celular.

En sangre, las diferentes poblaciones de linfocitos no mostraron alteraciones en número, porcentajes de las distintas subpoblaciones o en la función.

Aún cuando no fue posible analizar ganglios distantes, las pocas anomalías detectadas en GL de pacientes con CaCu, en quienes los ganglios analizados eran anatómicamente más lejanos al tumor y la ausencia de alteraciones en células mononucleares de sangre, los hallazgos encontrados en este trabajo sugieren que la disfunción inmune en pacientes con cáncer pudiera no ser sistémica como ha sido postulado por múltiples autores, sino a nivel del drenaje linfático regional<sup>Schuller 1986</sup>.

La importancia de la inmunidad regional y la disfunción a este nivel nos invita a reflexionar sobre estrategias sistémicas de inmunoterapia y la repercusión funcional de las disecciones ganglionares con fines pronósticos.

**BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

- Abe R, Taneichi N. Lymphatic metastasis in experimental cecal cancer: effectiveness of lymph nodes as barriers to the spread of tumor cell. *Arch Surg*, 104:95-8. 1972.
- Abbondanzo SL, Irely NS, Frizzera G. Dilantin-associated lymphadenopathy. *Am J Surg Pathol*;19(6):675-686. 1995
- Adams, J. M., and Cory, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 281:1322-1326, 1998.
- Adikins B. Developmental regulation of the intrathymic T cell precursor population. *J. Immunol*; 146: 1387-1393. 1991
- Adema GJ, Hartgers F, Verstraten R, de Vries E. A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature* 387:713-17. 1997
- Agarsson BA, Kadin ME. The immunophenotype of Reed-Sternberg cells. A study of 50 cases of Hodgkin's disease using fixed frozen tissues. *Cancer*;63:2083-2087. 1989
- Aisner, J, Cirincione, C, Perloff, M, et al. Combination chemotherapy for metastatic or recurrent carcinoma of the breast: A randomized phase III trial comparing: cyclophosphamide, doxorubicin, thiotepa, and halotestin (VATH) versus VATH alternating with cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracil, vinblastine, and prednisone (CMFVP): Cancer and Leukemia Group B Study 8281. *J Clin Oncol*; 13:1443. 1995
- Akbar AN, Borthwick N, Salmon M, et al. The significance of low bcl-2 expression by CD45RO T cells in normal individuals and patients with acute viral infections. The role of apoptosis in T cell memory. *J. Exp. Med.*; 178:427. 1993
- Akbar AN, Salmon M, Savil J, Janossy G. A possible role for bcl-2 in regulating T-cell memory—a "balancing act" between cell death and survival. *Immunol Today*; 14: 526. 1993
- Alonso ML, Richardson ME, Metroka CE, et al. Chromosome abnormalities in AIDS-associated lymphadenopathy. *Blood*; 69:855-858. 1987
- Albert, M. L., pearce, S. F., Francisco, L. M., Sauter, B., et al. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alpha-beta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 188. 1359-1368, 1998.
- Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N.. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392:86-89. 1998
- Alberts B, Bray B, Lewis J, Raff M et al. *The molecular biology of the cell*. 3rd Ed New York Garland Publishing 1994
- Albores-Saavedra, J, Gersell, D, Gilks, CB, et al. Terminology of endocrine tumors of the uterine cervix: results of a workshop sponsored by the College of American Pathologists and the National Cancer Institute. *Arch Pathol Lab Med*; 121:34. 1997
- Alexander, M., M. L. Salgaller, E. Celis, A. Sette, W. A. Barnes, S. A. Rosenberg & M. A. Steller: Generation of tumour-specific cytolytic T lymphocytes from peripheral blood of cervical cancer patients by in vitro stimulation with a synthetic human papillomavirus type 16 E7 epitope. *Am J Obstet Gynecol* 175, 1586-93. 1996
- Allen, R. T., Cluck, M. W., and Agrawal, D. K. Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *Cell Mol Life Sci*, 54:427-445, 1998.
- Akbar AN, Borthwick N, Salmon M, Gombert W et al. The significance of low bcl-2 expression by CD45RO T cells in normal individuals and patients with acute viral infections. The role of apoptosis in T cell memory. *J Exp Med*. 178:427, 1993.
- Altfield M, Rosemberg ES. The role of CD4+ T helper cells in the cytotoxic T lymphocyte responses to HIV. *Curr Op Immunol*. 12:375-380, 2000.

- American Joint Committee on Cancer Staging Manual, 5th ed, Fleming, ID, Cooper, JS, Henson, DE, et al (Eds), Lippincott-Raven, Philadelphia, p. 190. 1999
- Armstrong, T. D., Clements, V.K., and Ostrand Rosenberg, S., MHC class II-transfected tumor cells directly present antigen to tumor-specific CD4+ T lymphocytes, *J. Immunol.*, 160,661-666,1998.
- Andriko JA, Abbondanzo SL, Nandedkar MA, Aguilera NS. Childhood Hodgkin's disease in the United States: an analysis of histologic subtypes and association with Epstein-Barr virus. *Mod Pathol* 1997;10:366-371.
- Anderson P, Caliguri M, Ritz J, SchSF. CD3-negative natural killer cells express zeta TCR as part of a novel molecular complex. *Nature* 1989; 341: 159.
- Anichini, A., Mortarini, R., Alberti, S., Mantovani, A., et al. T-cell-receptor engagement and tumor ICAM-1 up-regulation are required to by-pass low susceptibility of melanoma cells to autologous CTL-mediated lysis, *Int. J. Cancer*, 53,994-1001, 1993.
- Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, Luther SA, Forster R, Sedgwick JD, Browning JL, Lipp M, Cyster JG: A chemokine-drive positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* 2000; 406:309-314.
- Ansel; K. M., McHeyzer-Williams, L. J., Ngo, V. N., McHeyzer-Williams, M. Get al. In Vivo-activated CD4 T Cells Upregulate CXC Chemokine Receptor 5 and Reprogram Their Response to Lymphoid Chemokines. *J. Exp. Med.*, 190: 1123. 1999
- Arany, I. & S. K. Tyring: Status of local cellular immunity in interferon-responsive and -nonresponsive human papillomavirus-associated lesions. *Sex Transm Dis* 23, 475-80 (1996)
- Ardavin C, Wu L, Li CL, Shortman K. 1993. Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* 362:761-63
- Armitage RJ, Namen AE, Sassenfeld HM, Grabstein KH. 1990. Regulation of human T cell proliferation by IL-7. *J. Immunol.* 144:938-41
- Armstrong Bk, Doll R. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *Int J Cancer*; 15:617. 1975
- Arnold-Schild D, Hanau D, Spehner D, Schmid C, Rammensee HG, de la Salle H, Schild H. 1999. Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *J. Immunol.* 162:3757-60
- Asher, A. L., Mule, J. J., and Rosenberg, S. A., Recombinant human tumor necrosis factor mediates regression of a murine sarcoma in vivo via Lyt-2+ cells, *cancer Immunol. Immunother.*, 28, 153-156,1989.
- Asher, A. L., Mule, J. J., Kasid, A., Restifo, N. P., Salo, j. C., et al. Murine tumor cells transduced with the gene for tumor necrosis factor-alpha. Evidence for paracrine immune effects of tumor necrosis factor against tumors, *J. Immunol.*, 146, 3227-3234,1991.
- Austyn JM, Larsen CP.. Migration patterns of dendritic leukocytes. Implications for transplantation. *Transplantation* 49:1-7. 1990
- Balch CM. The role of elective lymph node dissection in melanoma: rationale, results, and controversies. *J Clin Oncol*; 6:163. 1988
- Banchereau J, Rousset F. Human B lymphocytes: phenotype, proliferation, and differentiation. *Adv. Immunol*; 52:125. 1992
- Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, Briere F., The CD40 antigen and its ligand. *Annu. Rev. Immunol.* 12:881-922. 1994
- Barbacid M. RAS genes *Ann Rev Biochem* 56:779:800, 1987
- Barrat-Boyes SM: Making the most of mucin: a novel target for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 43:142-151.1996
- Barker BF, Carpenter WM, Daniels TE, Khan MA et al. Oral mucosal melanomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*; 83: 672-9. 1997

- Bakker, A. B., shhrebs, M. W., de Boer, A. J., Kawakami, Y., et al. Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes, *J. Exp. Med.*, 179,1005-1009,1994.
- Barrat-Boyes SM: Making the most of mucin: a novel target for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*, 43:142-151. 1996
- Barrera Franco JL , Granados García M, Herrera Gómez A et al., Tratamiento neoadyuvante en el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello: experiencia del Instituto Nacional de Cancerología. *Rev Inst Nal Cancerol*:44:9-14. 1998
- Barth, R. J., Jr., Mule, J. J., Spiess, P. J., and Rosenberg, S. A., Interferon gamma and tumor necrosis factor have a role in tumor regressions mediated by murine CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes, *J. Exp. Med.*, 173,647-658,1991.
- Bartlett, D. L., Ma, G., Alexander, H. R., Libutti, S. K., et al. Isolated limb reperfusion with tumor necrosis factor and melphalan in patients with extremity melanoma after failure of isolated limb perfusion with chemotherapeutics, *cancer*, 80, 2084-2090, 1997.
- Batsakis IG, Regezi JA, Solomon AR, Rice DH. Pathology of the head neck tumors: mucosal melanomas. *Head Neck Surg*: 4:404-18. 1982
- Bauer, S. et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285, 727-729 1999.
- Baume DM, Caliguini MA, Manley TJ, Daley JF, et al. Differential expression of CD8 alfa and CD8 beta associated with MHC restricted and non-MHC restricted cytolytic effector cells. *Cell Immunol* 131:352, 1990
- Braud, V.M. & McMichael, A.J. Regulation of NK cell functions through interaction of the CD94/NKG2 receptors with the nonclassical class I molecule HLA-E. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 244, 85-95 (1999).
- Behrens J, Mareel MM, Van Ray FM, Birchmeier W. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells aquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol*; 108:2435. 1980
- Benedet, JL, Bender, H, Jones, H 3rd, et al. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of g; 70:209. gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. *Int J Gynaecol Obstet* 2000
- Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR. 1998. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393:478-80
- Benoist C, Mathis D. Generation of the alpha beta T-cell repertoire. *Curr Opin Immunol.*; 4: 156. 1992
- Benoist C, Mathis D: T-lymphocyte differentiation and biology. In *Fundamental Immunology*, edn 4. Edited by Paul WE. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999:367-409.
- Berke G. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: Molecular and cellular aspects[Review]. *Annu Rev Immunol*; 12:735-73. 1994
- Berke G.. The Fas-based mechanism of lymphocytotoxicity. *Hum. Immunol.*, 54, 1-7,1997.
- Berlin-Rufenach, C., Otto, F., Mathies, M., Westerman, J., Owen, M. J., et al. Lymphocyte Migration in Lymphocyte Function-associated Antigen (LFA) -1-deficient Mice. *J. Exp. Med.*, 189: 1467. 1999.
- Beverly PCL, Cillard RE. Distinctive functional characteristics of human T lymphocytes defined by E rosetting or a monoclonal anti T cell antibody. *Eur J Immunol.* 11:329, 1981.
- Biddison WE, Rao PE, Talle MA et al. Possible involvement of the T4 molecule in T cell recognition class IIHLA antigens: evidence from studies of proliferative responses to SB antigens. *J Immunol.* 131:152. 1983.
- Biosafety and Health in Microbiological and Biomedical Laboratories. Human Service Publication#(NIH)88-83395. U.S. Government Printing Office, Washington D.C.

- Black RA, Rauch CT, Kozloski CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, et al: A metalloproteinase disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature*; 385:733-736. 1997
- Blair D Oskarson D, Wood D et al. Activation of the transforming potential of a normal cell sequence: a molecular model of oncogenesis. *Science* 212:941-943. 1981
- Blair D Oskarson D, Wood D et al. Activation of the transforming potential of a normal cell sequence: a molecular model of oncogenesis. *Science* 212:941-943. 1981
- Blair D Oskarson D, Wood D et al. Activation of the transforming potential of a normal cell sequence: a molecular model of oncogenesis. *Science* 212:941-943. 1981
- Blum, JL, Jones, SE, Buzdar, AU, et al. Multicenter phase II study of capecitabine in paclitaxel-refractory metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*; 17:485. 1999
- Boon T, Cerottini JC, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Van Pel A.. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 12:337- 65. 1994
- Bockman DE, Kirby ML. Neural crest interactions in the development of the immune system. *J Immunol*; 135:766. 1985
- Bosch, FX, Manos, MM, Munoz, N, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst*; 87:796. 1995
- Bounsell L, Bernard A, Reinherz EL et al. Surface antigens on malignant Sezary and T-CLL cells correspond to mature T cells. *Blood*, 57:526, 1981.
- Boyum A. Separation of lymphocytes from blood and bone marrow. *Scand J.Clin Lab Invest Suppl.* 97:51. 1968
- Bradley, L. M., Duncan, D. D., Tonkonogy, S., and Swain, S. L., Characterization of antigen-specific CD4+ effector T cells in vivo: immunization results in a transient population of MEL-14-, CD45RB helper cells that secretes interleukin 2 (IL-2), IL-3, IL-4, and interferon gamma, *J. Exp. Med.*, 174, 547-559, 1991.
- Braud, V.M. & McMichael, A.J. Regulation of NK cell functions through interaction of the CD94/NKG2 receptors with the nonclassical class I molecule HLA-E. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 244, 85-95 1999.
- Boyum A. Separation of lymphocytes from blood and bone marrow. *Scand J.Clin Lab Invest Suppl.* 97:51-76. 1968.
- Bromley SK, Peterson DA, Gunn MD, Dustin ML: Hierachy of chemokine receptor and TCR signals regulating T cell migration and proliferation. *J Immunol* 2000; 165:15-19.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., and Wang, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15:269-290, 1999.
- Burger JA, Burger M, Kipps TJ: Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediated spontaneous migration beneath bone marrow stromal cell. *Blood* 199; 94:3658-3667.
- Burgess TL, Kelly RB. Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annu Rev Cell Biol* 1987; 3:243-293.
- Burke, F., East, N., Upton, C., Patel, K., and Balkwill, F. R., Interferon gamma induces cell cycle arrest and apoptosis in a model of ovarian cancer: enhancement of effect by batimastat, *Eur. J. Cancer.* 33, 1114-1121. 1997.
- Burkitt Dp. Geographical distribution. In: Burkitt Dp, Wright DH, eds. *Burkitt's Lymphoma*. Edinburgh: E. and S. Livingstone. 1988:186
- Burkly L, Hession C, Ogata L, Reilly C, Marconi LA, Olson D, Tizard R, Cate R, Lo D. 1995. Expression of  $\alpha$ 1B is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature* 373:531-36
- Burnet FM *Cellular Immunology*. Cambridge University press London. 1969
- Burnet FM . The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13: 1-27.1970
- Burrows PD, Cooper MD. B-cell development in man. *Curr. Opin Immunol* 1993; 5:201.
- Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996; 272:60.

- Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991; 67: 1033.
- Butcher EC. The regulation of lymphocyte traffic. *Curr Top Microbiol Immunol* 1986; 128: 85.
- Cady B. Lymph node metastases: indicators, But not governors, of survival. *Arch Surg*;119:1067-72. 1984
- Campana D, Janossy G, Coustan SE, et al The expression of T cell receptor associated proteins during T cells ontogeny in man. *J. Immunol*; 142: 57. 1989
- Campbell JAH. Cat-scratch disease. In: Sommers SC, Rosen PP, eds. *Pathology annual*, vol. 12, part 1. New York: Appleton-Century-Crofts,;277-292. 1977
- Campbell, J. J., Bowman, E. P., Murphy, K., Youngman, K. R., et al. 6-C-Kine (SLC), a Lymphocyte Adhesion-trigguerin Chemokine Expressed by High Endothelium, Is an Agonist for the MIP-3beta Receptor CCR7. *J. Cell. Biol.* 141: 1053-1059. 1998
- Campbell JJ, Pan J, Butcher EC: Developmental switches in chemokine responses during T cell maturation. *J Immunol*; 163:2353-2357. 1999
- Campbell, J. J., Murphy, K. E., Kunkel, E. J., Brightling, C. E., et al. CCR7 Expression and Memory T Cell Diversity in Humans. *The JI* 166: 877-884. 2001
- Carding SR, Hayday AC, Bottomly K. Cytokines in T-cell development. *Immunol Today*; 12: 239. 1991
- Casey TT, Olson SJ, Cousar JB, Collins RD. Immunophenotypes of Reed-Sternberg cells: a study of 19 cases of Hodgkin's disease in plastic-embedded sections. *Blood*;74:2624-2628.1989
- Celluzzi CM, Mayordomo JI, Storkus WJ, Lotze MT, Falo LD Jr. 1996. Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *J. Exp. Med.* 183:283- 87
- Cerwenka, A. et al. Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity* 12, 721-727 (2000).
- Clark EA and Ledbetter JA. Structure, function and genetics of human B cell associated surface molecules. *Adv Cance Res* 52:81, 1981
- Clark EA, Ledbetter JA. Leukocyte cell suraface enzymology: CD45 (LCA T200)is a protein tyrosene phosphatase. *Immunology Today.* 10:225-8, 1989.
- Clevers H, Alarcon B, Wileman T, Terhorst C. The T cell receptor/CD3 complex: A dynamic ensemble. *Annu Rev Immunol.* 6:629, 1988.
- Coates, A, GebSKI, V, Bishop, JF, et al. Improving the quality of life during chemotherapy for advanced breast cancer. A comparison of intermittent and continuous treatment strategies. *N Engl J Med*; 317:1490.1987
- Cohen. P. A., Kim. H., Fowler, D. H., Gress, R. E., et al. Use of interleukin-7, interleukin-2, and interferon-gamma to propagate CD4+ t cells in culture with maintained antigen specificity. *J. Immunother.* 14, 242-252,1993.
- Cohen E. P., and Kim. T. S., Neoplastic cells that express low levels of MHC class I determinants escape host immunity. *semin. Cancer Biol.*, 5, 419-428,1994.
- Cohen. P. A., CD4+ T cells in tumor rejection: past evidence and current prospects. in immunotherapy of cancer with sensitized T Lymphocytes, Chang, A. E. and shu, S., Eds., J. B. Lippincott. Philadelphia. 1994.
- Cohen. P. A., Fowler, D. J., Kim. H., H., White, R. L., et al. Propagation of murine and human T cells with defined antigen specificity and function, in Ciba Foundation Sympossium No. 187: vaccines Against virally Induced Cancers. Frazer, I., Chadwick, D., and Marsh, J., Eds., Wiley & sons Ltd. Chichester. ,179-193. 1994
- Cohen. P. A., The challenge of preparing human dendritic dells for tumor vaccine therapies, *Melanoma Let.*, 15.3-4, 1997.

- Cohen, P.A., Peng, L., Plautz, G. E., Kim, K. K., Weng, D. E., and Shu, S., CD4+ T cells in adoptive immunotherapy and the indirect mechanism of tumor rejection, *crit. Rev. Immunol.*, 20,17-56,2000.
- Coleman, N., H. D. L: Birley, A. M. Renton, N. F. Hanna, B. K. Ryait, M. Byrne, D. Taylor Robinson & M. A. Stanley: Immunological events in regressing genital warts. *Am J Clin Pathol* 102, 768-74 (1994)
- Collins RD. Lymph node examination. *Arch Pathol Lab Med*;109:796-799. 1985
- Collins RD. Is clonality equivalent to malignancy: specifically, is immunoglobulin gene rearrangement diagnostic of malignant lymphoma? [Editorial] *Hum Pathol*;28(7):757-759. 1997
- Colonna M, Brooks EG, Falco M, Ferrara GB, Strominger JL. Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C. *Science* 3; 260:1121-1124. 1994
- Colonna M, Borsellino G, Falco M, Ferrara GB, Strominger JL. HLA-C is the inhibitory ligand that determines dominant resistance to lysis by NK1-and NK2-specific natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 90: 12000-12004. 1993
- Cordier AC, Haumont SM. Development of thymus, parathyroids, and ultimobranchial bodies in NMRI and nude mice. *Am J Anat*; 157:227. 1980
- Cormier, J. N., Hijazi, Y. M., Abati, A., Fetsch, P., et al. Heterogeneous expression of melanoma-associated antigens and HLA-A2 in metastatic melanoma in vivo, *Int. J. Cancer*, 75, 517-524, 1998.
- Cornil, I., Kerbel, R. S., and Dennis, J. W., Tumor cell surface beta 1-4 linked galactose binds to lectin(s) on microvascular endothelial cells and contributes to organ colonization, *J. Cell Biol.*, 111, 773-781, 1990.
- Correa, M. R., Ochoa, A. C., Ghosh, P., Mizoguchi, H., Harvey, L., et al. Sequential development of structural and functional alterations in T cells from tumor-bearing mice, *J. Immunol.*, 158, 5292-5296, 1997.
- Coulomb-L'Hermin A, Amara A, Schiff C, Durand-Gasselini I, Foussat A, Delaunay T, Crispe IN, Moore MW, Husmann LA, Smith L, Bevan MJ, Shimonkevitz RP. Differentiation potential of subsets of CD4-8 thymocytes. *Nature*; 329: 336. 1987
- Crook, T. & K. H. Vousden: HPV oncoprotein function. In: *Papillomavirus Reviews: Current Research on Papillomaviruses*. Ed: C. Lacey, Leeds University Press, Leeds, 55-60 (1996)
- Croft M, Carter L, Swain SL, Dutton RW. Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL) -4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. *J Exp Med* 1994;: 180: 1715.
- Cruz, P. D. and Bergstresser, P. R., Antigen processing and presentation by epidermal langerhans cells, induction of immunity or unresponsiveness. *Dermatol. Clin.*, 8, 633-646,1990.
- Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Bra ckenbury R, Edelman GM. Neural cell adhesion molecule: Structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science*; 236:799. 1987
- Cyster. j. G. Chemokines and Cell Migration in Secondary Lymphoid Organs. *Science* 286: 2098-2102. 1999
- Costanos-Velz E, Biberfeld P, Patarroyo M. Extracellular matrix proteins and integrin receptors in reactive and non reactive lymph nodes. *Immunology.* 86:270-278, 1995.
- Czwrniecki, B. J., Carter, C., Rivoltini, L., Koski, G. K., et al. Calcium ionophore treated peripheral blood monocytes and dendritic cells rapidly display characteristics of activated dendritic cells. *J. Immunol.*, 159, 3823-3837, 1997.
- Czerniecki, B. J., Cohen, P. A., Faries, M., Xu, S., et al. Diverse functional activity of CD83+ monocyte derived dendritic cells and the implications for cancer vaccines, *Crit. Rev. Immunol.*, 21,215-248.2001.



- Chadburn A, Metroka C, Mouradian J. Progressive lymph node histology and its prognostic value in patients with acquired immunodeficiency syndrome and AIDS-related complex. *Hum Pathol*; 20:579-587. 1989
- Chan VW, Kothakota S, Rohan MC, Panganiban-Lustan L. 1999. Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) is chemotactic for mature dendritic cells. *Blood* 93:3610-16
- Chang AE, Karnell LH, and Menck HR. The national cancer database reports on cutaneous and noncutaneous melanoma. A Summary of 84, 836 cases from the past decade. *Cancer*; 83: 1664-78. 1998
- Chang, AE, Karnell, LH, Menck, HR. The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84,836 cases from the past decade. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. *Cancer*; 83:1664. 1998
- Chaux, P., Vantomme, V., Stroobant, V., Thielemans, K., et al. Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4(+) T lymphocytes, *J. Exp. Med.*, 189, 767-778, 1999.
- Chaouat G, Capron F, Ledee N, Galanaud P et al. : Stromal cell-derived factor1 (SDF-1) and antenatal human B cell lymphopoiesis: expression of SDF-1 by mesothelial cells and biliary ductal plate epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:8585-8590.
- Chaplin DD, Yanf-xi F. Cytokine regulation of secondary lymphoid organ development. *Curr Op Immunol*. 10:289-297, 1998.
- Chevinsky, AH, Ferrara, J, James, AG, et al. Prospective evaluation of clinical and pathologic 1990
- Childs CC, Parham DM, Berard CW. Infectious mononucleosis: the spectrum of; 11:122-132. morphologic changes simulating lymphoma in lymph nodes and tonsils. *Am J Surg Pathol* 1987
- Chott A, Kaserer K, Augustin I, et al. Ki-1-positive large cell lymphoma: a clinicopathologic study of 41 cases. *Am J Surg Pathol*; 14:439-448. 1990
- Chou. T., Bertera. S., Chang. A. E., and Shu, S., Adoptive immunotherapy of microscopic and advanced visceral metastases with in vitro sensitized lymphoid cell from mice progressive tumors. *J. Immunol*. 141,1775-1781,1988.
- Chu, KC, Tarone RE, Kessler LG, et al. Recent trends in U.S. breast cancer incidence, survival, and mortality rates. *J Natl Cancer Inst*; 88:1571. 1996.
- Dalloul AH, Arock M, Fourcade C, et al. Human thymic epithelial cells produce interleukin-3. *Blood*; 77:69. 1991
- Dallgleish AG, Beverley PCL, Claphan PR et al. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312:763, 1984
- Damerson KM, Volpert OV, tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin -1. *Science* 1994; 265:1502.; 1:101.
- Dardenne M, Bach JF. Functional biology of thymic hormones. *Thymus Update* 1988
- Davey MP, Waldmann TA. Clonality and lymphoproliferative lesions [Editorial]. *N Engl J Med*:315:509-511. 1986
- Das DK. Lymph nodes. In: Bibbo M, ed. *Comprehensive cytopathology*. Philadelphia: WB Saunders.:671-702. 1991
- DeClerck YA, Yean T-D, Chan D, Shimada H, Langley KE. Inhibition of tumor cell invasion of smooth muscle cell layers by recombinant human metalloproteinase inhibitor. *Cancer Res*; 51:2151. 1991
- De Gruijl. T. D., H. J. Bontkes, M. J. Stukart, J. M. M.: T cell proliferative responses against human papillomavirus type16 E7 oncoprotein are most prominent in cervical intraepithelial neoplasia patients with a persistent viral infection. *J Gen Virol* 77, 2183-91 1996
- DeGregorio. MW, Ford. JM, Benz, CC, Wiebe, VJ, Toremfifene: pharmacologic and pharmacokinetic basis of reversing multidrug resistance. *J Clin Oncol*; 7:1359. 1989

- De Meerleer, GO, Vermeersch, H, van Eijkeren, M, et al. Primary sinonasal mucosal melanoma: three different therapeutic approaches to inoperable local disease or recurrence and a review of the literature. *Melanoma Res*; 8:449. 1998
- DeMatos P, Tyler DS, Seigler HF. Malignant melanoma of the mucous membranes: A review of 119 cases. *Ann Surg Oncol*, 5(8): 733-42. 1998
- De Plaen E, Arden K, Traversi C, Gaforio JJ, Szikora J-P, et al. Structure, chromosomal localization and expression of twelve genes of the MAGE family. *Immuno genetic*, 40:360-369 1994
- De Plaen E, Lurquin C, Brichar V, van der Bruggen P et al. Cloning of genes coding for antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. In *The immunology Methods Manual*. Edited by Lefkowitz I. Academic press Ltd, 692-718. , 1997
- De Smet C, De Backer O, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, Boon T: The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci UsA*, 93: 7149-7153. 1996
- DeVita VT, Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Biologic therapy of cancer*, Philadelphia: JB Lippicott. 1995:1.
- Diefenbach, A., Jamieson, A.M., Liu, S. D., Shastri N. & Raulet, D. H.: Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nature Immunol*. 1, 119-126 (2000).
- Disis, M. L., Schiffman, K., Gooley, T. A., McNeel, D. G., et al. Delayed-type hypersensitivity response is a predictor of peripheral blood T-cell immunity after HER-2/neu peptide immunization. *Clin Cancer Res.*, 6, 1347-1350, 2000.
- Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM.. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J. Exp. Med.* 188:373-86. 1998
- DiMolfetto L, Reilly C, Wei Q, Lo D.. Dendritic-like cells from relB mutant mice. *Adv. Exp. Med. Biol.* 417:47-54. 1997
- Dirección general de epidemiología/Instituto nacional de Cancerología/Asociación Mexicana de Patólogos. Registro Histológico de las neoplasias en México Morbilidad y Mortalidad (bienio 1993-1994). Tendencias 1985-1994. México: Secretaría de salud , 1996
- Doll R *Prevention of Cancer Pointers from epidemiology*. London: The Nuffield Provincial Hospital Trust 1967
- Dorfman RF, Remington JS. Value of lymph-node biopsy in the diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. *N Engl J Med*; 289: 878-881. 1973
- Dorfman RF, Warnke R. Lymphadenopathy simulating the malignant lymphomas. *Hum Pathol*; 5:519-550. 1974
- Dunnon D, Courtois D, Vainio O, et al. Ontogeny of the immune system:  $\gamma/\delta$  and  $\alpha/\beta$  T cells migrate from thymus to the periphery in alternating waves. *J. Exp. Med.*; 186: 977-988. 1997
- Dupuis M, Schaerer E, Krause KH, Tschopp J. The calcium-binding protein calreticulin is a major constituent of lytic granules of cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med*; 177:1-7. 1993
- Eremin O, Roberts P, Plumb D, Stephens P. Human regional tumor lymph nodes: alterations of microarchitecture and lymphocyte subpopulations. *Br J Cancer*. 40:62-72, 1980.
- Ebnet K, Kaldjian EP, Anderson AO, Shaw S. Orchestrated information transfer underlying leukocyte endothelial interactions. *Annu Rev Immunol*; 14: 155. 1996
- Elewaut, D., Brossay, L., Santee, S. M., Naidenko. Membrane Lymphotoxin Is Required for the Development of Different Subpopulations of NK T Cells. *The JI* 165:671-679 2000
- Entinghausen, S. E., Lipford, E. H., III, Mule, J. J., and Rosenberg, S. A., Systemic administration of recombinant interleukin 2 stimulates in vivo lymphoid cell proliferation in tissues. *J. immunol.*, 135. 1488-1497, 1985.

