

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO APOPTÓTICO Y EN EL CICLO CELULAR
DE LÍNEAS DE CARCINOMA PULMONAR SOBRE LINFOCITOS T
HUMANOS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ARMANDO JUÁREZ NICOLÁS

MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente Dr. JOSÉ SULIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ

Vocal Dr. CONSTANTINO III ROBERTO LÓPEZ MACÍAS

Secretario Dr. HERIBERTO PRADO GARCÍA

1er. Suplente Profra. SONIA MAYRA PÉREZ TAPIA

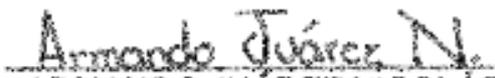
2º. Suplente Prof. MARCO ANTONIO VELASCO VELÁZQUEZ

Sitio en donde se desarrolló el tema: LABORATORIO DE CÁNCER PULMONAR DEL DEPARTAMENTO DE ENFERMEDADES CRÓNICAS DEGENERATIVAS, UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN EL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS.

Asesor del tema:


Dr. HERIBERTO PRADO GARCÍA

Sustentante:


ARMANDO JUÁREZ NICOLÁS

ÍNDICE

ABREVIATURAS	6
I. INTRODUCCIÓN.....	7
Cáncer pulmonar.....	7
El sistema inmunológico	10
II. ANTECEDENTES.....	12
Ciclo celular	14
Apoptosis	16
Mecanismos de escape tumoral	21
Hipótesis del contraataque tumoral.....	24
IIIa. JUSTIFICACIÓN.....	27
IIIb. HIPÓTESIS	28
IIIc. OBJETIVOS.....	28
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	29
Líneas celulares	29
Cocultivos de células tumorales con células Jurkat.....	29
Detección del pico subG ₀ y análisis del ciclo celular.....	30
Detección de apoptosis por marcaje con anexina-V-FITC.....	31
Efecto de las células tumorales sobre el porcentaje de células Jurkat apoptóticas.....	32
V. RESULTADOS	34
Alteración en la proliferación de linfocitos T.....	34
Alteración en el ciclo celular y determinación del pico subG ₀ en las células T ..	35
Detección del pico subG ₀	39
Inducción de apoptosis en células Jurkat.....	39
Efecto de las células tumorales sobre las células Jurkat apoptóticas.....	44
Evaluación de la apoptosis en células Jurkat por cocultivo con células tumorales a tiempos cortos.....	46
VI. DISCUSIÓN.....	48
Alteración en la proliferación de linfocitos T.....	48
Alteración en el ciclo celular en las células T.....	49

Detección de apoptosis por pico subG ₀ y marcaje con anexina-V-FITC.....	50
VII. CONCLUSIONES.....	52
VIII. REFERENCIAS.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Ciclo celular.....	14
Figura 2. Vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis.....	17
Figura 3. Vía extrínseca de la apoptosis.....	19
Figura 4. Análisis representativo del ciclo celular.....	36
Figura 5. Histogramas de DNA de las células Jurkat cocultivadas 24h con las líneas tumorales SKLU-1 o SKMES-1.....	38
Figura 6. Las células Jurkat son susceptibles de la inducción de apoptosis por la vía de Fas ligando o radiación UV.....	40
Figura 7. Determinación de apoptosis en células Jurkat cocultivadas con células SKLU-1 por marcaje con anexina-V-FITC.....	42
Figura 8. Determinación de apoptosis en células Jurkat cocultivadas con células SKMES-1 por marcaje con anexina-V-FITC.....	43
Figura 9. Disminución del porcentaje de células Jurkat apoptóticas tratadas con 30 segundos de radiación UV y cocultivadas con células SKLU-1.....	45
Figura 10. Las líneas de carcinoma pulmonar SKLU-1 y SKMES-1 no indujeron apoptosis en células Jurkat, a tiempos cortos de incubación.....	47
Tabla 1. Disminución en la concentración de las células Jurkat cocultivadas con las líneas tumorales.....	34
Tabla 2. Alteración en el perfil del ciclo celular de células Jurkat por cocultivo con líneas tumorales.....	37
Tabla 3. Las líneas tumorales no indujeron apoptosis en las células Jurkat.....	41

ABREVIATURAS

CDKs	Cinasa dependiente de ciclina
CTLs	Linfocitos T citotóxicos
Fas	Receptor Fas
FasL	Ligando de Fas
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
NSCLC	Carcinoma pulmonar de células no pequeñas
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PS	Fosfatidilserina
SCLC	Carcinoma pulmonar de células pequeñas
TCR	Receptor de célula T
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TILs	Linfocitos infiltrantes de tumor
TNF	Factor de Necrosis tumoral
TNFR	Receptor del Factor de Necrosis tumoral

I. INTRODUCCIÓN

Cáncer pulmonar

El cáncer es una enfermedad compleja resultado de errores genéticos, que se caracteriza por una proliferación celular descontrolada y por la capacidad de invadir y crear metástasis.

En la actualidad, el cáncer de pulmón es el tumor maligno más frecuente en el mundo. Se estima que para el año 2025 se incrementará el número de muertes en más del 80%, es decir, a tres y medio millones en países en desarrollo. En México el cáncer pulmonar se ha incrementado hasta ocupar el segundo lugar de causa de muerte (entre 1983 y 1996 el cáncer pulmonar ocupó del octavo al segundo lugar en los ingresos al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias INER)²⁷. A partir de 1970 se ha incrementado la frecuencia de muertes por cáncer pulmonar en las mujeres y en pacientes jóvenes, actualmente el adenocarcinoma seguido de el carcinoma epidermoide son los tipos histológicos más frecuentes. De la misma forma, la asociación entre el tabaco y el cáncer de pulmón ha sido bien establecida, el riesgo relativo se ha duplicado en hombres y cuadruplicado en mujeres. Existe una predisposición genética para padecer cáncer pulmonar, ya que los fumadores con antecedentes familiares de cáncer pulmonar tienen un riesgo relativo de 2 a 2.5 veces mayor en relación a fumadores sin antecedentes familiares²⁸.

El humo del tabaco está relacionado con el cáncer pulmonar en 80-90% de los casos. El índice de cáncer en hombres, en países en desarrollo, está disminuyendo ligeramente con la concomitante reducción en el hábito tabáquico, en contraste con lo observado en mujeres. Además del humo de tabaco, algunos agentes ambientales han sido implicados en el desarrollo del cáncer pulmonar. No obstante, alrededor de un 10% de los fumadores desarrollan cáncer pulmonar, lo que sugiere la presencia de factores genéticos que predisponen al desarrollo de este tipo de cáncer²⁸.

El humo del tabaco contiene al menos unos 20 carcinógenos específicos conocidos, especialmente hidrocarburos policíclicos aromáticos y la nitrosamina específica del tabaco, la 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), el metabolismo de éstos genera especies reactivas que se unen covalentemente al DNA causando una alteración, que puede iniciar una mutación, la cual puede ser reparada o en caso contrario iniciar el mecanismo de apoptosis o bien persistir²⁸.

Genes clave y vías relacionadas con la patogénesis del cáncer pulmonar

Protooncogenes: Son genes celulares sin alteraciones. Los productos codificados por los protooncogenes desempeñan un papel importante en el señalamiento celular o en la regulación de la proliferación. En términos prácticos, los protooncogenes se agrupan en cinco categorías: factores de crecimiento, receptores para factores de crecimiento u hormonas, transductores de señal intracelular, factores de transcripción nuclear y proteínas del control del ciclo celular¹².

Los protooncogenes que contribuyen a la patogénesis del cáncer pulmonar incluyen a *c-myc*, *c-k-ras* (15%-20% en carcinoma pulmonar de células no pequeñas, NSCLC; adenocarcinomas predominantemente, pero no en carcinoma pulmonar de células pequeñas, SCLC) y la sobreexpresión de EGFR, entre otros²⁸.

Oncogen: (Oncogen, del griego *onko* que significa masa o tumor). Es el producto de un protooncogen mutado. Cuando la expresión de un protooncogen se altera por alguna causa, el resultado es la pérdida del control en los procesos de proliferación, inducción de muerte y señalamiento celular, ya sea por la producción de proteínas que no responden a dichos procesos de control o por la síntesis incrementada de proteína funcional y estructuralmente normal¹².

***c-myc*.** Se expresa en la mayoría de las células de tejido embrionario y adulto que se encuentran en proliferación. Pertenece al grupo de protooncogenes involucrados en el control de la expresión de genes, por su acción en el DNA. Las oncoproteínas c-Myc se unen a secuencias específicas del DNA y controlan la expresión de genes, esta unión requiere la dimerización con otra proteína llamada

Max. El complejo c-Myc/Max activa la transcripción y promueven la proliferación celular. Un aumento de la expresión del gen c-Myc resulta en la pérdida de la regulación de la proliferación celular²².

c-k-ras (Kirsten rat sarcoma) codifica para la proteína G, p21, la cual cicla entre una forma inactiva unida a GDP y una forma activa unida a GTP. Las proteínas RAS están involucradas en la vía de transducción de señales; tienen influencia en la proliferación, diferenciación y apoptosis mediante la retransmisión de señales de crecimiento y mitogénicas al interior del citoplasma y nucleolo de la célula. En una célula normal la mayoría de las moléculas RAS están presentes en su forma inactiva⁵⁰.

c-erbB. Es un protooncogen que codifica para el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR). Los receptores del factor de crecimiento transmiten la información del entorno extracelular (factores de crecimiento) a diferentes vías de señalamiento intracelular, los más importantes son los receptores transmembranales tirosincinasa. La sobreexpresión de este gen ha sido relacionado con una amplia gama de tumores²².

Genes supresores de Tumor: Son genes involucrados en el control de la apoptosis y la proliferación celular deteniendo el ciclo celular; su pérdida o inactivación permanente está asociada con el desarrollo tumoral^{10,16,17,22}.

TP53. Es un gen supresor de tumor. Su producto p53 es un factor de transcripción presente en cantidades muy pequeñas en todas las células normales. Bajo varios tipos de estrés (daño en el DNA, hipoxia, infección viral, disminución de factores de crecimiento o activación de oncogenes), p53 inicia una serie de activaciones; el resultado puede ser: la interrupción del ciclo celular, en G₁ por p21, en G₂ por p14 o la apoptosis por activación de BAX, PUMA o NOXA⁵¹.

Actualmente se sabe que p53 se encuentra mutado en alrededor del 50% de los cánceres en humanos, en cáncer pulmonar p53 se encuentra mutado en alrededor del 90% en SCLC y en alrededor del 50% en NSCLC²⁸.

El sistema inmunológico

El sistema inmunológico detecta y elimina patógenos que son capaces de ocasionar algún daño al organismo. Además, este sistema lleva a cabo la vigilancia en contra de células que sufren transformaciones y que tienen la potencialidad de iniciar algún tipo de cáncer. Las células que llevan a cabo la eliminación de células tumorales son las células T, que forman parte del sistema inmune adaptativo¹¹. Dependiendo de su función, los linfocitos T se clasifican en dos subtipos principales: los cooperadores (Th por helper) y los citotóxicos (CTL: cytotoxic T lymphocytes por sus siglas en inglés). Se denominan cooperadores a los linfocitos T que interactúan con los linfocitos B o con otros linfocitos T y les ayudan a dividirse, diferenciarse y, en el caso de los linfocitos B, a sintetizar anticuerpos. Los linfocitos T cooperadores expresan en su membrana la molécula CD4, mientras que los CTLs expresan CD8³².

Esta “cooperación” consiste en la generación de señales que bien pueden ser moléculas de coestimulación que interaccionan con otras moléculas de la célula con la que coopera, o bien a través de la liberación de factores solubles sintetizados por el linfocito Th denominados genéricamente citocinas³².

Los CTLs, después de reconocer a la célula blanco (células tumorales o células infectadas por patógenos intracelulares), inducen muerte a través de la vía de exocitosis granular dependiente de calcio. El CTL libera perforinas y granzimas de sus gránulos citotóxicos para ocasionar la apoptosis de la célula blanco. En otros casos, la muerte se produce a través de la interacción del ligando de muerte (FasL), la cual se mencionará más adelante³².

El reconocimiento de la célula blanco por parte de los CTLs se lleva a cabo a través del complejo TCR (receptor de célula T), el cual reconoce antígenos asociados a moléculas clase I del MHC en la superficie de las células presentadoras de antígeno o de las células blanco. Como consecuencia del reconocimiento de antígeno por el TCR se generan señales que se transmiten al interior de la célula en forma de reacciones bioquímicas que llegan hasta el núcleo, en respuesta se comienzan a transcribir un conjunto de genes que permitirán al CTL desarrollar su función efectora. La activación del CTL requiere

un segundo conjunto de señales generadas por las moléculas coestimuladoras. La molécula coestimuladora más importante es CD28 con sus ligandos B7.1 y B7.2 que activan por completo al CTL³².

Otro grupo importante en llevar a cabo la vigilancia inmunológica en contra de tumores son las células NK, diversos estudios han revelado que las células recientemente transformadas pueden ser detectadas y eliminadas después de la interacción directa con estas células efectoras del sistema inmunológico innato⁴².

Las NK eliminan a células tumorales deficientes de moléculas clase I del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC)¹⁸, su citotoxicidad está mediada vía perforinas y la producción de una variedad de citocinas (que incluye al Interferon gamma, IFN- γ) después de la interacción de sus receptores de superficie celular con sus respectivos ligandos. Las NK responden también a muchas citocinas, incluyendo interleucina 2 (IL-2), IL-12, IL-15 e IFNs incrementando su actividad citolítica, secretora y antitumoral⁴².

