



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Efecto del plasma y del líquido pleural de pacientes con
adenocarcinoma pulmonar en la expresión de
CD3zeta, CD3epsilon, CD28 y en la apoptosis
de linfocitos T Jurkat.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

Erika Jocelyn García Robles



MÉXICO, D.F.

2007



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Saturnino de León Chapa
Vocal	José Sullivan López González
Secretario	Heriberto Prado García
Primer Suplente	Ana Esther Aguilar Cárdenas
Segundo Suplente	Patricia Elvira Berrón Ruíz

Sitio donde se desarrolló el tema:

Este trabajo de Tesis se realizó en el laboratorio de Cáncer Pulmonar, Departamento de Enfermedades Crónico-Degenerativas del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, SS. México D. F.

Asesor del Tema:

Dr. Heriberto Prado García

Sustentante:

Erika Jocelyn García Robles

Dedicatoria

A mi familia:

A mi madre Hilda Robles Santamaría, porque cada día de mi vida haz dado todo en cuerpo y en alma, por tu amor incondicional, tus sacrificios, tu esfuerzo y tu constancia, este logro es de las dos y principalmente para ti, porque sin ti nada tendría sentido.

A mi padre Luis García García, no pasa un día sin que te recuerde y extrañe, por el cariño, las enseñanzas, tu trabajo, la comprensión, tus palabras y todo lo que me diste y no supe valorar a tiempo.

A Miriam, por ser como eres, por ser mi segunda madre, por tus cuidados, por tu apoyo, por tu compañía y todo el cariño que siempre me das cuando más lo necesito.

A las luces de mi vida: Raymundo y Danae

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por darme la oportunidad de estudiar en esta universidad que quiero y respeto, por todo lo que me dio académicamente y sobretodo por las lecciones de humanidad.

A mi demás familia. Todos me han apoyado a lo largo de toda mi vida, se los agradezco especialmente a mis abuelos que cada día me demuestran su cariño y a mis tías Estela, Eva e Irene por su apoyo económico y moral.

A mis primos que son como mis amigos: Vladimir, Valheria, Talia y Juan C., los quiero y espero que podamos seguir compartiendo nuestras vidas.

A Flavio, Verónica y Javier, mis muy queridos amigos que me han acompañado en los buenos y malos momentos, por su amistad, cariño, tiempo, apoyo y confianza; agradezco a la vida por ponerlos en mi camino y ha ustedes por decidir permanecer en él.

A Eder por apoyarme en todos los sentidos y estar a mi lado al final de este camino, por ser un ejemplo de superación constante, por tu bondad, sencillez, honestidad y cariño.

A los maestros que me motivaron a lo largo de la carrera al transmitirme parte de sus conocimientos pero sobretodo por su calidad humana: Dr. Homero Montes, Dr. José Sulivan López González y al M en C. Santiago Ávila Ríos.

Al Dr. Heriberto Prado García por su tiempo, enseñanzas y comprensión.

Además quiero agradecer a los compañeros del laboratorio de Cáncer Pulmonar, en especial a Manuel, Armando, Argelia. Federico y Dolores por su apoyo en la parte experimental y su afecto.

Para vivir verdaderamente es necesario renacer. Para renacer es imprescindible morir. Y para morir es imprescindible despertar.

Gurdjieff

*Todo depende de la luz,
de la manera de iluminar las cosas...
Todo depende de la forma,
de los contornos,
de las interpolaciones y
de las dudas.
Todo también depende
de que el tiempo nos marque,
de que los espacios nos den los titulares.
El verdadero problema es elegir entre
perseguir las sombras
o resignarse a ser el perseguido.
Un extraño "To be or not to be"
en este casi ser
en este casi no ser.
Salir desde las sombras
o hacer las sombras perdurables.
Y en la última etapa del abismo
después de liberar a los otros,
a todos los que son los otros,
recordar,
sin urgencias,
que uno es el preso.
Y a partir de allí...
liberarse.*

Hamlet L. Quintana

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
Generalidades del cáncer	1
Cáncer pulmonar	2
Clasificación del cáncer pulmonar	3
Respuesta inmune antitumoral	5
Inmunoedición del cáncer.....	7
Generalidades de la activación del linfocito T.....	9
Estructura del complejo TCR/CD3	10
Señalización y activación mediada por el complejo TCR/CD3	12
Coestimulación del linfocito T mediada por CD28	13
Apoptosis.....	14
ANTECEDENTES	17
Mecanismos de evasión de las células tumorales en contra de la respuesta inmune.....	17
Escape e insensibilidad a la respuesta inmune antitumoral.....	18
Modulación y supresión de la respuesta inmune antitumoral	18
Contraataque tumoral.....	19
Apoptosis de linfocitos T en pacientes con cáncer.....	20
Disminución en la expresión de CD3 ζ de linfocitos T en cáncer y otras patologías	21
Factores responsables de la reducción de la expresión de la molécula CD3 ζ en linfocitos T	21
Reducción de la expresión de CD3 ϵ y de la molécula CD28 en linfocitos T.....	23
Factores solubles y células inmunes presentes en el líquido pleural y plasma de pacientes con cáncer pulmonar	24
JUSTIFICACIÓN	26
HIPÓTESIS	27
OBJETIVO GENERAL	27
Objetivos particulares	27