- Ettinghausen, S. E., Lipford, E. H., III, Mule, J. J., and Rosenberg, S. A., Recombinant interleukin 2 stimulates in vivo proliferation of adoptively transferred lymphokine-activated killer (LAK) cells, *J. Immunol.*, 135, 3623-3635, 1985.
- Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon- $\gamma$  and its receptor. *Annu Rev Immunol*; 11:571. 1993
- Ferrone, S. and Marincola, F. M., Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance, *Immunol. Today*, 16,487-494,1995.
- Fessler L, Duncan K, Triggvason K. Identification of the procollagen IV cleavage products produced by specific tumor collagenase. *J Biol Chem*; 259:9783. 1984
- Fidler, I. J., and Bucana, C., Mechanism of tumor cell resistance to lysis by syngeneic lymphocytes, *Cancer Res.*, 37, 3945-3656, 1977.
- Fidler I J, Gersten Dm, Hart IR. The biology of cancer invasion and metastasis. *Adv Cancer Res*; 28:149. 1978
- Fidler I J. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res*; 38:2651. 1978
- Fidler, I. J., Recognition and destruction of target cells by tumoricidal macrophages, *Isr. J. Med. Sci.*, 14, 177-191, 1978.
- Fidler I J, poste G. The cellular heterogeneity of malignant neoplasms: implications for adjuvant chemotherapy. *Semin Oncol*; 12:207. 1985
- Fidler, I.Fogler, W. E., Kleinerman, E. S., and Saiki, I., Abrogation of species specificity for activation of tumoricidal properties in macrophages by recombinant mouse or human interferon-gamma encapsulated in liposomes, *J. Immunol.*, 135,4289-4296, 1985.
- Fidler I J, Balch CM. The biology of cancer metastasis and implications for therapy. *Curr Probl Surg*; 24:137. 1987
- Fidler I J. Critical factors in the biologic of human cancer metastasis: twenty-eighth GHA Clowes memorial award lecture. *Cancer Res*; 50:6130. 1990
- Fidler I J. Modulation of the organ microenvironment of cancer metastasis (editorial). *J Natl Cancer Inst*; 84:1588. 1995
- Fidler I J, Ellis LM. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell*; 79:185. 1994
- Fischer M, MacNeil I, Suda T, Cupp JE, Shortman K, Zlotnik 1991
- Fisher B, Fisher Er. The interrelationship of hematogenous and lymphatic tumor cell dissemination. *Surg Gynecol Obstet* 1996; 122:791.
- Force, W.R., Glass, A. A., Benedict, C. A., Cheung, T. C., Lama, J., Ware, C. F., (). Discrete Signaling Regions in the Lymphotoxin-beta Receptor for Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor Binding. Subcellular Localization, and Activation of Cell Death and NF-kappa B Pathways. *J. Biol. Chem.* 275:11121-11129 2000
- Fu Y-X and Chaplin DD. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu Rev Immunol.* 17:399-43328, 1999.
- Fowkes BJ, Pardoll DM. Molecular and cellular events of T cell development. *Adv Immunol*;44:287. 1989
- Frey. A. B. And Cestari. S., killing of rat adenocarcinoma 13762 in situ by adoptive transfer of CD4+ anti-tumor expression of cell surface MHC class II molecules, *cell immunol.* 178, 79-90, 1997.
- Fu YX, Chaplin DD: Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:399-433.
- Garcia-Penarrubia. P., Bankhurst, A. D., and Koster, F. T., Prostaglandins from human T suppressor/cytotoxic cells modulate natural killer antibacterial activity, *J. Exp. Med.*, 170, 601-606, 1989.

- Garni-Wagner BA, Purohit A, Mathew PA, Bennett M, Kumar V. A novel function-associated molecule related to non-MHC-restricted cytotoxicity mediated by activated natural killer cells and cells. *J Immunol*; 151:60-70. 1993
- Gattoni-Celli S, Kirsh K, Timpane R, Isselbacher KJ. Beta 2-microglobulin gene is mutated in a human colon cancer cell line (HCT) deficient in the expression of HLA class I antigens on the cell surface. *Cancer Res* 52:1201-1204. 1992;
- Gimmi CD, Morrison BW, Mainprice BA, Gribben JG, Boussiotis VA, Freeman GJ, Park SY, Watanabe M, Gong J, Hayes DF et al: Breast cancer-associated antigen, DF3/MUC1, induces apoptosis of activated human T cells. *Nat Med*, 2: 1367-1370. 1996
- Galy A, Travis M, Cen D, Chen B. 1995. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 3:459-73
- Grouard G, Risoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. 1997. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J. Exp. Med.* 185:1101-11
- Gelmon, K. The taxoids: paclitaxel and docetaxel. *Lancet* 1994; 344:1267.
- GK. Green, S, Schulman, S, et al. Alternating weekly doxorubicin and 5-fluorouracil/leucovorin followed by weekly doxorubicin and daily cyclophosphamide in stage IV breast cancer. A Southwest Oncology Group study. *Cancer* 1991; 68:934.
- Greenblatt M, Shubik P. Tumor angiogenesis: transfiltered diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J Natl Cancer Insts* 1968; 41:111.
- Greenlee, RT, Hill-Harmon, MB, Murray, T, Thun, M. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 2001; 51:15.
- Gluckman JL, Crissman JD, Donegan JO. The surgical management of early oral cavity cancers. In; Johnson JT, Didolkar MS eds. *Head and Neck Cancer*. Vol 3 Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science 1003:329-331
- Gluckman JL Management of advanced cancer of head and neck. In: Gates G ed. *Current Therapy In Otolaryngology- Head And Neck Surgery*. Vol 3. Trento NJ:BC Decker Inc:1986:99-102
- Gaffey, MJ, Mills, SE, Frierson, HF, et al. Medullary carcinoma of the breast: Interobserver variability in histopathologic diagnosis. *Mod Pathol* 1995; 8:31
- Gasparini, G, Pozza, F, Harris, A. Evaluating the potential usefulness of new prognostic and predictive indicators in node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:1206.
- Girolomoni, G., Simon, J. C., Bergstresser, P. R., and Cruz, P. D., Jr., Freshly isolated spleen dendritic cells and epidermal Langerhans cells undergo similar phenotypic and functional changes during short-term culture, *J. Immunol.*, 145, 2820-2826, 1990.
- Greenblatt M. Shubik P. Tumor angiogenesis: transfiltered diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J Natl Cancer Insts*: 41:111. 1968
- Gorman SD, Sun YH, Zamoyska R and Parnes JR. Molecular linkage of Ly-3 and Ly-2 genes: requirement for Ly-2 and Ly-3 surface expression. *J Immunol* 140:3646, 1988
- Gluckman JL, Crissman JD, Donegan JO. The surgical management of early oral cavity cancers. In; Johnson JT, Didolkar MS eds. *Head and Neck Cancer*. Vol 3 Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science 1999:1003:329-331.
- Gluckman JL Management of advanced cancer of head and neck. In: Gates G ed. *Current Therapy In Otolaryngology- Head And Neck Surgery*. Vol 3. Trento NJ:BC Decker Inc:1986:99-102.
- Gunn, M. D., Kyuwa, S., Tam, C., Kakihuchi, T., () et al. Mice Lacking Expression of Secondary Lymphoid Organ Chemokine-Have Defects in Lymphocyte Homing and Dendritic Cell Localization. *J. Exp. Med.*, 189: 451-460. 1999
- Hass GG Jr, D'Cruz OJ, De Bault LE: Distribution of human leucocyte antigen-ABC and -D/-R antigen in the unfixed human testis. *Am J Reprod Immunol Microbiol*, 18: 47-51. 1988

- Haynes BF, Denning SM, Le PT, Singer KH. Human intrathymic T Cell differentiation. *Semin Immunol*; 2:67. 1990
- Haynes BF, Martin ME, Kay HH, Kurtzberg J. Early events in human T cell ontogeny, Phenotypic characterization and immunohistology: localization of T cell precursor in early human fetal tissues [published erratum appears in *J Exp Med* 1989 Feb 1;69(2): 603]. *J Exp Med*; 168: 1061. 1988
- Haynes BF, Emenbarth GE and Fauci AS, Human lymphocyte antigens: Production of monoclonal antibodies that defines functional thymus derived lymphocyte subsets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 76:5829, 1979:
- Hadden JW. The Immunopharmacology of head and neck cancer: An update *Int J immunopharmacol*. 19:629-644, 1997.
- Hein DW, Moy RL. Elective lymph node dissection in stage I malignant melanoma: a meta-analysis. *Melanoma Res*; 2:273. 1992
- Hendricks T, Martens MF, Huyben CM, Wobbes T. Inhibition of basal and TGF- $\beta$  healing. *Br J Cancer*; 67:545. 1993
- Hercend T, Griffin JD, Bensusan A, et al. Generation of monoclonal antibodies to a human natural killer clone: Characterization of two natural killer associated antigens, NKH1A and NKH2, expressed on subsets of large granular lymphocytes. *J Clin Invest*; 75:932. 1985
- Himmelstein BP, Canete-Soler R, Bernhard EJ, Dilks DW, Muschel RJ. Metalloproteinases in tumor progression: the contribution of MMP-9 Invasión Metastasis -95; 14:246. 1994
- Hjelmström, P. (). Lymphoid neogenesis: de novo formation of lymphoid tissue in chronic inflammation through expression of homing chemokines. *J Leukoc Biol*. 69: 331-339 2001
- Hjelmström, P., Fjell, J., Nakagawa, T., Sacca, R., () et al. Lymphoid Tissue Homing Chemokines Are Expressed in Chronic Inflammation. *Am. J. Pathol.*, 156: 1133-1138. 2000
- Holmes K, Fowlkes BJ. Preparation of cells and reagents for flow cytometry In: *Curr Protocol in Immunol*. Wiley Inter Science (Ed)1991;15.31-5.3.8.
- Honda, K., Nakano, H., Yoshida, H., Nishikawa, S., Molecular Basis for Hematopoietic/Mesenchymal Interaction during Initiation of Peyer's Patch Organogenesis. *J. Exp. Med*. 193: 621-630 2001.
- Horak E, Leck R, Klenk N, et al. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as an indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet*; 340:1120. 1992
- Hsu FJ, Caspar CB, Czerwinski D, Kwak LW, et al: Tumor-specific idiotype vaccines in the treatment of patients with B-cell lymphoma. Long-term results of a clinical trial. *Blood*, 89: 3129-3135. 1997
- Huang E, Novka K, Beier DR, et al. The hematopoietic growth factor KL is encoded by the S1 locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus. *Cell*; 63:225 1990
- Huang S, Terstappen LWMM. Formation of both hematopoietic microenvironment and hematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. *Nature*; 360: 745. 1992
- Huang, A. Y., Bruce A. T., Pardoll, D. M., and Levisky, H. I., In vivo cross-priming of MHC class I-restricted antigens requires the TAP transporter. *Immunity*, 4. 349-355, 1996.
- Ikeda H, Lethé B, Lehmann F, Van Baren N, Baurain J-F, De Smet C, et al: Characterization of and antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity*. 6: 199-208 1997
- Ikuta K, Kina T, MacNeil I, et al. A developmental switch in thymic lymphocyte maturation potential occurs at the level of hematopoietic stem cells. *Cell*; 62: 863-874. 1990
- Imhof BA, Dunnon D. Leukocyte migration and adhesion. *Adv Immunol*; 58: 345. 1995
- Ioannides CG, Whiteside TL. T cell recognition of human tumors: implications for molecular immunotherapy of cancer. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 66:91-106.
- Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. The interferon *Proc R Soc Lond [Biol]*; 147:258. 1957