II. ANTECEDENTES

Tipos histológicos del carcinoma pulmonar

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha clasificado al carcinoma broncogénico en cuatro tipos histológicos principales: El adenocarcinoma, el carcinoma de células escamosas, el carcinoma de células grandes (los cuales conforman el grupo de carcinoma de células no pequeñas NSCLC) y el carcinoma pulmonar de células pequeñas (SCLC)^{28,52}.

Adenocarcinoma. La OMS define al adenocarcinoma como un tumor epitelial maligno con patrones de crecimiento tubular, glandular (acinar) o papilar y/o con producción de moco⁵².

El adenocarcinoma es el tipo histológico más común del cáncer de pulmón, registrando del 30-35% de todos los casos. Es la causa más común de muerte de cáncer pulmonar en mujeres y no fumadores. Ocurre en la periferia del pulmón, a menudo resulta asintomático hasta el final de su curso. Frecuentemente los tumores se extienden a la pleura; es decir, generan metástasis. Más de la mitad de los pacientes con adenocarcinoma son detectados por un nódulo asintomático o por radiografía de rutina. El adenocarcinoma presenta en su mayoría características tales como ser periférico y presentar pigmentación. Los cortes de superficie del tumor son de blancos a gris pálido con pigmentos negros y brillosos si hay presencia de mucina⁵².

Carcinoma de células escamosas o epidermoide. Este tipo histológico registra aproximadamente un tercio del total de casos de carcinomas broncogénicos. Su histogénesis puede estar relacionada con inflamación crónica y daño del epitelio bronquial el cual inicia una sustitución del tejido epitelial columnar ciliado normal por epitelio escamoso^{12,52}.

La mayoría de los carcinomas epidermoides surgen en forma central de cualquiera de los bronquios principales segmentados o lobulares. El carcinoma epidermoide suele presentar formas firmes, no encapsuladas, masas claramente localizadas en los bronquios principales segmentados o lobulares, característicamente se presenta una queratinización o formación de puentes intracelulares^{12,52}.

Carcinoma de células grandes. El carcinoma de células grandes está definido por la OMS como un tumor epitelial maligno de células con núcleo alargado, nucleolo prominente, abundante citoplasma y usualmente bordes bien definidos. El diagnóstico se realiza a menudo por exclusión, cuando los elementos de diferenciación entre carcinoma glandular y escamoso no están presentes. La tinción para mucina es imperativa para hacer el diagnóstico, además ésta debe ser citoplasmática para poder ser considerada positiva⁵².

El carcinoma de células grandes representa del 10-20% de los tumores broncogénicos. Estos tumores carecen de cualquier característica de diagnóstico que sugiere su identificación, previa a la realización de una biopsia. Tienden a crecer rápidamente, presentar metástasis temprana y están muy estrechamente relacionados con el hábito tabáquico⁵².

Carcinoma de células pequeñas. El carcinoma de células pequeñas registra aproximadamente el 20% del total de cánceres de pulmón. Está caracterizado porque se origina en las vías aéreas centrales y por su composición histológica de capas de células pequeñas de escaso citoplasma. El carcinoma de células pequeñas es un tumor de origen neuroendócrino y muy agresivo, con frecuencia de metástasis temprana⁵².

Más del 90% de los tumores de células pequeñas presentan una localización central, típicamente son de colores blanco-grisáceos, blandos y voluminosos con áreas de hemorragia y necrosis, generalmente crecen alrededor de los bronquiolos principales y pueden resultar en estenosis secundaria. El tumor se extiende típicamente a través de los ganglios linfáticos y puede invadir el tejido vascular⁵².

Ciclo celular

El ciclo celular representa una secuencia ordenada de eventos que ocurren en la división mitótica de células eucarióticas. Se divide básicamente en cuatro fases que se suceden en un orden bien definido (Figura 1), cada una de las cuales debe ser completada satisfactoriamente antes de que de inicio la siguiente.

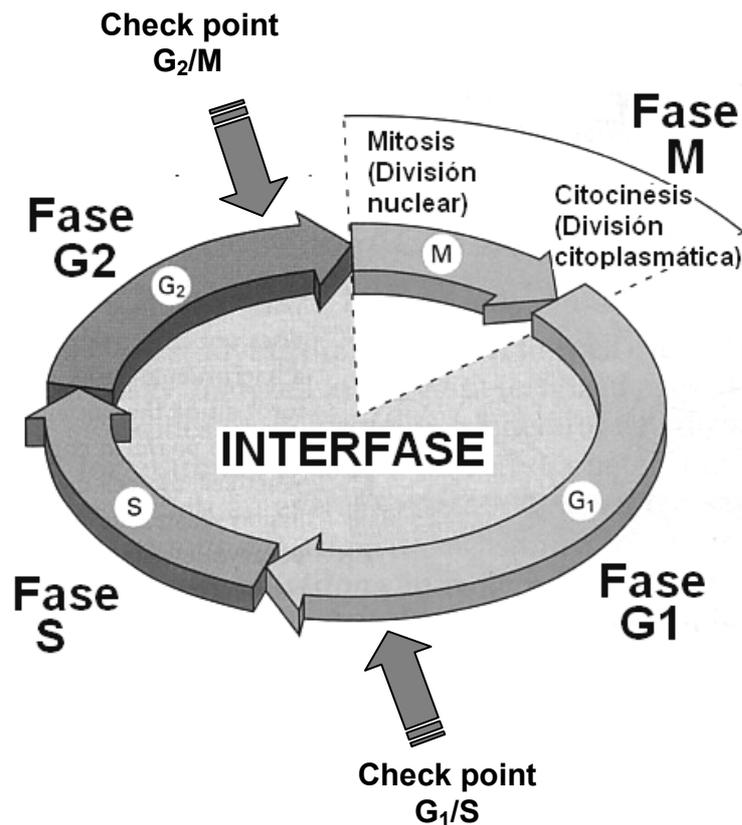


Figura 1. Ciclo celular.

La serie de procesos por los que una célula da lugar a dos células hijas se denomina ciclo celular. Consta de cuatro fases: G₁, S, G₂ y M. La progresión de la célula a través del ciclo se encuentra estrictamente controlada mediante puntos de revisión (Check points), los cuales aseguran que cada fase sea satisfactoriamente completada antes de dar inicio a la siguiente.

La fase de G₁ comienza después de la mitosis; la síntesis de muchos elementos citoplasmáticos, incluyendo ribosomas, enzimas y organelos, se lleva a cabo durante este período. En la fase S, la replicación del DNA produce una copia de cada cromosoma. En el segundo período de crecimiento y síntesis, la fase G₂

sucede como un prelude a la mitosis **M** donde la célula finalmente se dividirá en dos células hijas^{1,43}.

La progresión de las células eucarióticas a lo largo del ciclo celular en sus principales transiciones es mediada por un ensamblaje secuencial y activación de una familia de enzimas, las cinasas dependientes de ciclina (CDKs); su activación está determinada por su asociación a proteínas denominadas ciclinas, las cuales son subunidades reguladoras del complejo ciclina-cinasa^{25,43}.

Puntos de revisión (check points)

Check point G₁/S

En este punto de revisión se controla el transcurso de la célula eucariótica desde el primer intervalo, la fase G₁ a la fase de síntesis de DNA, fase S. Dos complejos reguladores son fundamentales en el control de este punto, CDK4-6-ciclina D y CDK2-ciclina E y el complejo de transcripción que incluye a Retinoblastoma (pRb) y E2F^{25,33}.

pRb es constituyente de un módulo transcripcional el cual tiene el control del progreso de la fase G₁ a la fase S, al menos en parte, mediante la represión de la actividad del factor de transcripción E2F que promueve la proliferación celular. La fosforilación de pRb por CDK4-6 y CDK2 disocian al complejo represor pRb, permitiendo la transcripción de los genes de la fase S que codifican para proteínas que amplifican el cambio de G₁ a S y que se requieren para la replicación del DNA^{22,25,49}.

Existen múltiples estímulos que ejercen influencia sobre el control en este punto de revisión entre los que se incluyen, el factor de crecimiento transformante (TGF- β), daño al DNA y ausencia de factores de crecimiento, entre otros. Los primeros dos actúan mediante la inducción de miembros de INK4 o Kip/Cip de la familia de inhibidores de cinasas del ciclo celular. El TGF- β adicionalmente inhibe la fosforilación de pRb, el cual bloquea la proliferación al secuestrar al factor de transcripción E2F necesario para la progresión del ciclo celular^{10,22}.

La ausencia o retiro de los factores de crecimiento activa a GSK3 β , que fosforila a la ciclina D iniciando una rápida ubiquitinización y degradación proteosomal. La

ubiquitinización, la exportación nuclear y la degradación son mecanismos comúnmente usados para la reducción rápida de la concentración de las proteínas que controlan el ciclo celular⁴⁹.

Check point G₂/M

El punto de revisión G₂/M previene que la célula entre a mitosis (fase M) si el DNA se encuentra dañado. El complejo regulador de mayor importancia en esta fase se compone de la cinasa Cdc2 unida a ciclina B. Durante la fase de G₂, Cdc2 se mantiene inactiva por la cinasa Wee1, la cual es una cinasa que fosforila residuos de tirosina cercanos al sitio catalítico de Cdc2, bloqueando la actividad de ésta. Conforme la célula se aproxima hacia la fase M, Cdc2 es activada estableciendo una reacción de amplificación que conduce a la célula hacia la mitosis^{22,49}.

La inactivación de los puntos de revisión del ciclo celular es la principal causa de la inestabilidad en el genoma que conduce a la carcinogénesis.

Apoptosis

La apoptosis fue descrita por primera vez en 1972, es una serie de eventos controlados genéticamente los cuales la propia célula dirige, ejecuta y que finalizan con su muerte²².

La apoptosis desempeña un papel importante durante la embriogénesis, en la homeostasis y la eliminación de células alteradas. En el sistema inmunológico la apoptosis es crucial en la selección del repertorio de células T en el timo, en la eliminación de linfocitos T auto-reactivos, la eliminación de linfocitos T efectores posterior a la respuesta inmunológica efectiva y en la inducción de muerte de células blanco por linfocitos T CD8+ y células NK (Natural Killer)⁹.

El señalamiento de la apoptosis puede estar mediado por ligandos específicos y receptores de muerte (vía extrínseca de regulación de la apoptosis) que son capaces de liberar señales de muerte del micro medioambiente y pueden activar la ejecución de la apoptosis en el citoplasma y organelos de la célula blanco. La apoptosis también puede ser activada desde el interior de la célula a través de sensores específicos que se encuentran en el núcleo celular y en el citoplasma (vía intrínseca o de la mitocondria). Ambas vías de señalización de la apoptosis convergen en una vía común, ver Figura 2, causando la activación de enzimas efectoras llamadas caspasas^{4,9,39}.

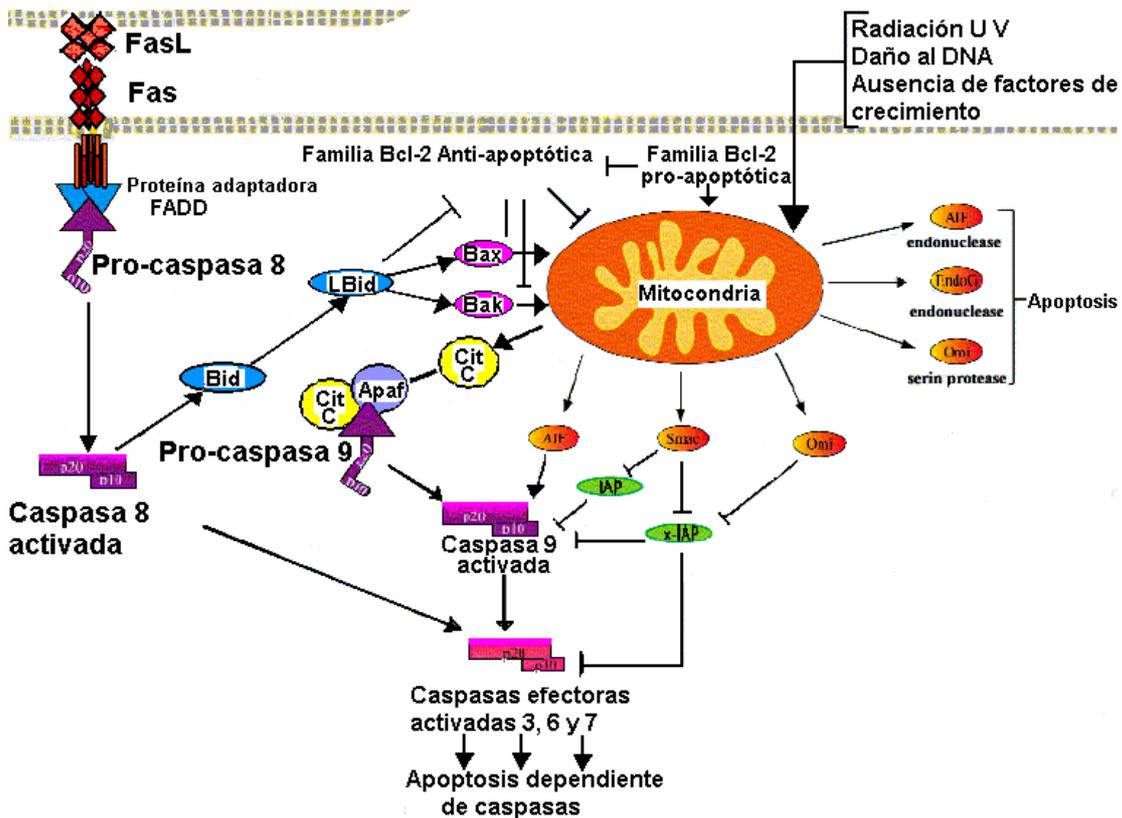


Figura 2. Vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis.

Tanto la vía extrínseca de la apoptosis como la intrínseca, convergen en una vía común, mediada por un miembro de la familia de Bcl-2 pro-apoptótica llamada Bid, la cual es activada por caspasa 8, activada en la vía extrínseca.