- Jessss RH, Fletcher GH. Treatment of the neck in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*. 39:868-872, 1977.
- Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X et al. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science*. 276:1423-1425, 1997.
- Jenkinson EJ, Kingston R, Smith CA, Williams GT, Owen JJ. Antigen-induced apoptosis in developing T cells: a mechanism for negative selection of the cell receptor repertoire. *Eu J Immunol*; 19:2175. 1989
- Jerome KR, Domenech N, Finn OJ: Tumor-specific cytotoxic T cell clones from patients with breast and pancreatic adenocarcinoma recognize EBV-immortalized B cells transfected with polymorphic epithelial mucin cDNA. *J. Immunol*, 151: 1654-1662. 1993
- Jonuleit, H., Knop, J., and Enk, A. H., Cytokines and their effects on maturation, differentiation and migration of dendritic cells, *Arch. Dermatol. Res.*, 289, 1-8, 1996.
- Jung T. M. and Dailey M. O., Reversibility of loss of homing receptor expression following activation, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 237, 519-524, 1988.
- Jung, T. M. and Dailey, M. O., Rapid modulation of homing receptors (gp90MEL-14) induced by activators of protein kinase C. Receptor shedding due to accelerated proteolytic cleavage at the cell surface, *J. Immunol.*, 144, 3130-3136, 1990.
- Jung, T. M., Gallatin, W. M., Weissman, I. L., and Dailey, M. O., Down-regulation of homing receptors after T cell activation, *J. Immunol.*, 141, 4110-4117, 1988.
- Kagi D, Ledermann B, Burki K, et al. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 369:31-37. 1994;
- Kamamura, Y., Takahashi, K., Komaki, K., and Monden, Y., Effects of interferon-alpha and gamma on development of LAK activity from mononuclear cells in breast cancer patients, *J. Med. Inves.*, 45, 71-75, 1998.
- Kander, B. R., Acevedo, J., and Streilein J. W., Local T Helper cell signals by lymphocytes infiltrating intraocular tumors, *J. Immunol.*, 148, 1955-1963, 1992.
- Kannan K, Stewart RM, Bounds W, et al. Lysosome-associated membrane proteins h-LAMP1 (CD107a) and H-LAMP2 (CD107b) are activation-dependent cell surface glycoproteins in human peripheral blood mononuclear cells which mediate cell adhesion to vascular endothelium. *Cell Immunol*; 171:10-19. 1996
- Karrer Y, Athage A, Odermatt B, Roberts CWM, Korsmeyer SJ, Miyawaki S, Hengartner H, Zinkemagel RM: On the key role of secondary lymphoid organs in antiviral immune responses studied in lymphoplastic (aly/aly) and spleenless (hox 11 (-/-) ) mutant mice. *J Exp Med*; 185:2157-2170. 1997
- Katano M, Nakamura M, Morisaki T, Fujimoto K: Melanoma antigen-encoding gene-1 expression in invasive gastric carcinoma: correlation with stage of disease. *J. Surg Oncol*, 64: 195-201. 1997
- Kawabata K, Ujikawa M, Egawa T, Kawamoto H, Tachibana K, Isaza H, Katsura Y, Kishimoto T, Nagasawa T: A cell-autonomous requirement for CXCR4 in long-term lymphoid and myeloid reconstitution. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96: 5663-5667. 1999
- Kelsoe G. Life and death in germinal centers (redux). *Immunity* ; 4: 107. 1996
- Kelly KA, Scollay R: Seeding of neonatal lymph nodes by T cells and identification of a novel population of CD3-CD4+ cells. *Eur J Immunol*; 22:329-334. 1992
- Kendall MD. Functional anatomy of the thymic microenvironment. *J. Anat*; 177:1. 1991
- Kim D, Mebius RE, MacMicking JD, Jung S, Cupedo T, Castellanos Y, et al: Regulation of peripheral lymph node genesis by the tumor necrosis factor family member TRANCE. *J Exp Med*; 192:1467-1478. 2000
- Kim SH, Carney DF, Papadimitriou JC, Shin ML. Effect of osmotic protection on nucleated cell killing by C5b: cell death is not affected by the prevention of cell swelling. *Mol Immunol*; 26:323-331. 1989

- Kim, D., Mebius, R. E., MacMicking, J. D., Jung, S., Cupedo, T., Castellanos, y., Rho, J., Wong, B. R., Josien, R., Kim, N., Rennert, P. D., Choi, Y. (). Regulation of peripheral Lymph Node Genesis by the tumor Necrosis Factor Family Member TRANCE. *J Exp. Med.* 192:1467-1478 2000
- Kimber, I. and Cumberbatch, M., Stimulation of Langerhans cell migration by tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), *J. Invest. Dermatol.*, 99, 48S-50S, 1992.
- Kinkade PW, Lee G, Pietrangeli CE, Hayashi S, Gimble JM. Cells and molecules that regulate B lymphopoiesis in bone marrow. *Annu Rev Immunol*, 7:111. 1989
- Kjaergaard, J. and Shu, S., Tumor infiltration by adoptively transferred T cells is independent of immunologic specificity but requires down-regulation of L-selectin expression, *J. immunol.*, 163, 751-759, 1999.
- Kleijmeer, M. J., Ossevoort, M. A., van Veen, C. J., van Hellemond, J. J., et al. MHC class II compartments and the kinetics of antigen presentation in activated mouse spleen dendritic cells, *J. Immunol.*, 154,5715-5724,1995.
- Kodowaki T, Shiozaki H, inoue M, et al. E-cadherin and  $\alpha$ -catenin expression in human esophageal cancer. *Cancer Res*; 54:291. 1994
- Kohn Ec, Liotta LA. Molecular insights into cancer invasion: strategies for prevention and intervention. *Cancer Res*; 55:1856. 1995
- Korkolopoulou P, Kaklamanis L, Pezzella F, Harris AL, Gatter KC. Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer. *Br J Cancer*; 73:148-153. 1996
- Koski, G. K., Schwartz, G. N., Weng, D. E., Czerniecki, B. J., et al. Calcium mobilization in human myeloid cells results in acquisitions of individual dendritic cell-like characteristics thorough discrete signaling pathways. *J. Immunol.*, 163, 82-92, 1999.
- Koski, G. K., Schwartz, G. N., Weng, D. E., Gress, r. E., et al. Calcium ionophore-treated myeloid cells acquire many dendritic cell characteristics independent of prior differentiation state, transformation status or sensitivity to biologic agents, *Blood*, 94, 1359-1371, 1999.
- Kraehenbuhl, J-P., Neutra. M. R. (). EPITHELIAL M CELLS: Differentiation and Function . *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:301-332. 2000
- Kelsoe G, Life and death in germinal center (redux). *Immunity*.4:107-111, 1996.
- Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD: A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*; 53:45-53. 1988
- Kugler, A., Stuhler, G., Walden, P., Zoller, G., et al. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids, *Nat. Med.*, 6,332-336,2000.
- Kummer JA, Kamp AM, Citarella F, Horrevoets AJG, Hack CE. Expression of human recombinant granzyme A zymogen and its activation by the cysteine proteinase cathepsin C. *J Biol Chem*: 271:9281-9286. 1996
- Kurebayashi. S., Ueda. E., Sakaue, M., Patel, D. D., Medvedev, A., Zhang, F., Jetten, A.M. (). Retinoid-related orphan receptor gamma (RORgamma) is essential for lymphoid organogenesis and controls apoptosis during thymopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:10132-10137. 2000
- Lainer LL, Yu G, Phillips JH. Co-association of CD3 zeta with a receptor (CD16) for IgG Fc on human natural killer cells. *Nature*; 342: 803-805. 1989
- Lancey CJN assessment of exposure to sexually transmitted agents other than human papillomavirus. In: Munoz N, Bosch FX, Shah KV, Meheus A, eds. The epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus. Lyon: IARC.:93. 1992
- Lanier LL, Chang C, phillips JH. Human NKR-PIA. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. *J Immunol*; 153:2417-2428. 1994
- Lanier, L. L. NK cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 359-393 (1998).

- Lanier LL, Philips JH, Hackett J Jr, Tutt M, Kumar V. Natural Killer cells: Definition of a cell type rather than a function [errata *J Immunol* 1987; 138: 996 and 1987; 138: 2745]. *J Immunol*; 137: 2735-9. 1986
- Liu YJ, Grouarrrd G, de Boutellier O, Banchereau J. Follicular dendritic cells and germinal centers. *In Rev Cytolk.* 166:139-79, 1996.
- Le PT, Lazorick S, Wichard LP, et al. Human thymic cells produce IL-6, granulocyte - monocyte-CSF, and leukemia inhibitory factor. *J. Immunol*; 145: 3310. 1990
- Levin G, Bearman R. Electron microscopy of the human thymus. In: Johannessen J, ed. *Electron microscopy in human medicine.* New York: McGraw-Hill, 1980:5.
- Li, J., Peet, G.W., Balzarano, D., Li, X., Massa, P., Barton, R. W., Marcu, K. B. (). Novel NEMO/Ikappa B Kinase and Nf-kappa B Target Genes at the pre-B to Immature B Cell Transition. *J. Biol. Chem.* 276:18579-18590. 2001
- Lores B, Garcia-Estebez JM, Arias C. Lymph nodes in Human Tumors (review). *Int J Mol Med.* 1:729-33, 1998.
- Lindhout, E., Figdor, C. G., and Adema, G. J., Dendritic cells: migratory cells that are attractive, *cell Adhes. Commun.*, 6, 117-123, 1998.
- Liotta LA, Mandler R, Murano G, et al. Tumor cell autocrine motility factor: Proc Natl Acad Sci USA; 83:3302. 1986
- Liotta LA, Stetler-Stevenson WG, Metalloproteinases and cancer invasion. *Semin Cancer Biol*; 1:107. 1990
- Liotta LA, Thorgeirsson UP, Garbisa S. Role of collagenases in tumor cell invasion. *Cancer Metastasis Rev*; 1:227. 1982
- Liotta LA, Tumor invasion and metastasis: role of the extracellular matrix, Rhoads memorial award lecture. *Cancer Res* 6; 46:1. 198
- Liu YJ, Grouard G, de Boutellier O, Banchereau J: Follicular dendritic cells and germinal centers. *Int Rev Cytol*; 166:139. 1996
- Liu YJ, Johnson GD, Gordon J, MacLennan IC. Germinal centers in T-cell dependent antibody responses. *Immunol Rev*; 126:143. 1992
- Liwin V, Gumperz J, Parham P, Philips JH, Lanier LL. NKB1: A natural Killer cell receptor involved in the recognition of polymorphic HLA-B molecules. *J Exp Med*; 180:537-543. 1994
- Lobach DF, Hensley LL, Ho W, Haynes BF. Human T cell antigen expression during the early stages of fetal thymic maturation. *J Immunol*; 135: 1752. 1985
- Lobach DF, Scearce RM, Haynes BF. The human thymic microenvironment: Phenotypic characterization of Hassall's bodies with the use of monoclonal anti -bodies. *J. Immunol*; 134:250. 1985
- Lopez-Botet, M., Moretta, L., and Strominger, J., NK-cell receptors and recognition of MHC class I molecules, *Immunol. Today*, 17, 212-214, 1996.
- Lotan, R. and Raz, A., Endogenous lectins as mediators of tumor cell adhesion, *J. Cell Biochem*, 37. 107-117, 1998.
- Lowin B, Mattman C, Hahne M, Tschopp J. Comparison of fas ( Apo-1/CD95) and perforin-mediated cytotoxicity in primary T lymphocytes. *Int Immunol*; 8:57-63. 1996
- Luqman M, Bottomly K. Activation requirements for CD4+ T cells differing in CD45R expression. *J Immunol*; 149: 2300. 1992
- Lustgarten J, Theobald M, Iabadic C, LaFace D, et al: identification of Her-2/neu CTL epitopes using double transgenic mice expressing HLA-A2.1 and human CD.8. *Hum Immunol*, 52: 109-118. 1997
- Laad AD, Thomas ML, Fakih AR, and Chiplunkar SV. Human gamma delta cells recognize heat shock protein-60 on oral tumor cells. *Int J Cancer.* 80 709-714, 1999.
- Lutzelschwab C, Pejler G, Aveskogh M, Hellman L. Secretory granule proteases in rat mast cells. Cloning of 10 different serine proteases and a carboxypeptidase from various rat mast cell populations. *J Exp Med*; 184:13-29.



- Lyakh, L., Koski, G. K., Telford, W., Gress, R. E., et al. Bacterial LPS, TNF-alpha and calcium ionophore under serum-free conditions promote dendritic cell-like differentiation in CD4+ monocytes through distinct pathways that converge on NF-KB. *J. Immunol.*, 165, 3647-3655, 2000.
- Lapointe H, Lampe H, Banerjee D. Head and neck squamous cell carcinoma cell line-induced suppression of in vitro lymphocyte proliferative response. *Otolaryngol Head and Neck Surg.* 106:149-58, 1992.
- Ma Q, Jones D, Springer TA: The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic Precursors within the bone marrow microenvironment. *Immunity*; 10:463-471. 1999
- Mackey, M. f., Barth, R. J., and Noelle, R. J., The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cells, *J. LeuRoc. Biol.*, 63, 418-428, 1998.
- Mackey, M. F., Gunn, J. R., Maliszewsky, C., Kikutani, H., et al. Dendritic cells require maturation via CD40 to generate protective antitumor immunity. *J. Immunol.*, 161, 2094-2098, 1998.
- MacLennan ICM: Germinal centers. *Annu Rev Immunol.* 12:117-139, 1994.
- MacLennan IC, Liu YJ, Johnson GD. Maturation and dispersal of B-cell clones during T cell-dependent antibody responses. *Immunol Rev*; 126: 143. 1992
- Matsuyama, S., and Reed, J. C. Mitochondria-dependent apoptosis and cellular pH regulation. *Cell Death Differ*, 7:155-165., 2000
- Matsuyama, S., and Reed, J. C. Mitochondria-dependent apoptosis and cellular pH regulation. *Cell Death Differ*, 7:155-165., 2000
- Murray M, Schilo BZ, Shih C et al. Three different human tumor cell lines contain different oncogenes *Cell* 25:355-357, 1981
- Moretta, A., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M.C. & Moretta, L. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunol. Today* 21, 228-234 (2000).
- McLellan AD, Starling GC, Williams LA, Hock BD, Hart DN. 1995. Activation of human peripheral blood dendritic cells induces the CD86 co-stimulatory molecule [published erratum appears in *Eur. J. Immunol.* 1995 Dec;25(12):3525]. *Eur. J. Immunol.* 25:2064-68
- Murray M, Schilo BZ, Shih C et al. Three different human tumor cell lines contain different oncogenes *Cell* 25:355-357, 1981
- Moretta, A., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M.C. & Moretta, L. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunol. Today* 21, 228-234 (2000).
- Moodycliffe AM, Nghiem D, Clydesdale G, Ulrich SE. Immunosuppression and skin cancer development: regulation by NKT cells. *Nature Immunol.* 1;521-525:2000
- Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature.* 410:50-56, 2001.
- McLellan AD, Starling GC, Williams LA, Hock BD, Hart DN. 1995. Activation of human peripheral blood dendritic cells induces the CD86 co-stimulatory molecule [published erratum appears in *Eur. J. Immunol.* 1995 Dec;25(12):3525]. *Eur. J. Immunol.* 25:2064-68
- Munoz N, Bosch FX, Shah KV, Meheus A. eds. The epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus. Lyon: IARC. 1992:93.
- Mayordomo JI, Zorina T, Storkus WJ, Zitvogel L, Celluzzi C, Falo LD, Melief CJ, Ildstad ST, Kast WM, Deleo AB, et al. 1995. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat. Med.* 1:1297-1302

- Metlay JP, Witmer-Pack MD, Agger R, Crowley MT, Lawless D, Steinman RM. 1990. The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* 171:1753-71
- Mehta-Damani A, Markowicz S, Engleman EG. 1995. Generation of antigenspecific CD4+ T cell lines from naive precursors. *Eur. J. Immunol.* 25:1206-11
- Mehta-Damani A, Markowicz S, Engleman EG. 1994. Generation of antigen-specific CD8+ CTLs from naive precursors. *J. Immunol.* 153:996-1003
- Macatonia SE, Taylor PM, Knight SC, Askonas BA. 1989. Primary stimulation by dendritic cells induces antiviral proliferative and cytotoxic T cell responses in vitro. *J. Exp. Med.* 169:1255-64
- Maldonado-Lopez R, De Smedt T, Michel P. 1999. CD8 $\alpha^+$  and CD8 $\alpha^-$  subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J. Exp. Med.* 189:587-92
- Marquez C, Trigueros C, Franco JM, Ramiro AR, 1998. Identification of a common developmental pathway for thymic natural killer cells and dendritic cells. *Blood* 91:2760-71
- MacLennan ICM: Germinal Centers. *Annu Rev Immunol*; 12:117-139. 1994
- Mandrizzato S, Brasseur F, Andry G, Boon T, van der Bruggen P: A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma. *J. Exp. Med.*, 186: 785-793. 1997
- Manuelidis, L., Zaitsev, I., Koni, P., Yun Lu, Z., Flavell, R. A., Fritch, W. (). Follicular Dendritic Cells and Dissemination of Creutzfeldt-Jakob Disease. *J. Virol.* 74:8614-8622 . 2000
- Maurer, H., McIntyre, O. R., and Rueckert, F., spontaneous regression of malignant melanoma. Pathologic and immunologic study in a ten year survivor, *Am. J. surg.*, 127,397-403,1974.
- McGrath KE, Koniski AD, Maltby KM, McGann JK, Palis J: Embryonic expression and function of the chemokines SDF-1 and its receptor, CXCR. *Dev Biol*; 213:442-456. 1999
- MacLennan. ICM, The structures and function of secondary lymphoid tissue. In Clinical Aspects of Immunology. Lanchmann P, Petrs F, Rosen F and Walport MJ. Eds. Blackwell Scientific Publications Boston 5<sup>th</sup> Ed Voll p13, 1993
- Mebius RE, Rennert P, Weissman IL: Developing lymph nodes collect CD4+CD3- LT $\beta$ + cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells. *Immunity*; 7:493-504. 1997
- Melchers F. Three waves of B lymphocyte development during embryonic development in the mouse. *INSERM symp*; 10:281. 1979
- Michalek, M. T., Grant, E. P., Gramm, C., Goldberg, A. L., et al. A role for the ubiquitin-dependent proteolytic pathway in MHC class I-restricted antigen presentation, *Nature*, 363,552-554, 1993.
- Miki, S., Ksander, B., and Streilein, j. W., Studies on the minimum requirements for in vitro "cure" of tumor cells by cytotoxic T lymphocytes, *Reg. Immunol.*, 4, 352-362,1992.
- Miller JFAP. Immunological function of the thymus. *Lancet*; 2:748. 1961
- Mitchell, M. S., Relapse in the central nervous system in melanoma patients successfully treated with biomodulators. *J. Clin. Oncol.*, 7,1701-1709,1989.
- Miyawaki S, Nakamura Y, Suzuca H, Koba M, Yasumizu R, Ikehara S, Shibata Y: Anew mutation, aly, that induces a generalized lack of lymph nodes accompanied by immunodeficiency in mice. *Eur J Immunol*; 24:429-434. 1994
- Mizoguchi, H., O'Shea, J. J., Longo, D. L., Loeffler, C. M., McVicar, D. W., et al. Alterations in signal transduction molecules in T lymphocytes from tumor-bearing mice. *Science*, 258, 1795-1798, 1992.
- Moore KW, O' Garra A, dde Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*; 11:165. 1993
- Moore MA, Owen JJ. Experimental studies on the development of the thymu. *J Ex. Med.*, 126:715. 1967;

- Moretta, A., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M.C. & Moretta, L. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediate cytotoxicity. *Immunol. Today* 21, 228-234 (2000).
- Matloubian M, Concepcion RJ, Ahmed R. CD4+ T cells are required to sustain cytotoxic T cell responses during chronic viral infection. *J Virol.* 68:8056-8063, 1994.
- Moretta, A., Biassoni, R., Bottino, C., Pende, D., Vitale, M., et al. L., Major histocompatibility complex class I-specific receptors on human natural killer and T lymphocytes, *Immunol. Rev.*, 155,105-117,1997.
- Moretta, A., Parolini, S., Castriconi, R., Bottino, C., et al. Function and specificity of human natural killer cell receptors, *Eur. J. Immunogenet.*, 24,455-468, 1997.
- Moretta, A., Sivori, S., Ponte, M., Mingari, M. C., et al. Stimulatory receptors in NK and T cells, *Curr. Top. Microbiol., Immunol.*, 230,15-23,1998.
- Moss ML, Jin S-LC, Milla ME, Burkhart W, Carter HL, Chen W-J, et al: Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumor-necrosis factor-alpha. *Nature* 385: 733-736. 1997,
- Moretta A, Biassoni R, Bottino C, Moretta L. Surface receptors delivering opposite signals regulate the function of human NK cells. *Sem Immunol.* 12:129-138, 2000.
- Mukherji B, Nashed AL, G'hua A, Ergin MT. Regulation of cellular immune response against autologous human melanoma: mechanism of induction and specificity of supression. *J Immunol*:136:1893-8. 1986
- Mule, J. J., Asher, A., A McIntosh, J., Lafreniere, R., et al. Antitumor effect of recombinant tumor necrosis factor-alpha against murine sarcomas at visceral sites: tumor size Influences the response to therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 26, 202-208, 1998.
- McHeyzer-William MG, Davis MM. Antigen specific development of primary and memory T cells in vivo *Science.* 268:106-111, 1995.
- Mori M, Mimori K, Inoue H, Barnard G.F, et al.. Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain rection. *Cancer Res.*15:3417-20. 1995.
- Murphy, G. P., Tjoo, B. A., Simmons, S. J., Ragde, H., et al. Phase II prostate cancer vaccine trial: report of a study involving 37 patients with disease recurrence following primary treatment, *prostate*, 39, 54-59, 1999.
- Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, et al: FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95(FAS/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 1996, 85: 817-827.
- Nagata, S. and Golseint, P., The Fas death factor, *Science*, 267, 1449-1456, 1995.
- Nalefski EA, Falke JJ. The C2 domain calcium-binding motif:Structural and functional diversity. *Protein Sci.* 5:2375-2390. 1996
- Nestle, F. O., Aljagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., et al. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells, *Nat. Med.*, 4, 328-332,1998.
- Neumann, E., Engelsberg, A., Decker, J.,Storkel, S., et al. Heterogeneous expression of the tumor-associated antigens RAGE-1, PRAME, and glycoprotein 75 in human renal cell carcinoma: candidates for T-cell-based immunotherapies? *Cancer Res.*, 58,4090-4095,1998.
- Ngo, V. N., Korner, H., Gunn, M. D., Schmidt, K. N., () et al. Lymphotoxin alpha/beta and Tumor Necrosis Factor Are Required for Stromal Cell Expression of Homing chemokines in B and T Cell Areas of the Spleen. *J. Exp. Med.*, 189: 403-412. 1999
- Nicolson GL., Metastatic tumor cell interactions with endothelium, basement membrane, and tissue. *Curr Opin Cell Biol*: 1:1009. 1989
- Nitta T, Yagita H, Sato K, Okumura K. Involvement of CD56 (NKH1/Leu-19 antigen) as and adhesion molecule in natural killer-target cell interactions. *J Exp Med*; 170:1757. 1989
- Noguchi Y, Chen Y-T, Old LJ: A mouse mutant p53 product recognized by CD4+ and CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91: 3171-3175. 1994
- Nort RJ. Down-regulation of the anti-tumor immune response. *Adv Cancer Res* ;45:1-3. 1985

- Nicolson GL., Metastatic tumor cell interactions with endothelium, basement membrane, and tissue. *Curr Opin Cell Biol* 1989; 1:1009.
- Nabholtz, JM, Senn, HJ, Bezwoda, WR, et al. Prospective randomized trial of docetaxel versus mitomycin plus vinblastine in patients with metastatic breast cancer progressing despite previous anthracycline-containing chemotherapy. 304 Study Group. *J Clin Oncol* 1999; 17:1413.
- Ntzilas, G, Papadimitriou, C, Dafni, U, et al. Dose-dense sequential chemotherapy with epirubicin and paclitaxel versus the combination, as first-line chemotherapy, in advanced breast cancer: a randomized study conducted by the Hellenic Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 2001; 19:2232.
- P D Nogushii. Use of Flow Cytometry for DNA analysis. In: *Curr Protocol in Immunol*. Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulles DH, Shevac EM, Strober W. (Eds) Wiley Interscience New York USA. 1991:5.7.1-5.7.5
- Nonacs R, Humborg C, Tam JP, Steinman RM. 1992. Mechanisms of mouse spleen dendritic cell function in the generation of influenza-specific, cytolytic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 176:519-29
- Nussenzweig MC, Steinman RM, Witmer MD, Gutchinov B. 1982. A monoclonal antibody specific for mouse dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:161-65
- Norbury CC, Chambers BJ, Prescott AR, Ljunggren HG, Watts C. 1997. Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 27:280-88
- O'Brien CJ, Smith JW, Soong SJ et al. Neck dissection with or without radiotherapy-prognostic factors, pattern of recurrence and survival. *Am J Surg* 1986;152:456-463
- O'Sullivan G, Corbett AR, Sdhanahan F, Colins K. Regional immune suppression in esophageal squamous cancer. Evidence from functional studies with matched lymph nodes. *J Immunol.* 157:4717-4720, 1996.
- Olveus J, BitMansour A, Warnke R, Thompson PA, Carballido J, Picker LJ, Lund-Johansen F. 1997. Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:12551-56
- O'Brien CJ, Smith JW, Soong SJ et al. Neck dissection with or without radiotherapy-prognostic factors, pattern of recurrence and survival. *Am J Surg* 152:456-463, 1986.
- O'Reilly Ms, Homgre L, Shing Y, et al. Angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*; 79:315. 1994
- Oda T, Kanai Y, Oyama T, et al. E-cadherin gene mutations in human gastric carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*: 91:1858. 1994
- Ortaldo JR, Masson AT, Manson LH, Winklerpickett RT, Gosselin P, Anderson SK. Selective inhibition of human and mouse natural killer tumor recognition using retroviral antisense in primary natural killer cells-involvement with MHC class I killer cell inhibitory receptors. *J Immunol*: 158:1262-1267. 1997
- Osmond DG, Nossal G. Differentiation of lymphocytes in mouse bone marrow. II. Kinetics of maturation and renewal of antiglobulin-binding cells studied by double labeling. *Cell Immunol*: 13:132. 1974
- Osmond DG. Population dynamics of bone marrow B lymphocytes. *Immunol Rev.*, 93:103. 1986
- Overwijk, W. W., Lee, D. S., Surman, D. R., Irvine, K. R., et al. Vaccination with a recombinant vaccinia virus encoding a "self" induces autoimmune vitiligo and tumor cell destruction in mice: requirement for CD4(+) T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci-U.S. A.*, 96:2982-2987. 1999.
- Owen JJ, Jenkinson EJ. Embryology of the lymphoid system. [review, 143 refs.] *Prog Allergy*; 29:1. 1981

- Owen JJ, Ritter MA. Tissue interaction in the development of thymus lymphocytes. *J. Exp. Med.*; 129:431. 1969
- Paul WE. The immune system: An introduction. In *Fundamental Immunology*, William E Paul Ed. Lippincott Raven Publishers, Philadelphia. 4<sup>th</sup> Ed. p1, 1999.
- Pickler LJ, Sieglman MH. Lymphoid Tissue and organs In *Fundamental Immunology*, William E Paul Ed. Lippincott Raven Publishers, Philadelphia. 4<sup>th</sup> Ed. p479, 1999
- Pabst, O., Förster, R., Lipp, M., Engel, H., Arnold, H.-H. (). NKX2.3 is required for MAdCAM-1 expression and homing of lymphocytes in spleen and mucosa-associated lymphoid tissue. *EMBO J.* 19:2015-2023. 2000
- Pasparakis M, Alexopoulou L, Episkopou V, Kollias G: Immune and inflammatory responses in TNF-deficient mice: a critical requirement for TNF $\alpha$  in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks, and germinal centers, and in the maturation of the thumoral immune response. *J Exp Med*; 184:1379-1411. 1996
- Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*; 76: 241. 1994
- Pena SV, Hanson DA, Carr BA, Goralski TJ, Krensky AM. Processing, subcellular localization and function of 519 (Granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small lytic granule proteins. *J Immunol*; 158:2680-2688. 1997
- Peng, L., Krauss, J.C., Plautz, G. E., Mukai, S., Shu, S., et al. T-cell mediated rejection of established tumors displays a varied requirement for perforin and IFN-gamma expression with which is not predicted by in vitro lytic capacity. *J. Immunol.*, 165,7116-7124 2000.
- Parkin DM, Pisani P, Ferlay. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Canc* 1993;54:594
- Perkins AS, Stern DF. Molecular Biology of cancer: Oncogenes. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA eds. *Cancer Principles and Practice Of Oncology*, 5<sup>th</sup> ed Philadelphia JB Lippincott. 1997 79-102.
- Pines J Cyclins, CDKs and cancer *Semin Cancer Biol* 6:63, 1995
- Pike, MC, Spicer, DV, Dahmoush, L, Press, MF. Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 1993; 15:17.
- Pietras, RJ, Arboleda, J, Reese, DM, et al. . HER-2-tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene* 1995; 10:2435.
- Piver, MS, Rutledge, F, Smith, JP. Five classes of extended hysterectomy for women with cervical cancer. *Obstet Gynecol* 1974; 44:265.
- Pure E, Inaba K, Crowley MT, Tardelli L, Witmer-Pack MD 1990. Antigen processing by epidermal Langerhans cells correlates with the level of biosynthesis of major histocompatibility complex class II molecules and expression of invariant chain. *J. Exp. Med.* 172:1459-69
- Peters, WA III, Liu, PY, Barrett, RJ II, et al. Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early-stage cancer of the cervix. *J Clin Oncol* 2000; 18:1606.
- Paglia P, Chiodoni C, Rodolfo M, Colombo MP. 1996. Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo. *J. Exp. Med.* 183:317-22
- Pulendran B, Smith JL, Caspary G, Brasel K, Pettit D, Maraskovsky E, Maliszewski CR. 1999. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:1036-41
- Pohris E, Eichhorn T, Glanz H and Kleinsasser O. Immunohistological reaction patterns of cervical lymph nodes in patients with laryngeal carcinomas. *Arch Otorhinolaryngol.* 244:278-283. 1987.
- Patt BS, Close LG, Vuitch F Prognostic significance of sinus histiocytosis in metastatic laryngeal cancer. *Laryngoscope.* 103:498-502, 1993.