Vía receptores de muerte

Los receptores de muerte pertenecen a una gran familia conocida como receptores del factor de necrosis tumoral (por sus siglas en inglés TNF-R), los cuales transducen las señales apoptóticas del espacio extracelular hacia el interior de la célula. La familia de TNF-R la constituyen seis miembros que incluyen TNF-R1, FAS, y los receptores de muerte (Death receptor DR) DR3, DR4, DR5 y DR6, los cuales presentan en común un dominio extracelular rico en cisteína necesario para la unión con sus respectivos ligandos y un dominio intracelular de muerte (death domain DD) requerido para la transducción de la señal apoptótica^{9,39}, ver Figura 3.

Los ligandos para estos receptores forman una familia conocida como familia del TNF la cual incluye a TNF α , linfotóxina (lymphotoxin LT α), Ligando de Fas (FasL), Ligando Apo-3 (Apo-3-L) y TRAIL (Ligando de inducción de apoptosis relacionado a TNF). Estos ligandos causan la trimerización de sus respectivos receptores de membrana en la célula blanco, la cual es requerida para la señalización de la apoptosis. Una vez activado, el receptor de muerte recluta proteínas adaptadoras al interior de la célula, las cuales tienen básicamente la función de atraer y facilitar la unión de la enzima iniciadora de la apoptosis, la procaspasa 8, lo que da lugar a la formación del complejo de señalización de inducción de muerte (por sus siglas en inglés DISC). A continuación, la procaspasa 8 es activada proteolíticamente a caspasa 8, la cual activará a las caspasas efectoras de la vía común de la apoptosis (caspasas efectoras 3, 6 y 7)^{9,39}.

Vía de la mitocondria

En esta vía, la mitocondria induce la liberación de citocromo *c* hacia el citosol como respuesta a algún tipo de estrés como puede ser daño al DNA, radiación, agentes quimioterapéuticos o a una restricción de factores de crecimiento. Una vez liberado hacia el citoplasma celular, el citocromo *c* recluta al factor-1 adaptador de proteasa apoptótica (Apaf-1) y a la enzima iniciadora de la apoptosis, procaspasa 9. De esta manera citocromo *c*, Apaf-1 y la procaspasa 9 forman el complejo llamado apoptosoma; dentro de éste, la procaspasa 9 es

activada enzimáticamente a caspasa 9, la cual activará a las caspasas efectoras antes indicadas^{9,39}.

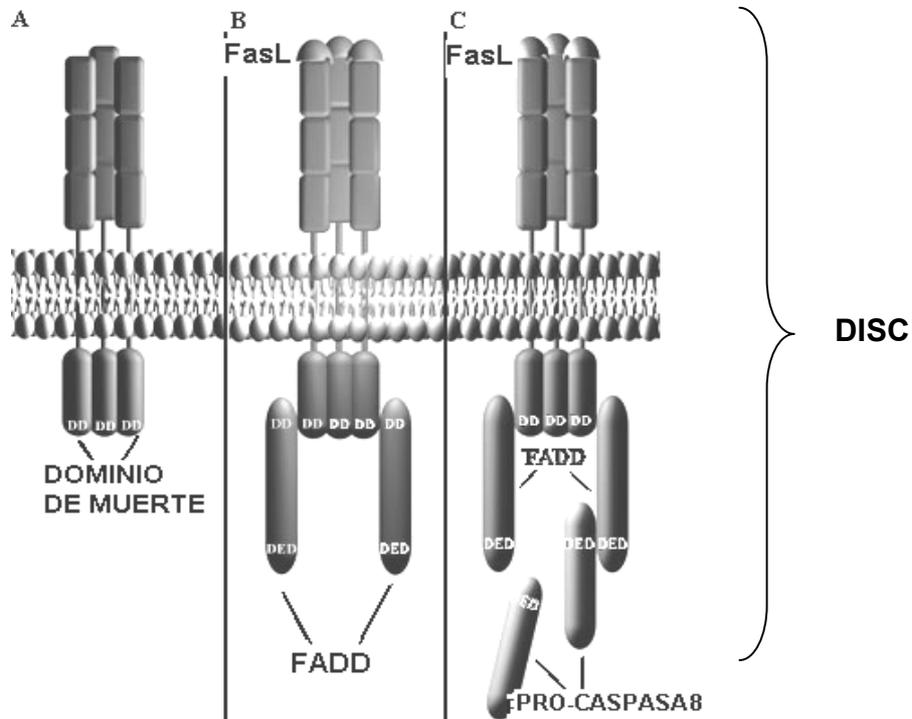


Figura 3. Vía extrínseca de la apoptosis.

A) La familia de receptores del factor de necrosis tumoral poseen un dominio intracelular llamado dominio de muerte. B) La unión del ligando al receptor ocasiona la trimerización de éste, paso necesario para su activación. Una vez activado, el receptor de muerte recluta a proteínas adaptadoras que poseen un dominio efector de muerte (FADD). C) La proteína adaptadora recluta a la procaspasa 8, activándola a caspasa 8. Dicha caspasa desencadena el proceso de apoptosis mediante la activación de las caspasas efectoras.

La vía de la mitocondria es controlada por miembros de la familia Bcl-2, que funcionalmente se dividen en dos grupos, proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w) y pro-apoptóticas (Bax, Bak, Bok, Bad, Bid, Bim, NOXA, PUMA); estas últimas son responsables de la permeabilización de la membrana de la mitocondria mediante la formación de un canal, para ello dichos miembros deben de formar homodímeros. Miembros de Bcl-2 anti-apoptóticos interactúan con sus homólogos pro-apoptóticos para formar heterodímeros evitando así la formación del poro^{9,39}.

Fases y características morfológicas de la apoptosis.

La apoptosis puede dividirse en tres fases distintas: La fase de inicio, en la cual la célula recibe señales potencialmente letales que irreversiblemente la dirigirán hacia su muerte; la fase de ejecución, durante esta fase ocurren los principales cambios estructurales, y finalmente la fase de eliminación en la que los restos celulares son removidos por fagocitosis⁴⁶.

Al comienzo de la apoptosis se presentan cambios morfológicos importantes, la célula reduce su tamaño, pierde una tercera parte de su volumen en pocos minutos, aunque no se conoce bien el mecanismo de encogimiento, bien podría estar involucrado la pérdida de iones así como también de agua. En el citoplasma existen cambios en el citoesqueleto que acompañan al encogimiento, el resultado es el fenómeno conocido como “blebbing” (aspecto de burbujas que emergen de la membrana plasmática). Por esta acción, la célula apoptótica usualmente se separa en cuerpos apoptóticos, algunos de los cuales contienen cromatina. La membrana plasmática se mantiene íntegra⁴.

La apoptosis también es acompañada por cambios en la membrana plasmática, el que ha sido más estudiado es el relacionado al fosfolípido *fosfatidilserina* (PS). En la membrana plasmática normal toda la PS está confinada al interior de la misma, de hecho la enzima *aminofosfolípido transferasa* se encarga de que cualquier molécula de PS que se encuentre en la porción extracelular sea rápidamente regresada a su configuración normal. Poco después de que la apoptosis comienza, la PS se distribuye por igual en ambos lados de la membrana por un mecanismo que aún no está claramente definido. De esta manera, la PS queda expuesta en la parte exterior de la membrana de la célula. Las células fagocíticas poseen receptores específicos para PS, por lo que al reconocerla se unen y fagocitan a las células que se encuentren en apoptosis. Mediante esta vía, la célula en apoptosis no libera al espacio extracelular moléculas que inducen la inflamación^{4,6,24}.

La cromatina que normalmente está compuesta de una mezcla de regiones condensadas y abiertas (heterocromatina y eucromatina) de DNA y proteínas se condensa. Este cambio se debe a la fragmentación del DNA, inicialmente en

secciones de entre 50 a 70 kilobases y en algunas células en unidades de hasta 1 o varios nucleosomas de largo (un nucleosoma consiste en un núcleo de histona rodeado de 180 pares de bases de DNA). Esta degradación es el reflejo de la acción de endonucleasas que cortan al DNA en la unión entre nucleosomas ya que esta porción no está bien protegida por las histonas. La célula sólo puede reparar algunas rupturas simultáneas que sufre la doble hebra de DNA; en la apoptosis el daño al DNA se extiende por arriba de unas 300,000 rupturas por cromosoma las cuales no pueden ser reparadas⁴.

Mecanismos de escape tumoral

En años recientes se ha demostrado la importancia del sistema inmunológico en la prevención del desarrollo tumoral, así como también de los requerimientos moleculares para el adecuado funcionamiento de los CTLs en contra del tumor.

Sin embargo, los CTLs con frecuencia fallan en el control del crecimiento tumoral *in vivo* y de esta manera solo una minoría de los pacientes tiene por ahora beneficio de la terapia antitumoral basado en los linfocitos T. Muchos estudios indican que los defectos en el desarrollo o ejecución de la respuesta antitumoral son comunes. Varios mecanismos han sido sugeridos para explicar éstas alteraciones, los tumores parecen protegerse contra el reconocimiento o ataque de los CTLs por varios mecanismos^{11,41,47}.

En este contexto, se ha propuesto que la falla en la protección del sistema inmunológico, es debida a características intrínsecas de las células tumorales, las cuales no permiten la inducción de una respuesta inmunológica efectiva. Sumado a este, se ha observado que los pacientes con cáncer presentan linfopenia fenómeno ya observado desde 1968 por Krant y cols.¹⁴ En la Tabla 1 se resumen algunos de los mecanismos principales¹¹.

Una de las estrategias de escape inmunológico reside en la presentación de antígeno, la cual se encuentra alterada o dañada. Diversos estudios han indicado un cambio en la presentación de los antígenos, lo que resulta en la escasa o nula presentación del antígeno tumoral a las células T²³.

Por otra parte, las células tumorales frecuentemente disminuyen la expresión de las moléculas clase I del antígeno leucocitario humano (HLA); mutaciones en los

genes de expresión para el HLA le permiten a las células tumorales evadir el sistema inmunológico mediante la expresión de fenotipos diferentes^{11,18,40}.

La presentación de antígeno tumoral también se evita debido a defectos en la maquinaria encargada del procesamiento de antígeno. Por ejemplo, la disminución en la expresión de las subunidades del proteasoma LMP2 (polipéptido de bajo peso molecular) y LMP7. Asimismo dos proteínas relacionadas con el transporte de péptidos antigénicos hacia moléculas clase I del MHC TAP1/TAP2 (transporte asociado con el procesamiento de antígeno) se encuentran frecuentemente mutadas o disminuidas en las células tumorales^{11,40}.

Otro mecanismo que los tumores emplean para evitar su rechazo reside en la expresión de factores inmunosupresores. Una de las señales más potentes de inhibición es la relacionada al factor de crecimiento transformante (TGF- β). El TGF- β es miembro de una familia la cual pertenece a un grupo multifuncional de proteínas secretadas que tienen su función en el control del ciclo celular, diferenciación y muerte celular¹⁵. Diversos estudios han identificado que la vía de señalización del TGF- β está implicada en diferentes tumores humanos (por ejemplo: páncreas, hígado, mama, próstata y células hematopoyéticas), diversas investigaciones sustentan el concepto de que la secreción de TGF- β por las células tumorales son las responsables de suprimir la proliferación de los linfocitos T que infiltran en el tumor (TILs)^{20,41}. Además del TGF- β se han determinado otros factores que la célula tumoral sintetiza y libera al medio, los cuales inhiben la proliferación de los TILs; la interleucina 10 (IL-10), gangliósidos, indolamino 2,3-dioxigenasa son solo algunos ejemplos de dichos factores que en su mayoría detienen la proliferación de los linfocitos T en la fase G₁^{20,26,44}.

Tabla 1. Algunos de los mecanismos desarrollados por la célula tumoral para impedir la respuesta inmunológica adecuada.

Estrategia	Mecanismos
Ignorancia	Ausencia de señales de peligro (ausencia de proceso inflamatorio y proteínas de choque térmico). Falta de antígenos tumorales en órganos linfoides (activación deficiente de APC).
Presentación de antígeno alterada	Defectos en el procesamiento y presentación de antígeno (P ej. deficiencia en TAP y LMP2).
Resistencia a la Apoptosis	Sobreexpresión de moléculas antiapoptóticas (Bcl2, BclxL). Disminución en la expresión de moléculas proapoptóticas (Bax, Bad, caspasas).
Alteración en la proliferación y la funcionalidad de células T	Síntesis y liberación de moléculas que afectan la proliferación y la función de células T (TGF- β , gangliósidos, indolamino 2,3-dioxigenasa, IL-10, prostaglandinas).
¿Contraataque?	Expresión de FasL por la célula tumoral. Expresión de otros ligandos de muerte.

Las células tumorales no solo se resisten a su eliminación por el sistema inmunológico pasivamente. Se ha reportado que las células neoplásicas también pueden matar a los TILs, un fenómeno conocido como contraataque tumoral. Muchas publicaciones sustentan la idea del contraataque tumoral como un mecanismo de escape inmunológico. La alteración en la vía de señalamiento de la apoptosis en las células tumorales, por ejemplo la expresión de FasL, puede contribuir al desarrollo del tumor y al escape inmunológico^{3,8,30,31}. Sin embargo, el mecanismo de escape inmunológico a través de la regulación de FasL en las células tumorales permanece aún en controversia.

Hipótesis del contraataque tumoral

Diversos autores han reportado que las células tumorales de diferentes orígenes pueden expresar FasL e inducir apoptosis en células T que expresan el receptor Fas, apoyando así la teoría del contraataque tumoral como un mecanismo de escape inmunológico^{29,30,31,37}.