- Peng, L., Weng, D. E., Plautz, G. E., Shu, S., et al. Helper-independent CD8<sup>+</sup>/CD62L<sup>low</sup> T cells With broad anti-tumor efficacy are naturally sensitized during tumor progression. *J. Immunol.*, 165,5738-5749,2000.
- Perussia B. Lymphokine-activated killer cells, natural killer cells and cytokines [Review]. *Curr Opin Immunol*; 3: 49-51. 1991
- Peters PJ, Borst J, Oorschot V, et al. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med*; 173:1099-1109. 1991
- Peters PJ, Geuze HJ, van der DH, et al. Molecules relevant for T cell-target cell interaction are present in cytolytic granules of human T lymphocytes. *Eur J Immunol*; 19:1469-1475. 1989
- Picker L, Treer JR, Ferguson-Darnell B, Collins PA, Buck D, Terstappen LW. Control of lymphocyte recirculation in man. I. Differential regulation of the peripheral lymph node homing receptor L-selection on T cells during the virgin to memory cell transition. *J Immunol*; 150: 1105. 1993
- Picker LJ. Control of lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol*; 6: 394. 1994
- Plautz, G. E., Mukai, S., Cohen, P. A., and Shu, S., Cross presentation of tumor antigens to effector T cells is sufficient to mediate effective immunotherapy of established intracranial tumors. *J. Immunol.*, 165, 3656-3662,2000.
- Pober JS and Contran RS, Cytokines and endothelial cells biology. *Physiol Rev* 70:427, 1990
- Radinsky R, Aukerman SL, Fidler I J. The heterogeneous nature of metastatic neoplasms: relevance to biotherapy, ed 3. New York: Marcel Dekker, 1996.
- Rahemtulla A, FungLeung WP, Schilham MW, et al. Normal development and function of CD8<sup>+</sup> cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4. *Nature*; 353: 180. 1991
- Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, Liu YJ. 1999. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283:1183-86
- Robert C, Fuhlbrigge RC, Kieffer JD, Ayeheunie S, Hynes RO, Cheng G, Grabbe S, von Andrian UH, Kupper TS. 1999. Interaction of dendritic cells with skin endothelium: A new perspective on immunosurveillance. *J. Exp. Med.* 189:627-36
- Rosen, PP. Invasive mammary carcinoma. In: Diseases of the Breast, Harris, JR, Lippman, ME, Morrow, M, Hellman, S (Eds), Lippincott-Raven, Philadelphia, 1995, p. 393.
- Rak, J, Mitsuhashi Y, Bayko L. et al Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 1995; 55:4575.
- Radinsky R, Aukerman SL, Fidler I J. The heterogeneous nature of metastatic neoplasms: relevance to biotherapy, ed 3. New York: Marcel Dekker, 1996.
- Reis e Sousa C, Stahl PD, Austyn JM. 1993. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J. Exp. Med.* 178:509-19
- Rak, J, Mitsuhashi Y, Bayko L. et al Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res*; 55:4575. 1995
- Randolph, D. A., Huang, G., Carruthers, C. J., Bromley, L. E., () et al. The Role of CCR7 in TH1 and TH2 Cell Localization and Delivery of B Cell Help in Vivo. *Science* 286: 2159-2162. 1999
- Rapin, A. M. and Burger, M. M., Tumor cell surfaces: general alterations detected by agglutinins. *Adv. Cancer Res.*, 20, 1-91,1974.
- Ridge, J. P., Di Rosa, F., and Matzinger, P., A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4<sup>+</sup> T-helper and a T-killer cell. *Nature*, 393, 474-478, 1998.
- Riott JM, Torrigiani g, Greaves MF, Brostoff J et al. The cellular basis of immunological response. *Lancet* 2:367. 1969
- Robbins PF, El-Gamil M, Li YF, Kawami Y, Iofus D, Apella E, Rosenberg SA: A mutated B-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 183: 1185-1192. 1996

- Rogers WO, Weaver CT, Kraus LA, Li JM, Li LF, Bucy RP. Visualization of antigen-specific T cell activation and cytokine expression in vivo. *J Immunol*; 158: 649. 1997
- Rooney, I.A., Butrovich, K. D., Glass, A. A., Borboroglu., The Lymphotoxin-beta Receptor Is Necessary and Sufficient for LIGHT-mediated Apoptosis of Tumor Cells. *J. Biol. Chem.* 275:14307-14315. 2000
- Röpke M, Hald J, Guldberg P, Zeuthen J, et al: Spontaneous human squamous cell carcinomas are killed by a human cytotoxic T lymphocyte clone recognizing a wild-type p53 derived peptide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 14704-14707. 1996
- Rosen, D., Li, J.-H., Keidar, S., Markon, I., et al. Tumor immunity in perforin deficient mice: a role for CD95 (Fas/APO-1). *J. Immunol*, 164, 3229-3235, 2000.
- Rosen, S. D. (). Endothelial Ligands for L-Selectin: From Lymphocyte Recirculation to Allograft Rejection. *Am. J. Pathol*, 155, 1013-1020. 1999
- Rosenberg, S. A. and White, D. E., Vitiligo in patients with melanoma: normal tissue antigens can be targets for cancer immunotherapy, *J. Immunother. Emphasis Tumor Immunology*, 19,81-84,1996.
- Rosenberg, S. A., Packard, B. S., Aebersold, P. M., Solomon, D., Topalian, S. T., Simon, P., Lotze, M. T., Yang, J. C., and Seipp, C. A., Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report, *N. Engl. J. Med.*, 319,1676-1680,1988.
- Rosenberg, S. A., Yannelli, J. R., Yang, J. C., Topalian, S. L Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2, *J. Natl. Cancer Inst.*, 86,1159-1166,1994.
- Rouse RV, Reichert RA, Gallatin WM, Weissman IL, Butcher EC. Localization of lymphocyte subpopulations in peripheral lymphoid organs: directed lymphocyte migration and segregation into specific microenvironments. *Am J Anat*; 170: 391. 1984
- Rovere, P., Vallinoto, C., Bondaza, A., Crosti, M. C., et al. Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function *J. Immunol.*,161, 4467-4471, 1998.
- Raulet D H, Vance RE, McMahon CW. Regulation of the natural killer cell repertoire. *Ann Rev Immunol.* 19:291-330, 2001:
- Rowley DA, Gowans JL, Atkins RC, Ford WL, Smith ME. The specific selection of recirculating lymphocytes by antigen in normal and preimmunized rats. *J Exp Med*; 136:499-513. 1972
- Ruddle N: Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) and lymphotoxin (TNF- $\beta$ ). *Currp Opin Immunol*; 4:327-332. 1992
- Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, .. 1998. Cutting edge: differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J. Immunol.* 161:1083-86
- Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. 1998. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T- helper and a T-killer cell. *Nature* 393:474-78
- Shantz S, Harrison LB, Forastiere AA. Tumors of the nasal cavity and paranasal sinuses, nasopharynx, oral cavity and oropharynx In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA eds. *Cancer Principles And Practice Of Oncology*. 5<sup>th</sup> ed Philadelphia JB Lippincott.1997:741-801.
- Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ. 1998. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393:480-83
- Santin AD. Lymph node metastases:the importance of the microenvironment. *Cancer.* 88:175-179, 2000.
- Shah JP, Strong E, Spiro RH, Vikram B. Neck dissection current status and future possibilities. *Clin Bull.* 11:25-33, 1981.
- Steinman RM, Adams JC, Cohn ZA. 1975. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. *J. Exp. Med.* 141:804-20

- Stamper HB, Woodruff JJ. Lymphocyte homing into lymph nodes :in vitro demonstration of selectivity affinity of recirculating lymphocytes for high endothelial venules . *J Exp Med* . 144:828-833, 1976. Svensson M, Stockinger B, Wick MJ. 1997. Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. *J. Immunol.* 158:4229-36
- Sidky YA, Auerbach R. Lymphocyte-induced angiogenesis: a quantitative and sensitive assay of the graft-versus-host reaction. *J Exp Med* 1975; 141:1084.
- Shimoyama Y, Hirohashi S, Hirano S, et al. Cadherin cell adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. *Cancer Res* 1989;
- Shiozaki H, Iihara K, Oka H, et al. Immunohistochemical detection of  $\alpha$ -catenin expression in human cancer. *Am J Pathol* 1994; 144:667.
- Shankey TV, RabinovichPS, Bagwell B, Bauer KD et al. Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. *Cytometry.* 12:472-477, 1993.
- Strauli P, Haemmerli O. The role of cancer cell motility in invasion. *Cancer Metastasis Rev* 1984; 3:127.
- Stetler-Stevenson WG, Krutzsch HC, Wachter MP, Margulies IM, Liotta LA, The activation of human type IV collagenase proenzyme. *J Biol Chem* 1989; 264:1353.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., and Peter, M. E. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem*, 254:439-459, 1998.
- Shantz S, Harrison LB, Forastiere AA. Tumors of the nasal cavity and paranasal sinuses, nasopharynx, oral cavity and oropharynx In: De VitaVT, Hellman S, Rosenberg SA eds. *Cancer Principles And Practice Of Oncology*, 5<sup>th</sup> ed Philadelphia JB Lippincott.1997:741-801
- Shah JP, Strong E, Spiro RH, Vikram B. Neck dissection current status and future possibilities. *Clin Bull* 1981;11:25-33
- Schuller DE, Koolemans-Beynen AR, Libby DH et al. Impact of metastases on nodal immunoreactivity in head and neck cancer. *Laryngoscope* 1986;96:1189-1192
- Slamon, DJ, Leyland-Jones, B, Shak, S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001; 344:783.
- Sledge, GW Jr, Roth. BJ. Cisplatin in the management of breast cancer. *Semin Oncol* 1989; 16:110.
- Sasieni, PD, Cuzick, J, Lynch-Farmery, E. Estimating the efficacy of screening by auditing smear histories of women with and without cervical cancer. The National Co-ordinating Network for Cervical Screening Working Group. *Br J Cancer* 1996; 73:1001.
- Smyth, M.J., Crowe, N. Y., & Godfrey, D. I. NK cells and NKT cells collaborate in host protection from MCA-induced fibrosarcoma. *Int. Immunol.* 13 (in the press, 2001).
- Schuller DE, Koolemans-Beynen AR, Libby DH et al. Impact of metastases on nodal immunoreactivity in head and neck cancer. *Laryngoscope.* 96:1189-1192, 1986.
- Steinman RM, Witmer MD. 1978. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:5132-36
- Steinman RM. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9:271-96
- Smyth, M. J. et al. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J. Exp. Med.* 191. 661-668 (2000).
- Suss G, Shortman K. 1996. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 183:1789-96
- Saiki, I., Sone, S., Fogler, W. E., Kleinerman, E. S., et al. Synergims between human recombinant gamma-interferon and muramyl dipeptide encapsulated in liposomes for activation of antitumor properties in human blood monocytes, *Cancer Res.*, 45, 6188-6193,1985.
- Salmon M, Pilling D, Borthwick NJ, et al. The progressive differentiation of primed T cells is associated with and increasing susceptibility to apoptosis. *Eur J Immunol*; 24: 892. 1994