En el estudio de Otha y cols.³¹ se investigó la expresión y la funcionalidad de FasL en células de cáncer de páncreas humano. Mediante inmunohistoquímica encontraron la expresión de FasL en 37 (82%) de 45 muestras de pacientes con cáncer pancreático. Además, encontraron también apoptosis de los TILs en zonas adyacentes a las células tumorales.

Por su parte Gastman y cols.⁷ encontraron que líneas celulares de carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN) son capaces de activar el programa de muerte celular al interactuar con linfocitos tanto *in situ* como *in vitro*. Para la evaluación de la capacidad de SCCHN de inducir apoptosis en linfocitos T *in vitro*, realizaron cocultivos con las células Jurkat como blanco celular. La relación célula tumoral/linfocito T fue de 20:1 y de 80:1. La proporción de muerte encontrada, fue evaluada por el ensayo de fragmentación del DNA (ensayo de JAM), el cual osciló entre un 20 a 40%, dependiendo de la línea celular tumoral estudiada.

O'Connell y cols.³⁰ utilizaron RT-PCR y tinción inmunohistoquímica para detectar el mRNA y la proteína de membrana FasL, respectivamente, en la línea celular derivada de carcinoma de colon SW620. Para la determinación de la capacidad de inducir apoptosis, estos autores realizaron ensayos de JAM, empleando la línea celular Jurkat como blanco, las cuales fueron cocultivadas con la línea celular SW620 de cáncer de colon. Los cocultivos fueron incubados a 37°C por 24h. Los resultados mostraron una pronunciada fragmentación del DNA de las células Jurkat. El porcentaje de muerte encontrado fue mayor al 20% cuando la relación célula tumoral/célula Jurkat era 5:1 y se incrementaba hasta un 30% cuando la relación aumentaba 25:1. Por otra parte, Favre-Felix y cols.⁵ examinaron la misma línea celular SW620 y otras cinco líneas más de cáncer de colon para determinar la expresión del mRNA y la proteína para FasL así como su capacidad para inducir

apoptosis. Los resultados encontrados por Favre-Felix y cols. no coinciden con lo reportado por otros autores (Otha, Gastman, O'Connell), a pesar de encontrar el mRNA de FasL y la proteína en extractos celulares, al realizar análisis por inmunofluorescencia, no encontraron la proteína en la superficie de las células SW620 y consecuentemente no observaron inducción de apoptosis en células Fas positivas al realizar cocultivos de las células tumorales frente a las células Jurkat a las proporciones célula tumoral/Jurkat 1:1, 3:1 y 10:1.

En lo que respecta al cáncer pulmonar, Niehans y cols.²⁹ realizaron estudios en 6 líneas celulares de NSCLC y 10 de SCLC. Mediante ensayos de Western blot e inmunofluorescencia encontraron en todas las líneas celulares analizadas la presencia de FasL.

También evaluaron la funcionalidad de la expresión de FasL, mediante la realización de cocultivos empleando la línea celular Jurkat. Las células Jurkat en cocultivo presentaron una importante disminución en la viabilidad detectada por el colorante de exclusión azul tripano. Mediante estos resultados, los autores sugieren que las líneas de cáncer de pulmón en humanos expresan FasL funcional²⁹.

Por otra parte se ha reportado también que los TILs presentan una reducción en su capacidad de proliferación. Yoshino y cols.⁴⁸ evaluaron la capacidad de inhibición de la proliferación de células mononucleares de sangre periférica (por sus siglas en inglés PBMC) por la presencia del sobrenadante obtenido del cultivo de líneas celulares tumorales. Los PBMC obtenidos de donadores sanos fueron cultivados con anti-CD3 en medio de cultivo en presencia de diferentes concentraciones del sobrenadante obtenido del cultivo de líneas celulares de carcinoma pulmonar. La proliferación fue inhibida debido a la presencia del sobrenadante. Los autores concluyen que las células tumorales liberan factores inmunosupresores. Por su parte Alexander y cols.² evaluaron la capacidad de respuesta proliferativa en células T (T-TIL) que infiltran carcinomas de células renales. Los T-TIL mostraron una pobre respuesta a proliferar en respuesta a IL-2 y anti-CD3. Los autores concluyen que esta falta de respuesta a estímulos

proliferativos en los T-TIL sugiere una pérdida selectiva de una vía de señalamiento intracelular en común necesaria para la proliferación.

Por otra parte el grupo de trabajo de Prado y cols.³⁴ estudiaron las proporciones de las subpoblaciones de células T naïve, memoria y efectora provenientes de sangre periférica y derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar. Encontraron una elevada proporción de células con fenotipo de memoria y una baja proporción de células con fenotipo efector en el derrame pleural con respecto a la sangre periférica del mismo paciente. También estudiaron los porcentajes de células que expresaban Fas en cada una de las subpoblaciones de células CTLs tanto en derrame pleural como en sangre periférica en pacientes con adenocarcinoma. El resultado obtenido fue un porcentaje mayor de células positivas a Fas comparado con el de donadores sanos. En células con fenotipo naïve, el incremento encontrado fue hasta de tres veces mayor. Los autores sugieren que, la expresión temprana de Fas en los CTLs podría iniciar el proceso de apoptosis cuando éstas células interaccionen con las células tumorales pulmonares.

IIIa. JUSTIFICACIÓN

El cáncer pulmonar es un problema de salud pública ya que presenta una alta tasa de morbi-mortalidad. Las células tumorales pueden presentar diferentes mecanismos de resistencia a la respuesta inmunológica. Como mecanismo de evasión se ha propuesto que las células tumorales inducen apoptosis en linfocitos T, fenómeno que se ha denominado contraataque tumoral. Dicho fenómeno se encuentra aún en controversia, además, existen pocos reportes con respecto al cáncer pulmonar. Por lo anterior es necesario determinar si el contraataque tumoral forma parte de los mecanismos de evasión de los carcinomas de pulmón. Abatir la evasión tumoral permitirá la aplicación efectiva de la inmunoterapia en beneficio del paciente con cáncer.

IIIb. HIPÓTESIS

Los carcinomas pulmonares inducirán en los linfocitos T (representados por las células Jurkat) una alteración en la proliferación, y/o apoptosis.

IIIc. OBJETIVOS

Determinar el efecto de los carcinomas pulmonares sobre las fases del ciclo celular de los linfocitos T humanos.

Determinar si las células tumorales inducen apoptosis sobre los linfocitos T humanos.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

Se utilizaron seis líneas celulares derivadas de carcinoma pulmonar, tres tipo adenocarcinoma (A-427, A-549, y SKLU-1), y dos tipo epidermoide (Calu-1 y SKMES-1) las cuales fueron obtenidas de American Type Culture Collection, ATCC (Rockville, MD). Además, se utilizó la línea celular AJG-1 establecida a partir del derrame pleural de pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar. Se empleó la línea celular Jurkat como modelo de linfocito T humano. Todas las líneas celulares fueron cultivadas en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado al 10% con suero fetal bovino, 20 µg/mL de estreptomicina y 20 000 U/mL de penicilina G sódica (Sigma Chemical Co, St. Luis, MO, USA) en cajas para cultivo T-25 (Nunc, Dinamarca) con un volumen de 5 mL de medio, se incubaron en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37° C.

Todas las líneas celulares derivadas de carcinoma pulmonar mostraron características de adhesión, por lo que para su desprendimiento se empleó una disolución de tripsina-verseno al 0.05%.

Cocultivos de células tumorales con células Jurkat

Las células tumorales se ajustaron a una concentración de 2×10^5 ó 1×10^5 células/mL para los ensayos de 24 y 48 horas respectivamente, enseguida fueron sembradas en placas de 24 pozos (Costar, USA) y se incubaron a 37° C por 18 h, tiempo en el cual se alcanzó la subconfluencia. Posteriormente se aspiró el sobrenadante para eliminar las posibles células muertas y se agregó una suspensión de células Jurkat de concentración 5×10^4 ó 2.5×10^4 células/mL, para los ensayos de 24 o 48h.

Para el análisis del ciclo celular las células Jurkat fueron recolectadas y fijadas en etanol, ver el apartado Detección del pico subG₀ y análisis del ciclo celular.

Para la evaluación de la inducción de apoptosis de células de carcinoma pulmonar sobre linfocitos T detectada por marcaje con anexina-V-FITC, las células tumorales de carcinoma pulmonar fueron marcadas previamente con el fluorocromo PKH-26, ver apartado Detección de apoptosis por marcaje con anexina-V-FITC. Las células Jurkat se cocultivaron con las células tumorales marcadas. Como controles se emplearon células Jurkat sin tratamiento y células tumorales en ausencia de células Jurkat, las cuales fueron cultivadas y tratadas de la misma forma que el cocultivo. Este último control se empleó con el fin de determinar el porcentaje de células tumorales desprendidas y que pudieran ser consideradas como células Jurkat provocando alguna alteración en los resultados finales.

Detección del pico subG₀ y análisis del ciclo celular

Al finalizar cada uno de los períodos de cocultivo, las células Jurkat fueron recolectadas de los pozos por agitación suave y llevadas a tubos de polipropileno para ser lavadas con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS), se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min. El botón celular se resuspendió en 350 μ L de PBS, se tomó una alícuota para la determinación de la concentración celular por medio de conteo en cámara de Neubauer y se determinó la viabilidad por medio de tinción con el colorante de exclusión azul tripano.

A continuación las células se fijaron en etanol al 70% (v/v) a -20° C y se conservaron a esta temperatura al menos por 24h. Las células fijadas se lavaron con PBS, cada botón celular se resuspendió en una mezcla de tinción que consistía en PBS conteniendo 0.1% (v/v) de Triton X-100, 10 μ g/mL de yoduro de propidio (PI) y 10 μ g/mL de RNAasa libre de DNAasa; se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adquirieron por lo menos 10 000 eventos en el citómetro de flujo. Para el análisis del ciclo celular se empleó el programa de cómputo Modfit V 2.0

Detección de apoptosis por marcaje con anexina-V-FITC.

Marcaje de las células tumorales con el fluorocromo PKH-26

Las células tumorales se marcaron con el fluorocromo PKH-26 (Sigma Aldrich, New York). Este marcaje fue necesario para poder distinguir las células tumorales de los linfocitos T como se indica más adelante.

Las líneas celulares de carcinoma pulmonar se ajustaron a una concentración de 1×10^6 células/mL en medio sin suplementar, se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min y el botón celular se resuspendió en 0.1 mL de diluyente (Sigma Aldrich New York).

Previo al marcaje, el fluorocromo PKH-26 se diluyó a una concentración de $4 \mu\text{M}$ y rápidamente se agregó a la suspensión de células tumorales, se mantuvo en incubación a 25°C durante 5 min agitando periódicamente y cubriendo de la luz. El siguiente paso fue bloquear el marcador con un volumen igual de suero fetal, incubando 1 min a temperatura ambiente, el suero agregado se diluyó con un volumen igual de medio de cultivo suplementado. Las células marcadas fueron centrifugadas a 1500 rpm por 10 min, el botón celular se resuspendió en 3mL de medio de cultivo suplementado, se realizaron por lo menos tres lavados.

Finalmente, las células tumorales marcadas se ajustaron a una concentración de 2×10^5 ó 1×10^5 células/mL para los ensayos de 24 y 48 horas respectivamente, se sembraron en placas de 24 pozos y fueron incubadas a 37°C para iniciar el cocultivo con las células Jurkat. En este paso se tomó una alícuota de la suspensión celular recién marcada, se fijaron las células con paraformaldehído, y se conservaron en un tubo de ensayo cubierto de la luz a 4°C . Esta suspensión celular correspondió al tiempo inicial de incubación (tiempo cero).

Marcaje con anexina-V-FITC y análisis por citometría de flujo

Después del cocultivo las células Jurkat se recuperaron por medio de una agitación suave, se lavaron y se resuspendieron en $100 \mu\text{L}$ de una solución de tinción, la cual contenía anexina-V conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) en amortiguador HEPES, se incubaron durante 15 minutos y se analizaron

inmediatamente. La anexina-V-FITC unida a la fosfatidilserina extracelular es indicativo de células en apoptosis^{6,24}.

La suspensión celular fue analizada por citometría de flujo, empleando un haz de excitación de 488 nm y un filtro con paso de banda de 515 nm.

Para el análisis de las muestras se utilizó un citómetro FACScalibur de Beckton Dickinson (San José, California), empleando el programa de análisis Cell Quest. En todas las determinaciones se adquirieron 10 000 eventos por cada muestra. Empleando el programa antes mencionado se creó un gráfico de tamaño celular *versus* la granularidad, el cual fue empleado para situar la distribución de la población celular a estudiar, los linfocitos T, y se establecieron los parámetros que permitieran la distribución más homogénea de la población en una región.

Por otra parte, se creó también un gráfico de dispersión; en el eje de las ordenadas se detectó la fluorescencia debida al fluorocromo PKH-26 unido a la membrana de las células tumorales (canal FL3) y en el eje de las abcisas la granularidad. Las células Jurkat, al no tener marca, se localizaron cercanas al origen (10^0) y hasta un valor de fluorescencia no mayor de 10^1 . Las células observadas por encima de este valor correspondieron a las células tumorales, lo cual nos permitió distinguir entre las células tumorales y las células Jurkat. En este gráfico de dispersión se creó una región de análisis la cual contenía a las células Jurkat, a partir de dicha región se creó un histograma que mostraba la marca con anexina-V-FITC en el eje de las ordenadas contra el número de eventos en las abcisas.

Efecto de las células tumorales sobre el porcentaje de células Jurkat apoptóticas

Las células Jurkat a una concentración (5×10^4 células/mL) en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado, se expusieron a radiación ultravioleta (UV) durante treinta segundos (ensayos anteriormente realizados revelaron que este era el tiempo necesario para inducir apoptosis en las células Jurkat). Como control negativo se mantuvieron las células Jurkat sin tratamiento.

Las células Jurkat expuestas a radiación UV se cocultivaron con células tumorales marcadas con PKH-26 como se describió anteriormente. Como control se realizaron cultivos conteniendo sólo las células Jurkat. La suspensión de células Jurkat que no fue expuesta a radiación UV se empleó como control.

Los cocultivos se incubaron durante 24 horas a 37° C. Posteriormente, las células Jurkat de los cocultivos y controles fueron recolectadas y se aplicó la metodología antes mencionada para la detección de apoptosis por marcaje con anexina-V-FITC.

V. RESULTADOS

Alteración en la proliferación de linfocitos T

En general, las seis líneas celulares estudiadas indujeron la disminución de la concentración de los linfocitos T (células Jurkat) en los cocultivos en los dos períodos de incubación empleados, efecto que se distinguió con mayor claridad al determinar el porcentaje de inhibición, ver Tabla 1.

Tabla 1. Disminución en la concentración de las células Jurkat cocultivadas con las líneas tumorales.

	Línea celular	Tratamiento	24h		48h	
			X 10 ³ (cel/mL)	% Inhibición	X 10 ³ (cel/mL)	% Inhibición
ADENOCARCINOMA	SKLU-1	Cocultivo	80	24	190	17
		Control	105		230	
	A-549	Cocultivo	85	43	200	24
		Control	150		265	
	A-427	Cocultivo	98	7	215	17
Control	106		260			
AJG-1	Cocultivo	100	35	75	67	
	Control	165		230		
CARCINOMA EPIDERMÓIDE	Calu-1	Cocultivo	145	9	155	34
		Control	160		235	
	SKMES-1	Cocultivo	100	26	135	13
	Control	135		155		

Es importante señalar que durante los períodos de incubación así como también al momento de recolectar las células Jurkat, se realizaron observaciones al microscopio con la finalidad de identificar cambios morfológicos relacionados con la apoptosis. Las células Jurkat control proliferaron en suspensión formando

agregados celulares. Sin embargo, las células Jurkat que fueron cocultivadas con las diferentes líneas tumorales formaron agregados de menor tamaño; además, no se observaron cambios morfológicos característicos de la apoptosis.

Alteración en el ciclo celular y determinación del pico subG₀ en las células T

La población de células Jurkat se marcó con yoduro de propidio (PI), el cual se une estequiométricamente al DNA, y al ser analizada por citometría de flujo presentó un perfil del ciclo celular como el que se muestra en la figura 4.

Los resultados obtenidos se encuentran representados como histogramas del contenido de DNA *versus* el número de eventos, ver Figura 5 para los cocultivos con las líneas celulares SKLU-1 y SKMES-1. El porcentaje de las células Jurkat, en las distintas fases del ciclo celular bajo las diferentes condiciones, se muestran en la Tabla 2.

Las células Jurkat cocultivadas con las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar SKLU-1 y A-549 no presentaron cambios en el perfil del ciclo celular, al ser comparadas con las células control bajo ninguno de los períodos de incubación empleados, ver Figura 5 y Tabla 2. Sin embargo, la línea celular A-427 indujo la disminución del porcentaje de células Jurkat en la fase de G₀/G₁ con el consecuente aumento de la fase G₂/M a las 24h de incubación, mientras que para las 48h indujo el incremento del porcentaje de células Jurkat en las fases G₀/G₁ y S, con la concomitante disminución de la fase G₂/M.

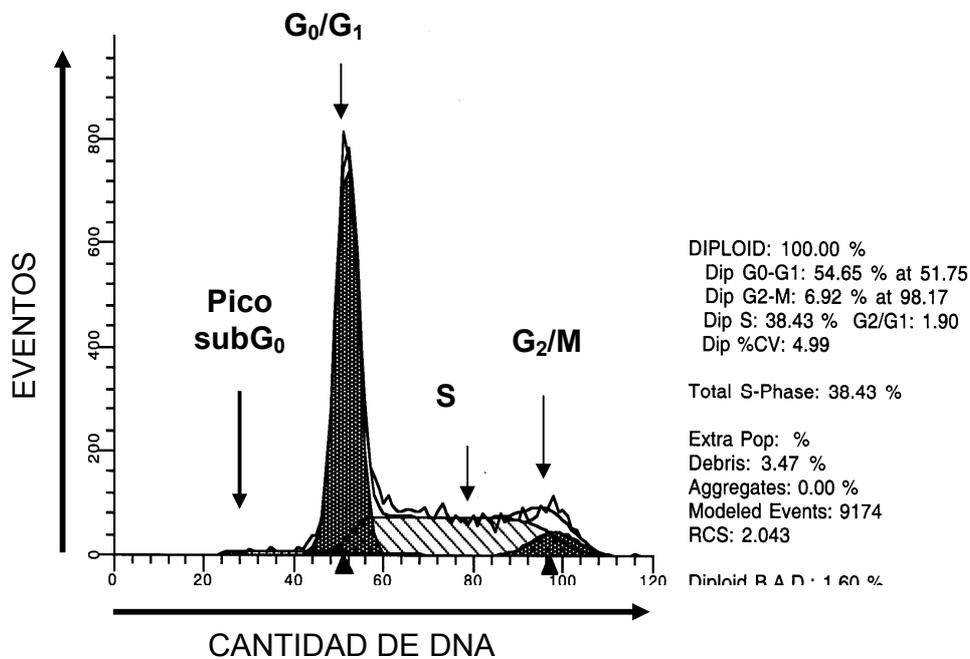


Figura 1. Análisis representativo del ciclo celular.

La figura muestra la distribución de células Jurkat sin tratamiento a través de las fases del ciclo celular. Se analizó el ciclo celular y la presencia del pico subG₀ en las células Jurkat control y cocultivadas empleando el programa de cómputo Modfit versión 2.0.

Por otra parte la línea celular AJG-1 indujo disminución de células en la fase S y aumento del porcentaje de células en la fase G₂/M a las 24h, mientras que para las 48h se observó un aumento en la proporción de células Jurkat en la fase S, con la consecuente disminución en la fase G₂/M.

Las células Jurkat cocultivadas con la línea celular Calu-1 presentaron un incremento en la proporción de células en la fase de G_0/G_1 , con la consecuente disminución de las fases S y G_2/M con respecto al control a las 24h, no se observaron alteraciones en las fases del ciclo celular a las 48h.

Además, la línea celular SKMES-1 indujo el aumento del porcentaje de células Jurkat en la fase G_0/G_1 y disminución en la fase y G_2/M a las 24h.

Tabla 2. Alteración en el perfil del ciclo celular de células Jurkat por cocultivo con líneas tumorales

	Línea celular	Tratamiento	Fases del ciclo celular					
			24h			48h		
			G_0/G_1	S	G_2/M	G_0/G_1	S	G_2/M
ADENOCARCINOMA	SKLU-1	Cocultivo	54	37	9	58	26	16
		Control	55	38	7	56	28	16
	A-549	Cocultivo	54	43	3	53	38	9
		Control	56	40	4	50	38	12
	A-427	Cocultivo	41	50	8	57	33	9
		Control	46	50	4	54	29	18
	AJG-1	Cocultivo	60	34	6	59	38	3
		Control	59	39	3	57	29	14
CARCINOMA EPIDERMÓIDE	Calu-1	Cocultivo	67	24	9	51	32	17
		Control	60	27	13	51	32	17
	SKMES-1	Cocultivo	71	25	4	57	35	8
		Control	64	27	8	55	32	13

Resultados representativos de al menos dos ensayos independientes.

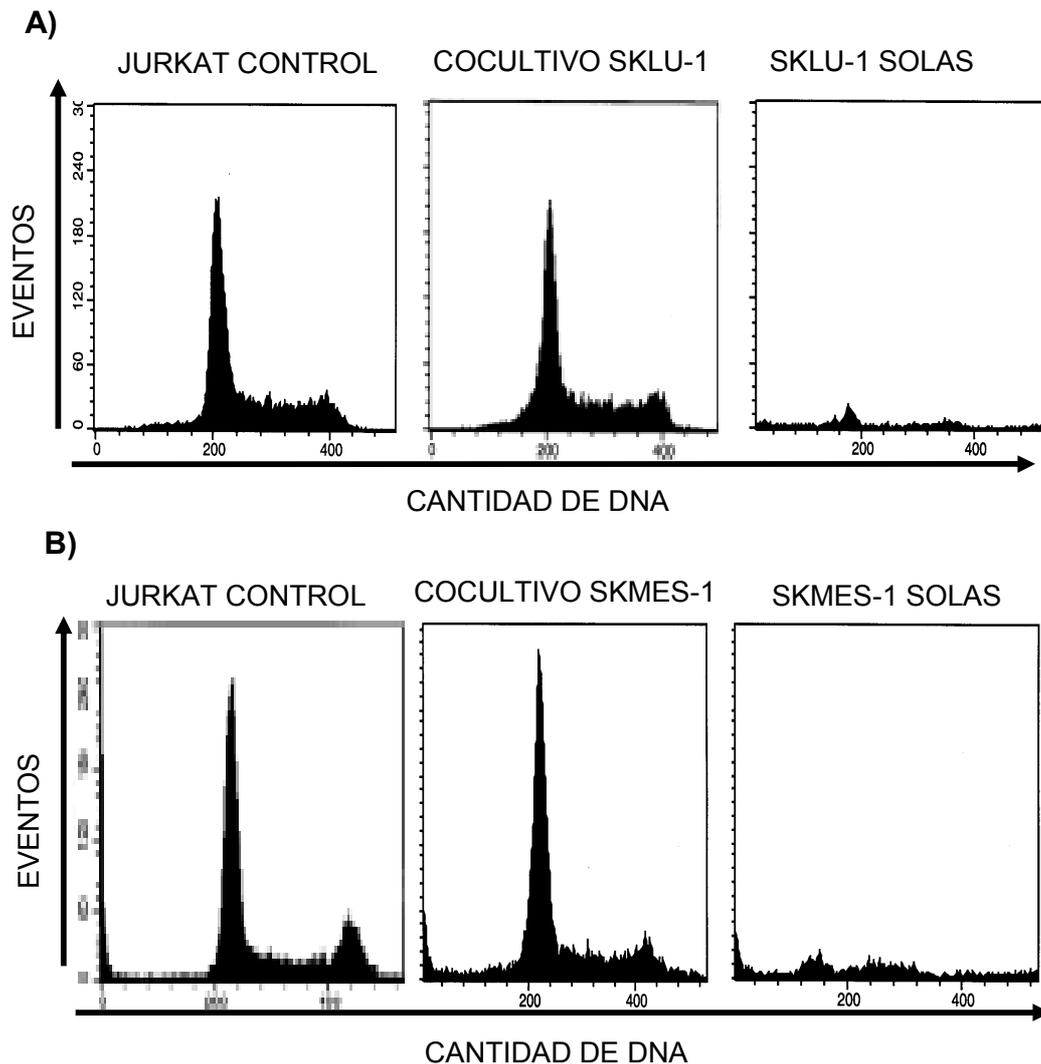


Figura 2. Histogramas de DNA de las células Jurkat cocultivadas 24h con las líneas tumorales SKLU-1 o SKMES-1.

A) Las células Jurkat cocultivadas en presencia de la línea celular SKLU-1 no presentan cambios en el perfil del ciclo celular comparadas con el control, además no se observan eventos en la región del pico subG₀ a las 24h de incubación. B) La presencia de las células SKMES-1 indujeron el aumento de la fase G₀/G₁ de las células Jurkat con respecto al control, pero no se observa la presencia del pico subG₀ (indicativo de apoptosis). En ambos casos se presentan los histogramas de las células de carcinoma pulmonar que se cultivaron en ausencia de células Jurkat, como un control interno para determinar si las células que pudieran desprenderse tuvieran alguna influencia en los resultados.

Detección del pico subG₀

Las células que experimentan apoptosis degradan su propio DNA por acción de endonucleasas, los fragmentos de DNA de estas células pueden ser extraídos por medio de permeabilización mediante el uso de un detergente, por lo que las células tratadas de esta manera presentan menor cantidad de DNA de aquellas que se encuentran viables¹. Con base a lo anterior, se evaluó la apoptosis en linfocitos T humanos causada por células de carcinoma pulmonar mediante la presencia del pico subG₀, ver Figura 4.

El análisis del ciclo celular permitió la evaluación concomitante de la presencia del pico subG₀ como resultado de la apoptosis en células Jurkat cocultivadas con líneas de carcinoma pulmonar.

En los histogramas obtenidos se observó que las células Jurkat, cocultivadas con cada una de las seis líneas de carcinoma pulmonar, no presentaron eventos en la región subG₀ bajo ninguno de los períodos de incubación probados, ver Figura 5 para las líneas SKLU-1 o SKMES-1.

Inducción de apoptosis en células Jurkat

Con el fin de determinar si las células Jurkat son susceptibles de la inducción de apoptosis por la vía del receptor de Fas, la línea celular Jurkat fue tratada con Fas ligando recombinante humano (FasLrh). También se indujo apoptosis en las células Jurkat por exposición a la radiación UV. La figura 6 muestra los histogramas obtenidos en ambas condiciones.

Las células en apoptosis exteriorizan el fosfolípido fosfatidilserina, el cual es considerado un marcador temprano de apoptosis; la anexina-V es una proteína que se une específicamente a este fosfolípido, y por estar conjugada al fluorocromo FITC es posible determinar la apoptosis en una población celular mediante citometría de flujo⁶.

Para la evaluación de la apoptosis en las células Jurkat inducida por las células de carcinoma pulmonar, se realizaron cocultivos con cada una de las líneas celulares a las 24 o 48 h.