- Savaray CA, Lotzova E. Phylogeny and ontogeny of NK cells. In: Lotzova E, Herberman RB, eds. *Immunobiology of natural Killer cells*. Vol. 1 Boca Raton, FL: CR Press; 45-60. 1986
- Savary CA, Lotzova E, Phylogeny and ontogeny of NK cells. In: Lotzova E, Herberman RB, eds. *Immunobiology of Natural Killer Cells*. Vol. 1. Boca Raton, FL: CRC Press; 45-60. 1986
- Sawada S, Gowrishankar K, Kitamura R, Suzuki M, Suzuki G, Tahara S, Kotito A: Disturbed CD4+ T cell homeostasis and in vitro HIV-1 susceptibility in transgenic mice expressing T cell Line-tropic HIV-1 receptors. *J Exp Med*; 187:11439-1449. 1988
- Scollay R, Jacobs S, Jerabek L, Butcher E, Weissman I. T cell maturation: thymocyte and thymus migrant subpopulations defined with monoclonal antibodies to MHC region antigen. *J Immunol*; 124: 2845. 1980
- Schwartzentruber, D. J., Hom, S. S., Dadmarz, R., White, D. E., et al. In vitro predictors of therapeutic response in melanoma patients receiving tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2. *J. Clin. Oncol.*, 12, 1475-1483, 1994.
- Schwarz, R. E., Wojciechowicz, D. C., Park, P. Y., and Paty, P. B., Phytohemagglutinin-I (PHA-L) lectin surface binding of N-linked beta 1-6 carbohydrate in its relationship to activated mutant ras in human pancreatic cancer cell lines, *Cancer Lett.*, 107, 285-291, 1996.
- Schwizner R, Siefken R, Franklin RA, Saloga J, Wonigeit K, Gelfand EW. Human CD45RA+ and CD45 RO+ T cell exhibit similar CD3/T cell receptor mediated transmembrane signaling capacities but differ in response to co-stimulatory signals. *Eur J Immunol*; 24:1391. 1994
- Sentman CL, Shutter JR, Hockenbery D, Kanagawa O, Korsmeyer SJ. Bcl-2 inhibits multiple forms apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell* 67:879. 1991;
- Serrano A, Garcia A, Abril E, Garrido F, Ruiz-Cabello F: Methylated CpG points identified within MAGE-1 promoter are involved in gene repression. *Int J Cancer*, 68: 464-470. 1996
- Shakhov, A. N., Lyakhov, I. G., Tumanov, A. V., Drutskaya, L. N., Marino, M. W., Nedospasov, S. A. (). Gene profiling approach in the analysis of lymphotoxin and TNF deficiencies. *J Leukoc Biol*. 68:151-157. 2000
- Shimoyama Y, Hirohashi S, Hirano S, et al. Cadherin cell adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. *Cancer Res*; 49:2128. 1989
- Shinkai Y, Takio K, Okumura K. Homology of perforin to the ninth component of complement (C9). *Nature*; 334:525-527. 1988
- Shinkura R, Matsuda F, Sakiyama T, Tsubata T, Hiai H, Paumen M, Miyakaei S, Honjo T: Defects of somatic hypermutation and class switching in almphoplasia (aly) mutant mice. *Int Immunol*; 8:1067-1075. 1996
- Shiozaki H, Iihara K, Oka H, et al. Immunohistochemical detection of  $\alpha$ -catenin expression in human cancer. *Am J Pathol*; 144:667. 1994
- Shortman K, Egerton M, Spangrude GJ, Scollay R. The generation and fate of thymocytes. *Semin Immunol*; 2:3. 1990
- Sica, G. L., Zhu, G., Tamada, K., Liu, D., Ni, J., Chen, L. (). RELT, a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, is selectively expressed in hematopoietic tissues and activates transcription factor NF- $\kappa$ B. *Blood* 97:2702-2707. 2001
- Sidky YA, Auerbach R. Lymphocyte-induced angiogenesis: a quantitative and sensitive assay of the graft-versus-host reaction. *J Exp Med*; 141:1084. 1975
- Sivori S, Vitale M, Bottino C, et al. CD94 functions as a natural killer cell inhibitory receptor for different HLA class I alleles-identification of the inhibitory from of CD94 by the use of novel monoclonal antibodies. *Eur J Immunol*; 26:2487-2492. 1996
- Skipper JCA, Stassus HJ: identification of two cytotoxic T lymphocyte-recognized epitopes in the Ras protein. *J. Exp. Med.*, 177: 1493-1498 1993
- Solowey AC, Rapaport FT. Immunological response in cancer patients. *Surg Gynecol Obstet*; 14:756-60. 1965

- Smyth, M.J., Crowe, N. Y., & Godfrey, D. I. NK cells and NKT cells collaborate in host protection from MCA-induced fibrosarcoma. *Int. Immunol.* 13 (in the press, 2001).
- Sloan-Lancaster J, Evavold BD, Allen PM Induction of T cell anergy by altered T cell receptor ligand on live antigen presenting cells *Nature.* 363:156, 1993.
- Smyth, M. J. et al. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J. Exp. Med.* 191, 661-668 (2000).
- Soto, H., Wang, W., Strieter, R. M., Copeland, N. G., () et al. The CC Chemokine 6Ckine binds the CXC chemokine receptor CXCR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 8205-8210. 1998
- Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*, 241: 58. 1988
- Sprang SR, Bazan JF. Cytokine structural taxonomy and mechanisms of receptor engagement. *Curr Opin Struct Biol*; 3:815. 1993
- Springer Ta. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol*; 57:827. 1995
- Sreevalsan T. Biologic therapy with interferon- $\alpha$  and  $\beta$ : preclinical studies. In: DeVita VT, Hellman SH, Rosenberg SA, eds. Biologic therapy of cancer, ed 2. Philadelphia: Lippicott-Raven. 347. 1995:
- Steinman, r. M., Pack, M., and Inaba, K., Dendritic cell in the T-cell areas of lymphoid organs, *Immunol. Rev.* 156, 25-37, 1997.
- Steinman, R., Hoffman, I., and Pope, M., Maturation and migration of cutaneous dendritic cells, *J. Invest. Dermatol.*, 105, 2S-7S, 1995.
- Steinmann GG. Changes in the human thymus during aging. *Curr Top Pathol*; 75:43. 1986
- Stetler-Stevenson WG, Krutzsch HC, Wachter MP, Margulies IM, Liotta LA, The activation of human type IV collagenase proenzyme. *J Biol Chem*; 264:1353. 1989
- Stetler-Stevenson WG. Type IV Collagenase in tumor invasion and metastases. *Cancer Metastasis Rev*; 9:289. 1990
- Stevens RL, Kamada MM, Serafin WE. Structure and function of the family of proteoglycans that reside in the secretory granules of natural killers cells and other effector cells of the immune response. *Curr Top Microbiol Immunol*; 140:93-108. 1989
- Strauli P, Haemmerli O. The role of cancer cell motility in invasion. *Cancer Metastasis Rev*; 3:127. 1984
- Sule-Suso, J., Arienti, F., Melani, C., Colombo, M. P., and Parmiani, G., A B7-1-transfected human melanoma line stimulates proliferation and cytotoxicity of autologous and allogeneic lymphocytes, *Eur. J. Immunol.* 25, 2737-2742, 1995.
- Takahashi K, Shichijo S, Noguchi M, Hirohata M, Itoh K : Identification of MAGE-1 and MAGE-4 proteins in spermatogonia and primary spermatocytes of testis. *Cancer Res*, 55: 478-3482. 1995
- Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD, Williams LT. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci.* 95:258-263, 1998.
- Takai T, Li M, Sylvestre D, Cyines R, Ravetch JV. FcR gamma chain detection results in pleiotropic effector cell defects. *Cell.* 76: 519-529. 1994
- Takeshita T, Asao H, Ohtani, et al. Cloning of the  $\gamma$  chain of the human IL-2 receptor. *Science*; 257:379. 1992
- Teh HS, Kisielow P, Scott B, et al. Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cells receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature*; 335:229-233. 1988
- Terstappen LWWM, Huang S, Safford M, Lansdorp PM, Loken MR. Sequential generation of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+ CD38- progenitor cells. *Blood*; 77:1218. 1991

- Topalian SL, Gonzales MI, Parkhurst M, Li YF, Southwood S, Sette A, Robbins PF: Melanoma-specific CD4+ T cells recognize nonmutated HLA-DR-restricted tyrosinase epitopes. *J. Exp. Med.* 183:1965-1971. 1996
- Tang HL, Cyster JG. 1999. Chemokine up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells. *Science* 284:819-22
- Terabe M, Matsui S, Noben-Trauth N, Chen H et al. NKT cell mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nature Immunol.* 1:515-520:2000
- Tannock, IF, Boyd, NF, DeBoer, G, et al. A randomized trial of two dose levels of cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil chemotherapy for patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1988; 6:1377.
- Terabe M, Matsui S, Noben-Trauth N, Chen H et al. NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol.* 1:515-520 2000.
- Tatake RJ, Krishnan N, Rao RS, Fakih AR et al Lymphokine activated killer cell function of lymphocytes from peripheral blood, regional lymph nodes and tumor tissues of patients with oral cancer. *Int J Cancer.* 43:560-566, 1989.
- Takamizawa M, Rivas A, Fagnoni F, Benike C, Kosek J, Hyakawa H, Engleman EG. 1997. Dendritic cells that process and present nominal antigens to naive T lymphocytes are derived from CD2+ precursors. *J. Immunol.* 158:2134-42
- Turner-Warwick, R. The lymphatics of the breast. *Br J Surg* 1959; 46:574.
- Trichopoulos D, Petriou E., Epidemiologic studies and cancer etiology in humans. *Med Exerc Nutr Health* 1994; 3:206.
- Trichopoulos D, Kalandidi A, Sparros L., MacMahon B. Lung cancer and passive smoking. *Int J cancer* 1981; 27:1.
- Trichopoulos D, Day NE, Kaklamani E, et al. Hepatitis B virus, tobacco smoking and ethanol consumption in the etiology of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1987; 39:45.
- Tatake RJ, Krishnan N, Rao RS, Fakih AR et al Lymphokine activated killer cell function of lymphocytes from peripheral blood, regional lymph nodes and tumor tissues of patients with oral cancer. *Int J Cancer* 1989;43:560-566
- Turner, L, Swindell, R, Bell, WG, et al. Radical versus modified radical mastectomy for breast cancer. *Ann R Coll Surg Engl* 1981; 63:239
- Tolcher, AW, Cowan, KH, Solomon, D, et al. Phase I crossover study of paclitaxel with verapamil in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14:1173.
- Trinchieri G 1989. Biology of natural Killer cells. *Adv Immunol.* 47:187-376, 1989.
- Trichopoulos D, Kalandidi A, Sparros L., MacMahon B. Lung cancer and passive smoking. *Int J cancer:* 27:1. 1981
- Trichopoulos D, Petriou E., Epidemiologic studies and cancer etiology in humans. *Med Exerc Nutr Health;* 3:206. 1994
- Trichopoulos D, Day NE, Kaklamani E, et al. Hepatitis B virus, tobacco smoking and ethanol consumption in the etiology of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1987; 39:45.
- Trinchieri G. Biology of natural Killer cells. *Adv Immunol;* 47: 187-376. 1989
- Tschernig, T, Debertin, A S, Paulsen, F, Klemann, W J, Pabst, R (). Dendritic Cells in the mucosa of the human trachea are not regularly found in the first year of life. *Thorax* 56:427-431 . 2001
- Tschernig, T, Debertin, A S, Paulsen, F, Klemann, W J, Pabst, R (). Dendritic Cells in the mucosa of the human trachea are not regularly found in the first year of life. *Thorax* 56:427-431. 2001
- Ueba T, Nosaka T, Takahashi JA, et al. Transcriptional regulation of basic fibroblast growth factor gene by p53 in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA:* 91-9009. 1994

- Umbas R, Schalken JA, Alders TW, et al. Expression of the cellular adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high-grade prostate cancer. *Cancer Res*; 52:5104. 1992
- Ursugi, T., Schorait, A. J., Connor, J., Bucana, C. D., and Fidler, I. J., Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes. *Cancer Res.*, 51, 3062-3066, 1991.
- Uytenhove C, Godfrain C, Lethe B, Amar-Costesec A, Renaud J-C, Gajewski TF, Duffour T, Warnier G, Boon T, Van den Eynde BJ: The expression of mouse gene P1a in testis does not prevent safe induction of cytolytic T cells against a P1A-encoded tumor antigen. *Int Cancer*, 70 349-356. 1997
- Van den Broek M, Kagi D, Ossendorp F, et al. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med*; 184:1781-1790. 1996
- Van den Oord JJ, de Wolf-Peeters C, Desmet VJ. The marginal zone in the human reactive lymph node. *Am J Clin Pathol*; 86: 475. 1986
- Vitetta ES, Berton MT, Burger C, Kepron M et al. Memory B and T cells. *Annu Rev Immunol*. 9,193-217, 1991.
- Van der Bruggen, P., Bastin, J., Gajewski, T., Coulie, P. G., et al. A peptide encoded by human gene MAGE-3 and presented by HLA-A2 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE-33. *Eur. J. Immunol.*, 24,3038-3043,1994.
- Van Dongen JJ, Comans-Bitter WM, Wolvers TI, Borts J. Development of human T lymphocytes and their thymus-dependency. *Thymus*; 16: 207. 1990
- Vestweber, D., Blanks, J. E.. Mechanisms That Regulated the Function of the Selectins and Their Ligands. *Physiol. Rev* 79: 181-213. 1999
- Von Boehmer H, Hass W, Jerne NK. Major histocompatibility complex-linked immune-responsiveness is acquired by lymphocytes of low-responder mice differentiating in thymus of high-responder mice. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 75: 2439-2442. 1978
- Van Voorhis WC, Hair LS, Steinman RM, Kaplan G. 1982. Human dendritic cells. Enrichment and characterization from peripheral blood. *J. Exp. Med.* 155:1172-87
- Vaux, D. L. Toward an Understanding of the Molecular Mechanisms of Physiological Cell Death. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:786-789, 1993.
- Vicari AP, Zlotnik A. Mouse NK1.1-T-cells: a new family of T cells. *Immunol Today*. 17:71-76, 1996
- Veronesi, U, Valagussa, P. Inefficacy of internal mammary nodes dissection in breast cancer surgery. *Cancer* 1981; 47:170.
- Veronesi, U, Rilke, F, Luini, A, et al. Distribution of axillary node metastases by level of invasion. An analysis of 539 cases. *Cancer* 1987; 59:682.
- Vremec D, Zorbas M, Scollay R, Saunders DJ, Ardavin CF, Wu L, Shortman K. 1992. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J. Exp. Med.* 176:47-58
- Wu, Q., Wang, Y., Wang, J., Hedgeman, E.O., Browning, J. L., Fu, Y.-X. (1999). The Requirement of Membrane Lymphotoxin for The Presence of Dendritic Cells In Lymphoid Tissues. *J. Exp. Med.* 190:629- 638
- Wu L, Li CL, Shortman K. 1996. Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *J. Exp. Med.* 184:903-11
- Whiteside TL. Immune cells in the tumor microenvironment. Mechanism Responsible for functional and signal defects. *Adv Exp Med Biol*. 451:167-71, 1998.
- Wu L, Li CL, Shortman K. 1996. Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *J. Exp. Med.* 184:903-11
- Wu L, Nichogiannopoulou A, Shortman K, Georgopoulos K. 1997. Cell-autonomous defects in dendritic cell populations of Ikaros mutant mice point to a developmental relationship with the lymphoid lineage. *Immunity* 7:483-92