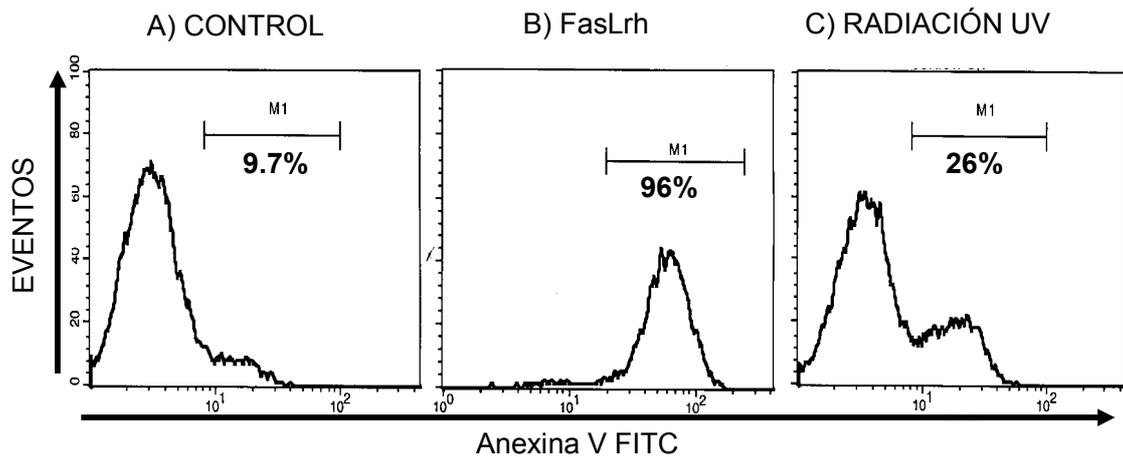


Figura 3. Las células Jurkat son susceptibles de la inducción de apoptosis por la vía de Fas ligando o radiación UV.

A) El histograma muestra la autofluorescencia de las células Jurkat viables. B) Se observa las células Jurkat tratadas con FasLrh, las células en apoptosis (96%) se marcan con anexina-V-FITC. C) Se observa la apoptosis de las células Jurkat (26%) expuestas a radiación UV.

Al comienzo de cada uno de los ensayos, las células tumorales fueron marcadas con el fluorocromo PKH-26, el cual se une a fosfolípidos de cadena larga ubicados al exterior de la membrana plasmática; dicho marcaje no afectó la viabilidad de las células tumorales. El marcaje con PKH-26 permitió distinguir entre la célula tumoral y la célula Jurkat a través del gráfico de dispersión PKH-26 *versus* granularidad, ver Figura 7 y 8 para los cocultivos con las líneas SKLU-1 o SKMES-1.

Las células Jurkat se localizaron y fueron delimitadas en la región R2, a partir de la cual se realizó el análisis para la evaluación de apoptosis, mediante la creación de histogramas para detección de anexina-V-FITC. Las células tumorales no se analizaron.

Al comparar los gráficos de dispersión del tamaño *versus* la granularidad de los cocultivos con cada una de las seis líneas celulares estudiadas, con respecto a los controles, se distingue en las células Jurkat un cambio en su granularidad así como en el tamaño, ver Figura 7 y 8. Esta alteración también se observa en el gráfico de dispersión PKH-26 *versus* granularidad.

Tabla 3. Las líneas tumorales no indujeron apoptosis en las células Jurkat.

	LÍNEA CELULAR	CÉLULAS EN APOPTOSIS			
		24h	%	48h	%
ADENOCARCINOMA	SKLU-1	COCULTIVO	4	COCULTIVO	4
		CONTROL	8	CONTROL	7
	A-549	COCULTIVO	3	COCULTIVO	2
		CONTROL	8	CONTROL	5
A-427	COCULTIVO	4	COCULTIVO	4	
	CONTROL	12	CONTROL	6	
AJG-1	COCULTIVO	2	COCULTIVO	10	
	CONTROL	3	CONTROL	10	
CARCINOMA EPIDERMÓIDE	Calu-1	COCULTIVO	4	COCULTIVO	2
		CONTROL	7	CONTROL	8
SKMES-1	COCULTIVO	3			
	CONTROL	9			

Datos representativos de al menos dos ensayos independientes.

Ninguna de las seis líneas celulares de carcinoma pulmonar indujeron apoptosis en las células Jurkat en ambos períodos de incubación empleados; sin embargo, es importante señalar que el porcentaje de células Jurkat en apoptosis en los cocultivos disminuyó con las seis líneas estudiadas, a las 24 y 48 h de incubación, ver Tabla 3. El efecto observado no solamente resultó contrario a lo que se esperaba, sino que también reflejó que en nuestro modelo de estudio se estaba llevando a cabo otro fenómeno, el cual causaba la disminución de las células Jurkat apoptóticas en presencia de las líneas de carcinoma pulmonar empleadas, por lo que se decidió evaluar el efecto de las células tumorales sobre células Jurkat apoptóticas.

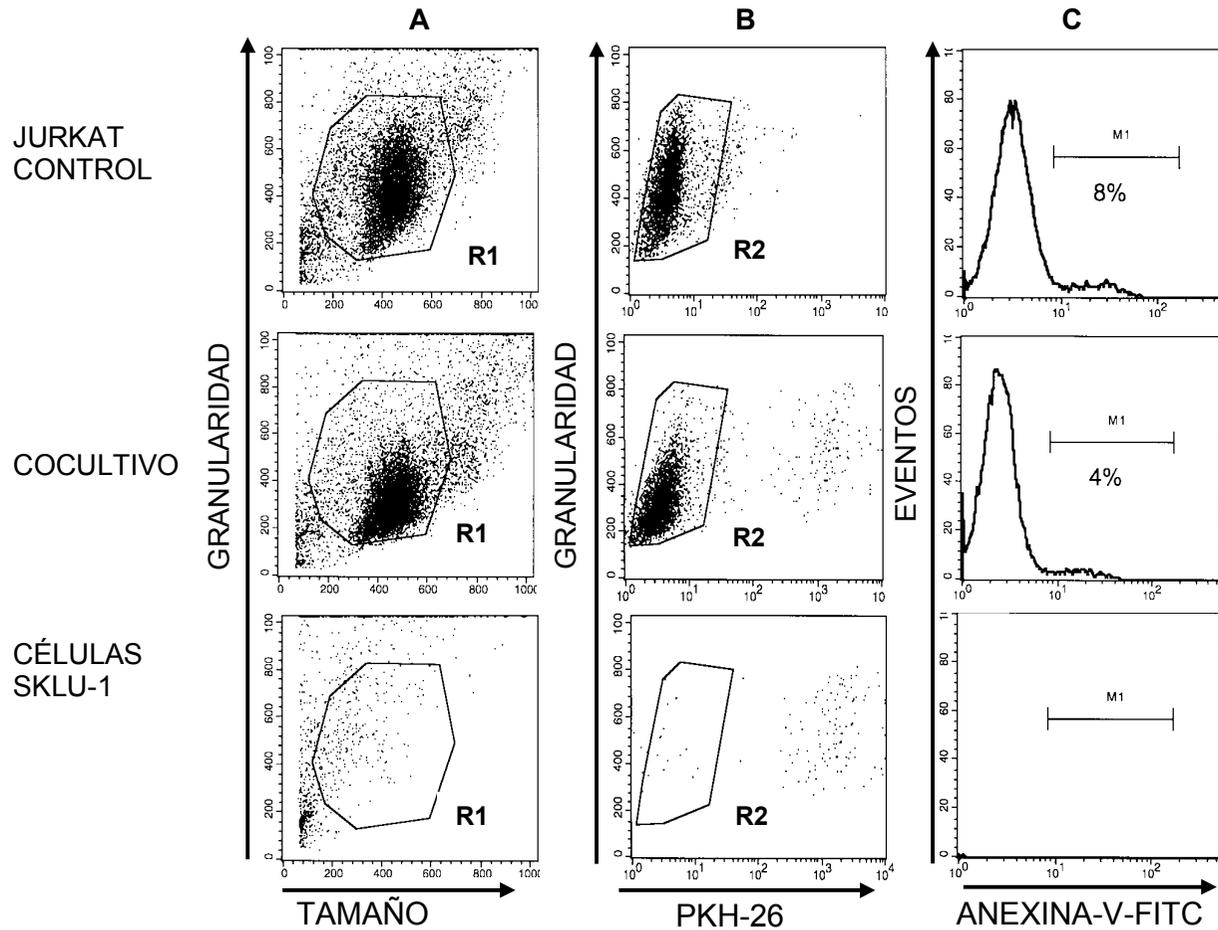


Figura 4. Determinación de apoptosis en células Jurkat cocultivadas con células SKLU-1 por marcaje con anexina-V-FITC.

A) Muestra la región R1 que delimita la población de células Jurkat estudiadas. B) Gráficos de dispersión de PKH-26 *versus* granularidad, empleado para seleccionar células Jurkat de células tumorales y delimitarlas en la región de análisis R2. C) Histogramas obtenidos a partir de la región R2, se determinó el porcentaje de células Jurkat en apoptosis.

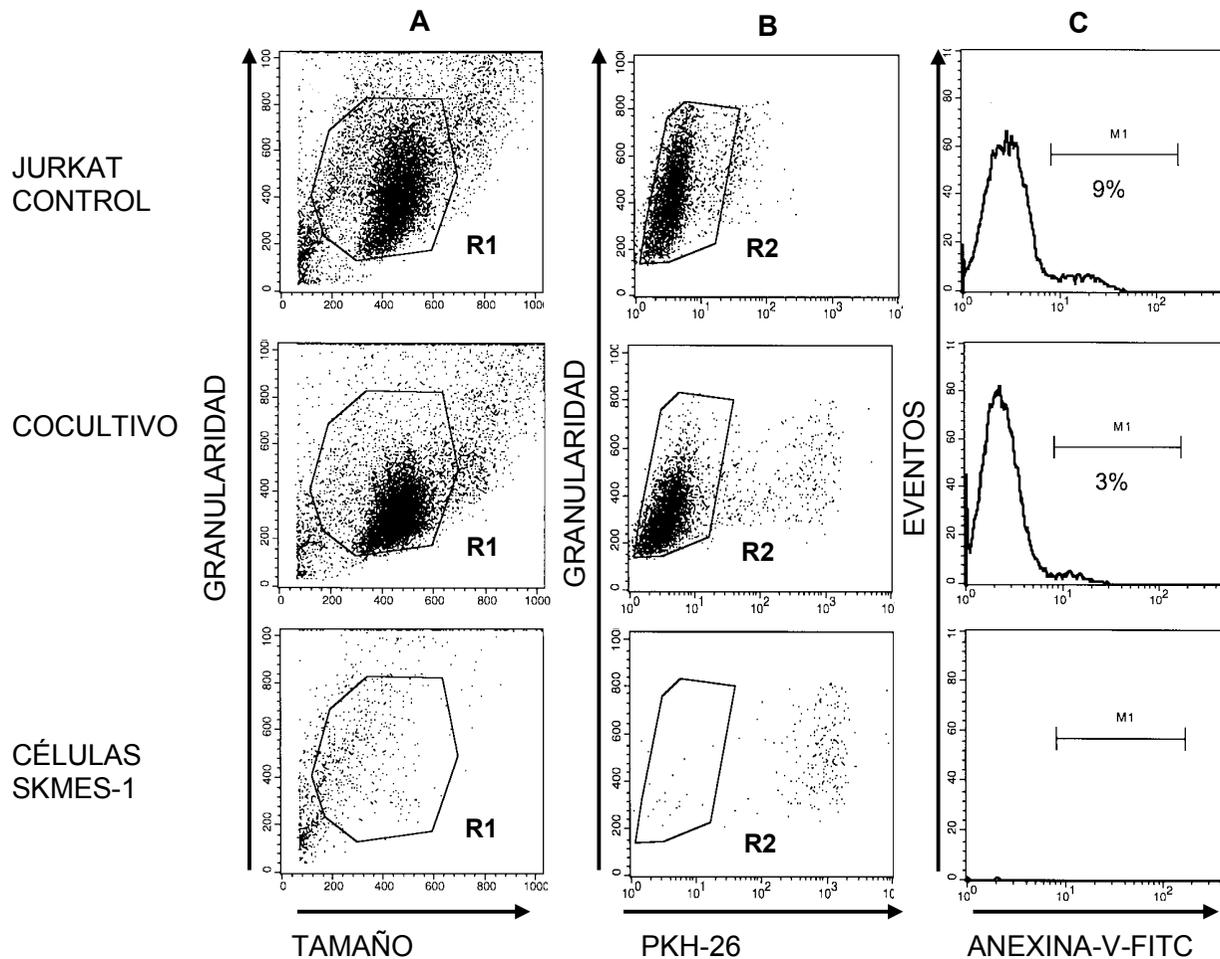


Figura 5. Determinación de apoptosis en células Jurkat cocultivadas con células SKMES-1 por marcaje con anexina-V-FITC.

A) Muestra la región R1 que delimita la población de células Jurkat estudiadas. B) Muestra los gráficos de dispersión de PKH-26 *versus* la granularidad empleados para seleccionar a las células Jurkat de células tumorales. C) Los histogramas de anexina-V-FITC mostraron que el porcentaje de células apoptóticas fue menor en el cocultivo.

Efecto de las células tumorales sobre las células Jurkat apoptóticas

Diversos estudios han reportado que la célula tumoral ha desarrollado la capacidad de endocitar células que se encuentran “moribundas” con el objeto de aprovechar nutrientes²¹. Con base en este antecedente y a lo observado en nuestros resultados, se realizaron dos experimentos de cocultivos independientes, empleando a las líneas celulares SKLU-1 o SKMES-1.

Cada ensayo incluyó tres condiciones, células Jurkat sin tratamiento como control, células Jurkat tratadas con radiación UV durante 30 segundos cultivadas solas y por último células Jurkat tratadas con 30 segundos de radiación UV y cocultivadas en presencia de células tumorales.

Se observó la disminución del porcentaje de células Jurkat apoptóticas en presencia de las células tumorales, al compararlas con las células Jurkat tratadas con UV cultivadas solas. La línea celular SKLU-1 indujo una disminución del porcentaje de células en apoptosis de 24% a 20%, ver Figura 9. Mientras que la línea SKMES-1 indujo una disminución de células Jurkat en apoptosis de 24% a 18%.

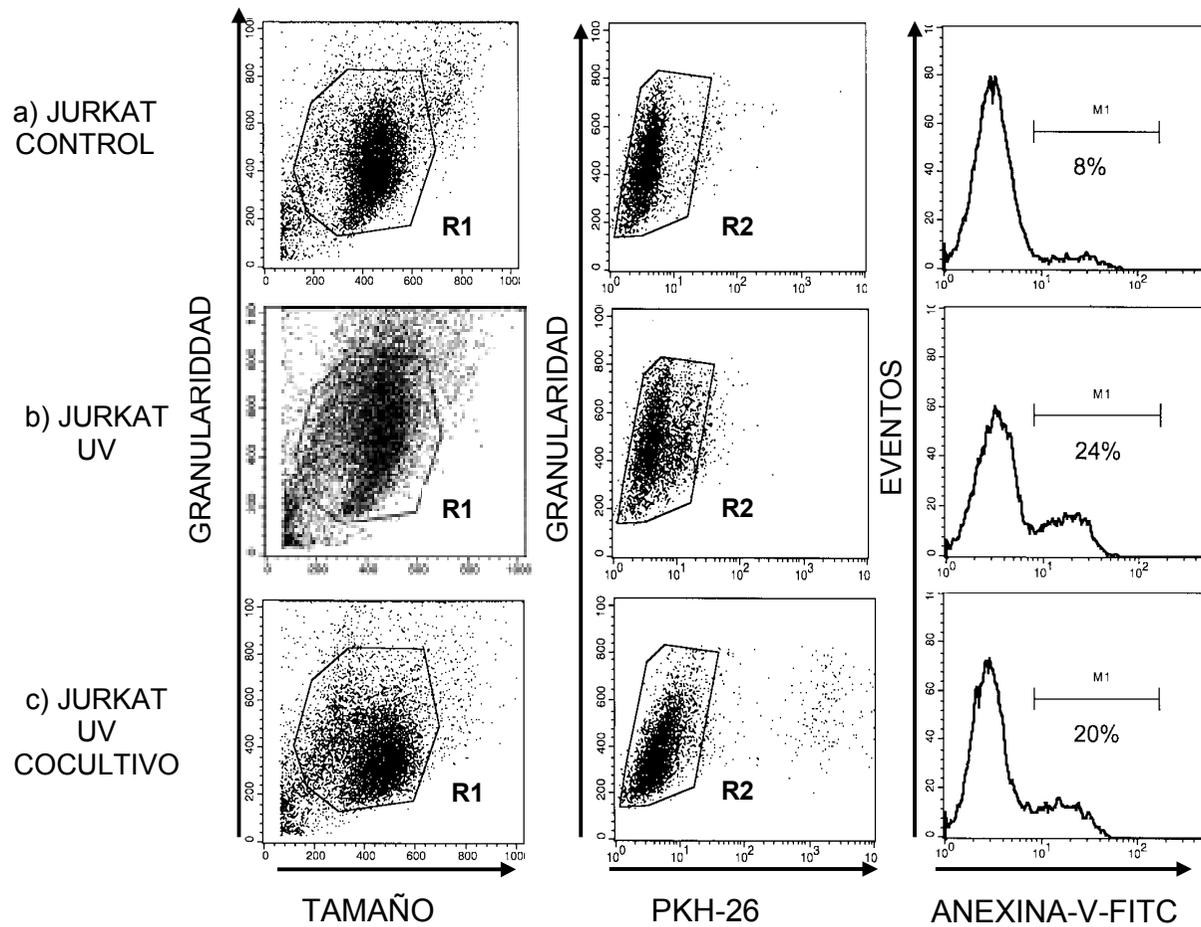


Figura 6. Disminución del porcentaje de células Jurkat apoptóticas tratadas con 30 segundos de radiación UV y cocultivadas con células SKLU-1.

- a) Jurkat control.
- b) Jurkat tratadas con UV
- c) Jurkat tratadas con UV y cocultivadas por 24h con la línea celular SKLU-1.

Evaluación de la apoptosis en células Jurkat por cocultivo con células tumorales a tiempos cortos

Dado que se observó que el porcentaje de células Jurkat en apoptosis en los cocultivos fue menor al compararlos con los controles, es posible que hayan sido endocitadas, este fenómeno pudiera evitar observar la posible inducción de apoptosis en las células Jurkat provocada por las líneas de carcinoma pulmonar.

Con el objeto de evitar este fenómeno, se realizaron cocultivos en presencia de las células tumorales SKLU-1 o SKMES-1 por separado empleando tiempos de 2, 4, 6 y 8 horas de incubación, al finalizar cada período las células fueron recolectadas y llevadas a pozos nuevos para continuar su incubación hasta completar 24 horas.

Los resultados obtenidos se observan en la Figura 10, en los cuales determinamos que las dos líneas celulares empleadas no indujeron apoptosis en las células Jurkat.

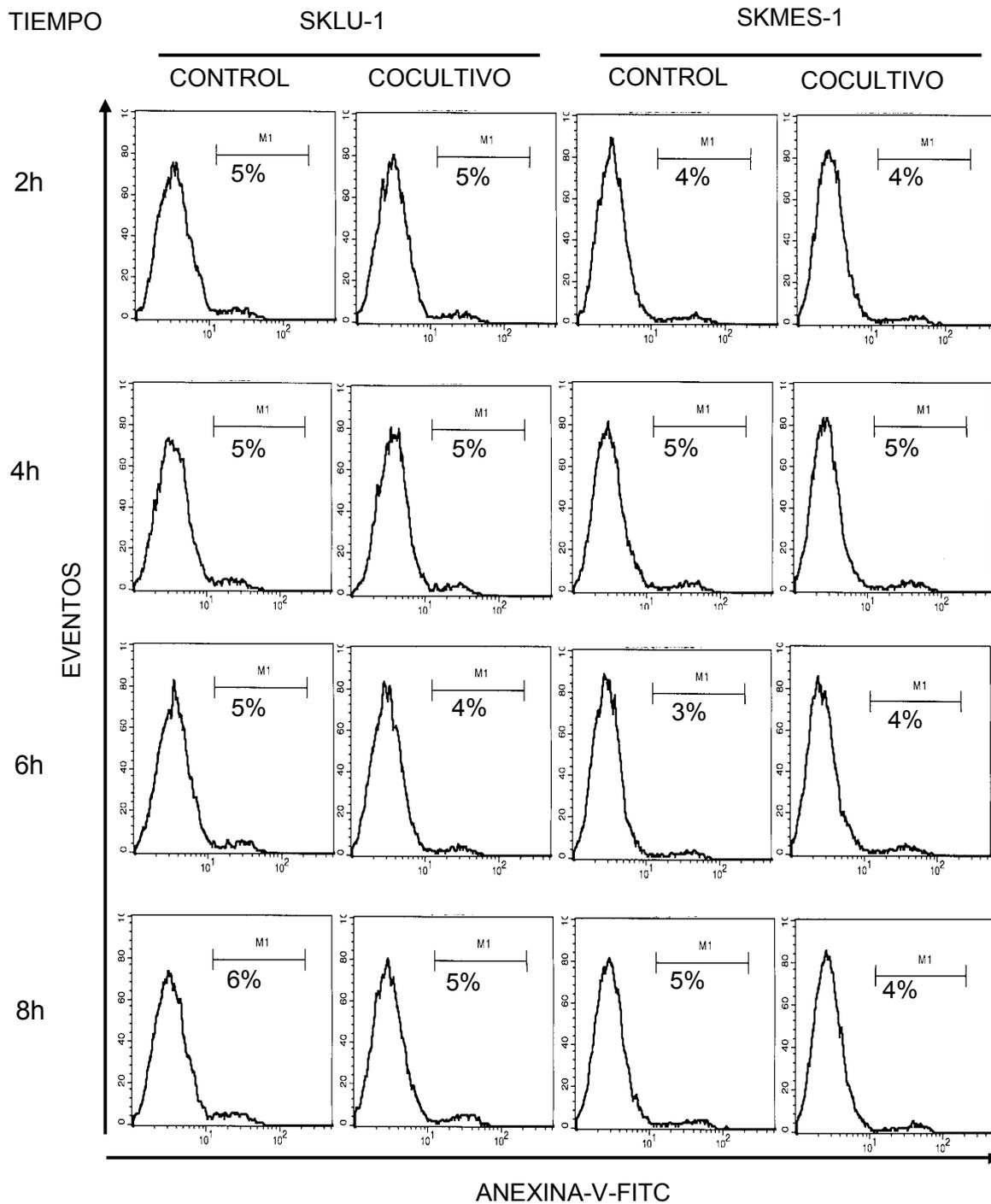


Figura 7. Las líneas de carcinoma pulmonar SKLU-1 y SKMES-1 no indujeron apoptosis en células Jurkat, a tiempos cortos de incubación.

VI. DISCUSIÓN

Alteración en la proliferación de linfocitos T

Los linfocitos T son importantes en el desarrollo de la respuesta inmunológica en contra del tumor. Sin embargo, se ha observado que los linfocitos T infiltrantes de tumor (TIL) son ineficientes en la eliminación de las células tumorales *in vivo* debido a la progresión del tumor. Diversos estudios han determinado que los TIL presentan alteraciones en su funcionalidad, atribuidas a efectos ejercidos por el microambiente tumoral^{35,37,48}.

Dado que se ha reportado que las células tumorales de diversos orígenes pueden alterar la proliferación de los linfocitos T^{2,37} y que en algunos casos inducen apoptosis en dichas células^{7,8,11,45}, el presente trabajo se enfocó en determinar las alteraciones en el ciclo celular y la posible inducción de apoptosis en células Jurkat cocultivadas con líneas celulares de carcinoma pulmonar.

Se decidió emplear a las células Jurkat como modelo de linfocito T puesto que se trata de una población homogénea, y no está sujeta a variabilidad, factor que se presentaría si se emplearan linfocitos T provenientes de donadores sanos. Además, se cuenta con experiencia previa de otros autores que apoya el uso de las células Jurkat para evaluar la inducción de apoptosis por células tumorales de distintos orígenes^{7,29,30,45}.

En el presente trabajo se observó un efecto inhibitorio en la proliferación de las células Jurkat cocultivadas con cada una de las seis líneas celulares de carcinoma pulmonar comparadas con las células Jurkat control. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Yoshino y cols⁴⁸. Dichos autores observan un efecto similar al nuestro, empleando PBMC provenientes de donadores sanos estimuladas con anti-CD3 y cultivadas en presencia del sobrenadante obtenido del cultivo de líneas celulares de carcinoma pulmonar⁴⁸. También se ha reportado en carcinoma renal una incapacidad de respuesta a la proliferación en TILs estimulados con anti-CD3, al compararlos con los linfocitos de sangre periférica autólogas².

Dado lo anterior, evaluamos si el efecto en la proliferación de las células Jurkat podía verse reflejado en alguna de las fases del ciclo celular o si estaba asociado

a la inducción de apoptosis, evaluada por la presencia del pico subG₀ y marcaje con anexina-V.

Alteración en el ciclo celular en las células T

Los resultados obtenidos reflejaron que las líneas celulares A-427, AJG-1, Calu-1 y SKMES-1 alteraron el ciclo celular de las células Jurkat. El efecto inhibitorio se vio reflejado en el incremento en el porcentaje de células en alguna de las fases del ciclo celular de las células Jurkat. Mientras que las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar A-427 y AJG-1 indujeron el aumento de células en la fase G₂/M a las 24h de incubación, las líneas celulares de carcinoma epidermoide, Calu-1 y SKMES-1, incrementaron el porcentaje de células Jurkat en la fase G₀/G₁.

Por otro lado, a las 48h de incubación se observó una marcada reducción de células Jurkat en la fase de G₂/M cocultivadas con las líneas A-427, AJG-1 y SKMES-1, observándose un incremento en las fases G₀/G₁ y S. Se requieren de estudios para comprobar que las alteraciones observadas en el ciclo celular de las células Jurkat también se reflejan en linfocitos T provenientes de sujetos sanos.

Las alteraciones observadas en el ciclo celular de las células Jurkat cocultivadas con las células tumorales pueden deberse a factores inmunosupresores liberados por las células tumorales (TGF- β , IL-10, gangliósidos, expresión de indolamina 2,3-dioxigenasa, etc.)^{20,26,44}. Además, en un estudio realizado por López González y cols.¹⁹, reportan que las líneas celulares de carcinoma pulmonar SKLU-1, Calu-1 y SKMES-1 son capaces de producir las isoformas del TGF- β , TGF- β I y TGF- β II, y que A-427 produce únicamente la isoforma TGF- β I.

En este sentido, se ha reportado que el TGF- β inhibe la proliferación de células T^{19,20}. Sin embargo, es importante considerar que las células tumorales pueden sintetizar y liberar más de un factor inmunosupresor, la combinación de éstos causa alteración en la proliferación de los linfocitos T la cual puede verse reflejada en cualquiera de las fases del ciclo celular. Por lo que es necesario continuar el

estudio sobre qué factores están siendo liberados por las células tumorales y su posible combinación.