- Weinberg R. The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus. *Science* 230:770-771, 1985
- Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84:1875.
- Whiteside TL. Immune cells in the tumor microenvironment. Mechanism Responsible for functional and signal defects. *Adv Exp Med Biol* 1998;451:167-71
- Willett, WC, Rockhill, B, Hankinson, SE, et al. Epidemiology and nongenetic causes of breast cancer. In: Diseases of the Breast, Harris, JR, Lippman, ME, Morrow, M, Osborne, CK (Eds), Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia 2000. p.175.
- Winer, E, Berry, D, Duggan, D, et al. Failure of higher dose paclitaxel to improve outcome in patients with metastatic breast cancer (abstract). *Proc Am Soc Clin Oncol* 1998; 17:101.
- Whiteside, T. L. & Herberman, R.B. The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Curr. Opin. Immunol* 7, 704-710 (1995).
- Wang R-F, Parkhurst MR, Kawakami Y, Robbins PF, Rosenberg SA: Utilization of alternative open reading frame of a normal gene in generating a novel human cancer antigen. *J. Exp. Med.* 183: 1131-1140. 1996
- Wang, Q., Stanley, J., Kudoh, S., Myles, J., et al. T cells infiltrating non-Hodgkin's B cell lymphomas show altered tyrosine phosphorylation pattern even though T cell receptor/CD3-associated kinases are present. *J. immunol.*, 155, 1382-1392, 1995.
- Wang, S.-L., Kutsche, M., DiScicullo, G., Schachner, M., Bogen, S.A. (). Selective Malformation of the Splenic WhitePulp Border in LI-Deficient Mice. *The JI* 165:2465-2473. 2000
- Wang, Y., Wang, J., Sun, Y., Wu, Q., Fu, Y-X. (). Complementary Effects of TNF and Lymphotoxin on the Formation of Germinal Center and Follicular Dendritic Cells. *The JI* 166:330-337. 2001
- Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*; 84:1875. 1992
- Weiss L. The pathophysiology of metastases within the lymphatic system. In: Weiss L, Gilbert HA, Ballon SC. Lymphatic system metastases. Boston:G. K. Hall.;2-40. 1980
- Winter, H., Hu, H. M., Urba, W. J., and Fox, B. A., Tumor regression after adoptive transfer of effector T cells is independent of perforin or Fas ligand (APO-1L/CD95L). *J. Immunol.*, 163, 4462-4472. 1999.
- Wlodawer A, Pavlovsky A, Gustchina A. Hematopoietic cytokines: similarities and differences in the structures, with implications for receptor binding. *Protein Sci*; 2:1373. 1993
- Wojtowicz-Praga, S., Reversal of tumor-induced immunosuppression: a new approach to cancer therapy. *J. Immunother.*, 20,165-177,1997.
- Wölfel T, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wölfel C, Klehmann-Hieb E, De Plaen E, Hankeln T, Meyer Zum Büschenfelde K-H, Beach D: A p16 INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science*, 269:1281-1284. 1995
- Whiteside, T. L. & Herberman, R.B. The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Curr. Opin. Immunol* 7, 704-710 (1995).
- Wu L, Scollay R, Egerton M, Pearse M, Spangrude GJ, Shortman K. CD4 expressed on earliest T-lineage precursor cells by the adult murine thymus. *Nature*; 349: 71. 1991
- Wu, Q., Sun, Y., Wang, J., Lin, X., Wang, Y., Pegg, L. E., Fütterer, A., Pfeffer, K., Fu, Y.-X. (). Signal Via Lymphotoxin- $\beta$  Receptor on Bone Marrow Stromal Cells Is Required for and early Checkpoint of NK Cell Development. *The JI* 166:1684-1689. 2001
- Xu, S., Lam, K.-P. (). B-Cell Maturation Protein, Which Binds the Tumor Necrosis Factor Family members BAFF and APRIL, Is Dispensable for Humoral Immune Responses. *Mol. Cell. Biol.* 21:4067-4074, 2001
- Yamada, T., Mitani, T., Yorita, K., Uchida, D., Matsushima, A., Iwamasa, K., Fujita, S., Matsumoto, M. (). Abnormal Immune Function of Hemopoietic Cells From A lymphoplasia

- (aly) Mice, A Natural Strain with Mutant NF- $\kappa$ B-Inducing Kinase. *The JI* 165:804-812. 2000
- Yanuck, M., Carbone, D. P., Pendleton, C. D., Tsukui, T., et al. A mutant p53 tumor suppressor protein is a target for peptide-induced CD8<sup>+</sup> cytotoxic T-cells, *Cancer Res.*, 53,3257-3261, 1993.
- Yavalkar N, Brand CU, Braathen LR. 1996. IL-12 gene expression in human skin-derived CD1a<sup>+</sup> dendritic lymph cells. *Arch. Dermatol. Res.* 288:79-84
- Young AJ. The physiology of lymphocyte migration through the single lymph node *in vivo*. *Semin Immunol.* 11:73-83, 1999.
- Yokoyama WM. Natural Killer cells. Right-side-up and up-side-down NK-cell receptors[Review]. *Curr Biol*; 5:982-985. 1995
- W M Yokoyama. Flow cytometry analysis using Beckton Dickinson FACScan. In: *Curr Protocol in Immunol.* Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulles DH, Shevac EM, Strober W. (Eds) Wiley Interscience New York USA. 1991:5.4.15.4.15
- Young AJ. The physiology of lymphocyte migration through the single lymph node *in vivo*. *Sem Immunol.* 11:73-83. 1999.
- Yoshimoto t, Bendelac A, Watson C, Hu-Li J & Paul WE. Role of NK1.1 T cells in a Th2 response and in immunoglobulin IgE production. *Science* 270:1845-1847, 1995.
- Yoshida H, Honda k, Shinkura R, Adachi S, Nishikawa S, Maki K, Ikuta K, Nishikawa SI: IL-7 receptor a<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>-cells in the embryonic intestine induce the organizing center of peyer's patches. *Int Immunol*; 11:643-655. 1999
- Young JD, Cohn ZA, Podack ER. The ninth component of complement and the pore-forming protein(perforin 1) from cytotoxic T cells: Structural, immunological, and functional similares. *Science*; 233: 184-190. 1986
- Young, A. J., Marston, W- L., Dudler, L. (). Subset-Specific Regulation of the Lymphatic Exit of Recirculating Lymphocytes *in Vivo*. *The JI* 165: 3168-3174. 2000
- Zeidman I. The fate of circulating tumor cell. I. Passage of cells through capillaries. *Cancer Res*; 21:38. 1961
- Zhang F, Basinki MB, Beals JM, et al. Crystal structure of the obese protein-leptin-E 100. *Nature*; 387:206. 1997
- Zlotnik A and Yoshie O. Chemokines:a new classification and their role in immunity. *Immunity.* 12:121-127. 2000.
- Zhou, Q., Zhao, J., Al-Zoghaibi, F., Zhou, A., Wiedmer, t., Silverman, R. H., and Sims, P. J., Transcriptional control of the human plasma membrane phospholipid scramblase 1 gene is mediated by interferon- $\alpha$ , *Blood*, 95, 2593-2599, 2000.
- Zinkernagel RM, Callahan GN, Klein J, Dennert G. Cytotoxic T cells learn specificity for self H-during differentiation in the thymus. *Nature*; 271: 251-253. 1978
- Zlotnik A, Yoshie O: Chemokines: a new clasification system and their role in immunity. *Immunity*; 12:12-127. 2000
- Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR: Function of the chemokine receptor CXCR4 in hematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*; 393:595-599. 1998
- Zeidman I. The fate of circulating tumor cell. I. Passage of cells through capillaries. *Cancer Res* 1961; 21:38.
- Zitvogel L, Mayordomo JI, Tjandrawan T, DeLeo AB, Clarke MR, Lotze MT, Storkus WJ. 1996. Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *J. Exp. Med.* 183:87-97
- Zhou LJ, Schwarting R, Smith HM, Tedder TF. 1992. A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. *J. Immunol.* 149:735-42

---

Zhou LJ, Tedder TF. 1995. A distinct pattern of cytokine gene expression by human CD83+ blood dendritic cells. *Blood* 86:3295-3301

**APENDICES**



**VALORES NORMALES EN SANGRE DE LAS POBLACIONES CELULARES DE LINFOCITOS**

**Tabla A. RANGOS DE VALORES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES EN CONTROLES SANOS (Células/mm<sup>3</sup>)**

	LEUC	LINF	CD2	CD3	CD4	CD8	CD19	CD56	CD45RA	CD45RO	αβ	γδ
<b>F</b>	7267	2417	1964	1860	1162	633	297	155	963	1157	1725	67
<b>M</b>	6844	2164	1820	1641	1109	580	300	135	728	1191	1562	51

Los valores representan números absolutos obtenidos por Citometría de flujo en donadores sanos mujeres y hombres respectivamente.

**F** = Femenino **M** = Masculino

**Tabla B. RANGOS DE VALORES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES EN CONTROLES SANOS (%)**

	CD2	CD3	CD4	CD8	CD19	CD56	CD45RA	CD45RO	$\alpha\beta$	$\gamma\delta$
F	82	78	49	27	11	7	52	37	72	3
M	79	64	41	24	14	6	27	61	68	2

Los valores representan porcentajes obtenidos por Citometría de flujo en donadores sanos mujeres y hombres respectivamente.

**F** = Femenino **M** = Masculino

## SOLUCIONES Y REACTIVOS CICLO CELULAR

### REACTIVOS.

Etanol al 70%

PBS pH 7.2-7.4

Solución Stock:

Citrato trisodio.2H<sub>2</sub>O (3.4 mM) 1000mg

Nonidet-P40 (0.1% v/v) 1000  $\square$ l

Tetrahidroclorida de espermina (1.5 mM) 522mg

Tris (0.5 Mm) 61mg

Agua destilada. 1000ml

### Solución A:

Solución stock 1000ml

Tripsina 30mg

pH 7.6

### Solución B:

Solución stock 1000ml

Inhibidor de tripsina 500 mg

Ribonucleasa A 100mg

pH 7.6

### Solución C: pH 7.6

Solución stock 1000 ml

Ioduro de propidio 416mg

**ALMACENAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE REACTIVOS.**

Las soluciones son alicuotadas en tubos o frascos y mantenidas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

La solución C se deberá almacenar en frascos ámbar o cubrir con papel aluminio con el fin de protegerla de la luz, así mismo se deberá mantener a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Cuando se van a emplear las soluciones éstas se deberán descongelar colocándolas a baño María a  $37^{\circ}\text{C}$  sin calentar a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Las soluciones A y B son empleadas a temperatura ambiente.

La solución C se mantiene en hielo en el momento de emplearla.

Las muestras procesadas se leen y analizan en menos de 2 hrs después de preparadas.

## LISIS DE ERITROCITOS

### SOLUCION DE ACK PARA

8.29 g NH<sub>4</sub>Cl (0.15 M)

1 g KHCO<sub>3</sub> (1.0 mM)

37.2 mg Na<sub>2</sub> EDTA (0.1 mM)

Añadir 800 ml de H<sub>2</sub>O y ajustar PH 7.2-7.4 con 1N HCl

Aforar a 1L

Filtrar la solución con filtro de 0.22µm.

### LISIS DE ERITROCITOS

#### A .- QUICKLYSIS (Cytognos).

- 1) Añadir 2 mL de Solución de Lisis QUICLYSIS en cada tubo.
- 2) Tapar con parafilm y agitar y los tubos, mantenerlos en oscuridad durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 3) Leer en un citómetro de Flujo en las tres horas siguientes a su preparación.
- 4) Si las muestras no son leídas en ese lapso de tiempo se recomienda mantener las muestras a 4°C y en oscuridad hasta su lectura, así mismo se deberán fijar con formaldehído al 2%.

Este método permite procesar las muestras sin tener que lavar las células tras la adición de la solución de lisis, lo que evita pérdida de células y acorta el tiempo de procesado de muestras

**B.- LISIS CON SOLUCION DE LISIS B-D**

- 1) Añadir 2mL de la solución lisante FACS a los tubos y mezclar en un vortex por unos segundos.
- 2).- Incubar 10 minutos en obscuridad a 4°C.
- 3).- Lavar con PBS PH 7.1-7.4 en 2 ocasiones a 450 x g.
- 4).- Resuspender de 500 a 700 µl en PBS.
- 5).- Leer y analizar en el Citómetro de Flujo.
- 6).- Si las muestras no son leídas inmediatamente se recomienda mantenerlas a 4°C y en obscuridad hasta su lectura, así mismo se deberán fijar con formaldehído al 2%.

**C) LISIS CON ACK.**

- 1).- Añadir 2ml de solución lisante ACKy vortexear perfectamente por unos segundos.
- 2).- Incubar de 10 a 15 min a temperatura ambiente y en obscuridad.
- 3).- Lavar con PBS a 450 X g durante 10 min y decantar el sobrenadante 2X..
- 4).- Resuspender con 1ml de PBS pH 7.2-7.4.
- 5).- Leer y analizar en el Citómetro de Flujo.
- 6).- Si las muestras no son leídas inmediatamente se recomienda mantenerlas a 4°C y en obscuridad hasta su lectura, así mismo se deberán fijar con formaldehído al 2%.

**EQUIPO.**

Micropipetas 50-200  $\mu$ l , y 1000  $\square$ l

Hemocitómetro

Microscopio compuesto

Citómetro de Flujo

Vortex

Refrigerador 2-8°C

Congelador -20°C

Incubador de CO<sub>2</sub>

LECTOR DE ELISA

CENTRÍFUGAS

BALANZA

MICROSCOPIO INVERTIDO

MICROSCOPIO

PHmetro

**MATERIAL.**

Puntas para micropipeta de 50-200  $\mu$ l y 1000  $\mu$ l

Tubos de 12x75 mm (marca Becton Dickinson Catálogo No. 2058).

Gradilla para tubos de 12x75 mm

Guantes

Papel aluminio



**Abreviaciones**

IP	Ioduro de Propidio
ml	mililitro
$\mu$ l	microlitro
min	minuto
$^{\circ}$ C	Grados Celcius
C.F.	Citómetro de Flujo
Solución A	Tripsina
Solución B	Inhibidor de tripsina y RNAsa
Solución C	Ioduro de propidio
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos

**BIOSEGURIDAD  
MANEJO DE MATERIAL POTENCIALMENTE INFECTANTE\***

El manejo de material biológico humano, debe llevarse a cabo en condiciones de bioseguridad por el riesgo que existe de infección por distintos agentes infecciosos. Especial atención se ha puesto recientemente al virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

En el manejo de material humano "potencialmente infectante" se requiere instalaciones de bioseguridad nivel 2, el cual incluye:

1. Uso de pipeteros mecánicos
2. Decontaminación diaria del área de trabajo
3. No ingerir alimentos en el área de laboratorio
4. Uso de batas
5. Lavado de manos
6. Uso de guantes
7. Desecho del material en contenedores adecuados en el caso de punzo-cortantes, líquidos, y material en contacto con muestras humanas.