Detección de apoptosis por pico subG₀ y marcaje con anexina-V-FITC

Diversos autores han reportado que las células tumorales de diversos orígenes, expresan FasL como un mecanismo de evasión ante la respuesta inmunológica causando la muerte de los linfocitos que infiltran al tumor^{8,30,45}. Con base en estos antecedentes decidimos evaluar la inducción de apoptosis de líneas de carcinoma pulmonar sobre células Jurkat.

Contrario con lo reportado por otros autores, en el presente estudio observamos que las seis líneas de carcinoma pulmonar estudiadas no indujeron apoptosis sobre las células Jurkat bajo ninguna de las diferentes metodologías empleadas (tinción con azul tripano, presencia del pico subG₀ y marcaje con anexina-V); además, la viabilidad de las células Jurkat fue de alrededor del 90%. Al respecto Niehans y cols.²⁹ evaluaron la inducción de apoptosis de líneas celulares de carcinoma pulmonar sobre células Jurkat mediante cocultivos, observando una marcada disminución en la viabilidad de las células Jurkat detectada mediante la tinción con azul tripano.

Durante los cocultivos, las células tumorales presentan características de adhesión y las células blanco (Jurkat) se encuentran en suspensión, por lo que una agitación mecánica suave permite recolectar a las células blanco. En este proceso, algunas células tumorales por lo general células muertas llegan a desprenderse durante dicha agitación. Estas células muertas no pueden ser distinguidas de las células Jurkat y pueden alterar el resultado final. Lo anterior probablemente ocurrió con los ensayos de Niehans y cols.

Con base en estas observaciones, en el presente trabajo se decidió realizar un marcaje previo de las células tumorales con el fluorocromo PKH-26 a fin de descartarlas y limitar la evaluación de la apoptosis exclusivamente a las células Jurkat.

Empleando esta metodología no se observó un efecto apoptótico en las células Jurkat causado por las líneas celulares de carcinoma pulmonar; por lo que nuestros resultados no apoyan la hipótesis del contraataque tumoral. Nuestro grupo de investigación ha determinado que las líneas de carcinoma pulmonar empleadas en el presente trabajo no expresan FasL membranal. Diversos grupos han reexaminado la hipótesis del contraataque en diferentes tumores, de igual forma no han encontrado inducción de apoptosis en linfocitos T *in vitro*^{5,38}. Sin embargo, las células tumorales pudieran inducir muerte *in vivo* empleando otros mecanismos, como es la muerte celular inducida por activación (AICD). Dicho fenómeno se presenta cuando existe una estimulación reiterada del linfocito T por la célula tumoral, lo cual conduce a que el linfocito exprese FasL así como su receptor Fas, como consecuencia se induce la apoptosis entre las mismas células T (fratricidio)^{13,38}.

Por otra parte, en nuestros resultados se observó que las células de carcinoma pulmonar indujeron una disminución de las células Jurkat apoptóticas. Se ha reportado que la célula tumoral puede endocitar células apoptóticas como mecanismo para obtener nutrientes²¹. Con base en este antecedente, nosotros inferimos que la disminución observada en el porcentaje de las células apoptóticas en los cocultivos se debe a una posible endocitosis por parte de las células tumorales. Se requieren de estudios para demostrar si dicho fenómeno ocurre.

VII. CONCLUSIONES

Las seis líneas de carcinoma pulmonar empleadas indujeron en las células Jurkat inhibición de su proliferación celular. En cuatro de las seis líneas empleadas el efecto antiproliferativo se vio reflejado por un incremento en el porcentaje de células en alguna de las fases del ciclo celular, el cual dependió del tipo de línea celular en cuestión así como también del período de incubación empleado. Este fenómeno pudiera evitar la inducción de una respuesta antitumoral eficiente en los pacientes con cáncer pulmonar, además de ser responsable de la linfopenia observada en los pacientes con cáncer. Por otra parte, las células de carcinoma pulmonar no indujeron apoptosis sobre las células Jurkat, por lo que nuestros resultados no apoyan la hipótesis del contraataque tumoral.

El conocimiento de los complejos mecanismos inmunosupresivos desarrollados por las células tumorales conducirá a la elaboración de nuevas y mejores estrategias terapéuticas en beneficio del paciente con cáncer.

VIII. REFERENCIAS

1. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. The cell-division cycle. In: Robertson M. and Adams R, eds. *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Publishing; 1994. pp. 863-910.
2. Alexander JP, Kudoh S, Melsop KA, Hamilton TA, Edinger MG, Tubbs RR, Sica D, Tuason L, Klein E, Bukowski RM, Finke JH. T-cells infiltrating renal cell carcinoma display a poor proliferative response even though they can produce interleukin 2 and express interleukin 2 receptors. *Cancer Res.* 1993; **53**: 1380-1387.
3. Bennett MW, O'Connell J, O'Sullivan GC, Roche D, Brady C, Kelly J, Collins JK, Shanahan F. Expression of Fas ligand by human gastric adenocarcinomas: a potential mechanism of immune escape in stomach cancer. *Gut* 1999; **44**: 156-162.
4. Cohen JJ. Apoptosis: mechanisms of life and death in the immune system. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999; **103**: 548-554.
5. Favre-Felix N, Fromentin A, Hammann A, Solary E, Martin F, Bonnotte B. Cutting edge: the tumor counterattack hypothesis revisited: colon cancer cells do not induce T cells apoptosis via the Fas (CD95, APO-1) pathway. *J. Immunol.* 2000; **164**: 5023-5027.
6. Ferraro-Peyret C, Quemeneur L, Flacher M, Revillard JP, Genestier L. Caspase-independent phosphatidylserine exposure during apoptosis of primary T lymphocytes. *J. Immunol.* 2002; **169**: 4805-4810.

7. Gastman BR, Atarashi Y, Reichert TE, Saito T, Balkir L, Rabinowich H, Whiteside TL. Fas ligand is expressed on human squamous cell carcinomas of the head and neck, and it promotes apoptosis of T lymphocytes. *Cancer Res.* 1999; **59**: 5356-5364.
8. Gastman BR, Johnson DE, Whiteside TL, Rabinowich H. Tumor-induced apoptosis of T lymphocytes: elucidation of intracellular apoptotic events. *Blood* 2000; **95**: 2015-2023.
9. Gupta S, Su H, Bi R, Agrawal S, Gollapudi S. Life and death of lymphocytes: a role in immunosenescence. *Immun. Ageing* 2005; **2**: 12-27.
10. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; **100**: 57-70.
11. Igney FH, Kramer PH. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J. Leukoc. Biol* 2002; **71**: 907-920.
12. Kern JA, McLennan G: Genetic and molecular changes of human lung cancer. In Fishman AP eds; *Fishman's pulmonary disease and disorders*, Vol. 2 New York McGraw-Hill 1988 pp 1695-1704.
13. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nature Immunol.* 2002; **3**: 999-1005.
14. Krant JK, Manskopf E, Bandrup C, Madoff MA. Immunologic alterations in bronchogenic cancer. *Cancer* 1968; **21**: 623-631.
15. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF- β . *Annu. Rev. Immunol.* 1998; **16**:137-161.

16. Lewin B. Oncogenes and cancer. In: Oxford University Press Inc., New York. Genes VII Oxford University Press and Cell Press, 2000. p. 875-906.
17. Lodish H, Berk A, Zipurski LS, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Cancer. In: Tenney S, Ahr K, Steyn R. eds. Molecular cell biology. W.H. Freeman and Company New York. 1999. pp. 1054-1080.
18. Long EO. Tumor cell recognition by natural killer cells. Semin. Cancer Biol. 2002; **12**: 57-61.
19. López-González JS, Aguilar-Cázares D, Prado-García H, Nieto-Rodríguez A, Mandoki JJ, Ávila-Moreno F, Rivera RM, Chavarría-Garcés J. Lack of correlation between growth inhibition by TGF- β and the percentage of cells expressing type II TGF- β receptor in human non-small cell lung carcinoma cell lines. Lung Cancer 2002; **38**: 149-158.
20. Lucas PJ, McNeil N, Hilgenfeld E, Choudhury B, Kim SJ, Eckhaus MA, Ried T, Gress RE. Transforming growth factor- β pathway serves as a primary tumor suppressor in CD8⁺ T cell tumorigenesis. Cancer Res. 2004; **64**: 6524-6529.
21. Lugini L, Lozupone F, Matarrese P, Funaro C, Luciani F, Malorni W, Rivoltini L, Castelli C, Tinari A, Piris A, Parmiani G, Fais S. Potent phagocytic activity discriminates metastatic and primary human malignant melanomas: a key role on ezrin. Lab. Invest. 2003; **83**: 1555-1567.
22. Macdonald F, Ford CHJ, Casson AG. Oncogenes. In: Giorga Bushell and Harriet Milles eds. Molecular biology of cancer. BIOS Scientific Publishers 2nd 2004. pp 24-26.

23. Maeurer MJ, Gollin SM, Martin D, Swaney W, Bryant J, Castelli C, Robbins P, Parmiani G, Storkus WJ, Lotze M. Tumor escape from immune recognition. Lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein tap-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen. *J. Clin. Invest.* 1996; **98**: 1633-1641.
24. Mahoney JA, Rosen A. Apoptosis and autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* 2005; **17**: 583-588.
25. Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: A critical decision in cancer. *Nature Rev. Cancer* 2001; **1**: 222-229.
26. Mckallip R, Li R, Ladisch S. Tumor gangliosides inhibit the tumor-specific immune response. *J. Immunol.* 1999; **163**: 3718-3726.
27. Medina-Morales F, Salazar-Flores M. Frecuencia y patrón cambiante del cáncer pulmonar en México. *Salud Pública Méx.* 2000; **42**: 333-336.
28. Minna JD, Roth JA, Gazdar AF. Focus on lung cancer. *Cancer Cell* 2002; **1**: 49-52.
29. Nihans GA, Brunner T, Frizelle SP, Liston JC, Salerno CT, Knapp DJ, Green DR, Kratzke RA. Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer Res.* 1997; **57**: 1007-1012.
30. O'Connell J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: Fas-mediated T cells killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J. Exp. Med.* 1996; **184**: 1075-1082.

31. Ohta T, Elnemr A, Kitagawa H, Kayahara M, Takamura H, Fujimura T, Nishimura GI, Shimizu K, Yi SQ, Miwa K. Fas ligand expression in human pancreatic cancer. *Oncology Rep.* 2004; **12**: 749-754.
32. Parslow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB. Linfocitos y tejidos linfoides. En Gil Holguín LF. eds. *Inmunología básica y clínica*. México, D.F. El manual moderno; 2001. pp 47-63.
33. Pines J. Cyclins and cyclin-dependent kinasa: a biochemical view. *Biochem. J.* 1995; **308**: 697-711.
34. Prado-García H, Aguilar-Cazares D, Flores-Vergara H, Mandoki JJ y López-González JS. Effector, memory and naïve CD8+ T cells in peripheral blood and pleural effusión from lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer* 2005: **47**; 361-371.
35. Rabinowich H, Banks M, Reichert TE, Logan TF, Kirkwood JM; Whiteside TL. Expression and activity of signaling molecules in T lymphocytes obtained from patients with metastatic melanoma before and after interleukin 2 therapy. *Clin. Cancer Res.* 1996; **2**: 1263-1274.
36. Radoja S, Frey AB. Cancer-induced defective cytotoxic T lymphocyte effector function: another mechanism how antigenic tumors escape immune-mediated killing. *Mol. Med.* 2000; **6**: 467-479.
37. Reichert TE, Strauss L, Wagner EM, Gooding W, Whiteside T. Signaling abnormalities, apoptosis, and reduced proliferation of circulating and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with oral carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2002; **8**: 3137-3145.

38. Restifo NP. Not so Fas: Re-evaluating the mechanisms of immune privilege and tumor escape. *Nature Med.* 2000; **6**: 493-495
39. Rossi D, Gaidano G. Messengers of cell death: apoptotic signalling in health and disease. *Haematologica* 2003; **88**: 212-218.
40. Seliger B, Cabrera T, Garrido F, Ferrone S. HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin. Cancer Biol.* 2002; **12**: 3-13.
41. Shu S, Plautz GE, Krauss JC, Chang AE. Tumor immunology. *JAMA* 1997; **278**: 1972-1980.
42. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nature Immunol.* 2001; **2**: 293-299.
43. Tyson JJ, Csikasz-Nagy A, Novak B. The dynamics of cell cycle regulation. *Bioessays* 2002; **24**: 1095-1109.
44. Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T. Evidence for a tumoral immune resistance mechanisms based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nature Med.* 2003; **9**: 1269-1274.
45. Uzzo RG, Rayman P, Kolenko V, Clark PE, Bloom T, Ward AM, Molto L, Tannenbaum C, Worford LJ, Bukowski R, Tubbs R, Hsi ED, Bander NH, Novick AC, Finke JH. Mechanisms of apoptosis in T cells from patients with renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 1999; **5**: 1219-1229.

46. Webb SJ, Harrison DJ, Wyllie AH. Apoptosis: an overview of the process and its relevance in disease. In Kaufman SH, ed: Apoptosis pharmacological implications and therapeutic opportunities. Advances in pharmacology. Academic press 1997 pp. 1-37.
47. Whiteside TL. Immune responses to malignancies. J. Allergy Clin. Immunol. 2003; **111**: S677-S686.
48. Yoshino I, Yano T, Murata M, Ishida T, Sugimachi K, Kimura G, Nomoto K. Tumor-reactive T-cells accumulate in lung cancer tissues but fail to respond due to tumor cell-derived factor. Cancer Res. 1992; **52**: 775-781.
49. http://www.biocarta.com/pathfiles/h_g1Pathway.asp
50. <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Deep/ras.html>
51. <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes/P53ID88.html>
52. <http://lib.cpums.edu.cn/jiepou/tupu/atlas/www.vh.org/adult/provider/radiology/LungTumors/PathologicTypes/Text/PathologicTypes.html>