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
Línea celular	29
Muestras biológicas	29
Detección de apoptosis por el marcaje con Anexina V-FITC.....	30
Inmunotinción de CD3 ζ , CD3 ϵ y CD28 en linfocitos T Jurkat	31
Extracción de RNA total	32
Retrotranscripción (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de CD3 ζ y β -actina.....	32
RESULTADOS.....	34
Detección de apoptosis en los linfocitos T Jurkat cultivados con plasma o con líquido pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar	34
Expresión de CD3 ζ en los linfocitos T Jurkat tratados con el plasma o el líquido pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar	36
Expresión de CD3 ϵ en los linfocitos T Jurkat tratados con el plasma o el líquido pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar	39
Expresión de CD28 en los linfocitos T Jurkat tratados con el plasma o el líquido pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar	40
Semicuantificación del mRNA de CD3 ζ	41
DISCUSIÓN	43
Evaluación de la apoptosis en los linfocitos T Jurkat cultivados con el plasma y el líquido pleural de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar.	43
Efecto del plasma y del líquido pleural de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar en la expresión de CD3 ζ , CD3 ϵ y CD28 en los linfocitos T Jurkat.....	45
Posibles mecanismos responsables de la reducción de la expresión de CD3 ζ en los linfocitos T Jurkat.....	45
CONCLUSIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	51

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Fig 1. Patogénesis del cáncer pulmonar en el humano	3
Fig 2. Componentes del sistema inmune innato y adaptativo	5
Fig 3. Respuesta inmune antitumoral	7
Fig 4. Relación Tumor y Sistema Inmune	8
Fig 5. Inmunoedición del cáncer	9
Fig 6. Estructura del complejo TCR/CD3 del linfocito T.....	10
Fig 7. Expresión y degradación del complejo TCR/CD3	11
Fig 8. Señalización en la activación del linfocito T.....	12
Fig 9. Coestimulación y actividad del linfocito T.....	14
Fig 10. Apoptosis y necrosis.....	16
Fig 11. Mecanismos de evasión tumoral contra el sistema inmune	17
Fig 12. Evaluación de la apoptosis en linfocitos T Jurkat tratados con las muestras biológicas.....	34
Fig 13. Cinética de la evaluación de la apoptosis en linfocitos T Jurkat cultivados con el líquido pleural de un paciente con adenocarcinoma pulmonar.	35
Fig 14. Inducción de muerte celular en los linfocitos T Jurkat con el líquido pleural de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar.....	36
Fig 15. Determinación de la Δ MFI de las moléculas CD3 ζ , CD3 ϵ y CD28 en los linfocitos T Jurkat tratados con FasLrh	37
Fig 16. Disminución de la expresión de CD3 ζ en los linfocitos T Jurkat cultivados por 96h con plasma y líquido pleural.....	37
Fig 17. Análisis de la expresión de CD3 ζ -PE de las muestras biológicas con su respectivo control.	38
Fig 18. Análisis de la expresión de CD3 ϵ -FITC.....	39
Fig 19. Análisis de la expresión de CD28-CyChrome	40
Fig 20. Ejemplo de la semicuantificación del mRNA de CD3 ζ	41
Fig 21. Semicuantificación del mRNA de CD3 ζ en los linfocitos T Jurkat cultivados con el plasma y líquido pleural de los pacientes con adenocarcinoma	42
Fig 22. Posibles factores involucrados en la disminución de la expresión de CD3 ζ en los linfocitos T Jurkat tratados con el líquido pleural o el plasma de pacientes con adenocarcinoma pulmonar.....	49
Tabla 1. Mecanismos de evasión tumoral hacia la respuesta inmune del hospedero	20

ABREVIATURAS

APCs	Células presentadoras de antígeno profesionales
CD3δ	Subunidad delta del complejo CD3
CD3ζ	Subunidad zeta del complejo CD3
CD3γ	Subunidad gamma del complejo CD3
CD3ϵ	Subunidad epsilon del complejo CD3
CD4	Linfocito T CD4 o cooperador
CD8	Linfocito T CD8 o citotóxico
DC	Célula dendrítica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
FasL	Fas ligando
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
IDO	Indolamino 2,3-dioxigenasa
IL	Interleucina
INF-γ	Interferón gamma
mAb	Anticuerpo monoclonal
MFI	Intensidad media de fluorescencia
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MSCs	Células mieloides supresoras
NK	Célula asesina natural
NKT	Célula T asesina natural
NOS₂	Óxido nítrico sintetasa inducible
NSCLC	Carcinoma pulmonar de células no pequeñas
PBL	Linfocitos de sangre periférica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PI	Ioduro de propidio
PS	Fosfatidilserina
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT	Retrotranscripción
SCLC	Carcinoma pulmonar de células pequeñas
TA	Temperatura ambiente
TAL	Linfocitos T asociados al tumor
TCR	Receptor de la célula T
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TIL	Linfocitos T infiltrantes al tumor
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Linfocitos T reguladores
T$\gamma\delta$	Célula T gamma-delta
ΔMFI	Delta de intensidad media de fluorescencia

INTRODUCCIÓN

Generalidades del cáncer

En el humano, la vida y la muerte celular establecen un balance dinámico entre la promoción de la proliferación y las señales que restringen a ésta, por lo tanto, la división celular se realiza sólo cuando se requiere. Si este proceso se torna incontrolable por la adquisición de mutaciones en el material genético, las células se transforman en células neoplásicas que continúan proliferando y viviendo por más tiempo al evitar la muerte celular programada (apoptosis), induciendo un proceso patológico que progresa hasta el desarrollo del cáncer.⁽¹⁾

El cáncer se define como un grupo de enfermedades caracterizadas por alteraciones genéticas y epigenéticas, que provocan defectos en el control de la proliferación normal celular y en la apoptosis. El cáncer al escapar de los mecanismos regulatorios del organismo altera la homeostasis del hospedero provocando su muerte. ^(1,2)

Gran número de alteraciones genéticas se han asociado al desarrollo de los más de cien tipos de cáncer que afectan al humano, las mutaciones que lo provocan se presentan en tres tipos de genes: los proto-oncogenes, los genes supresores de tumores y los genes estabilizadores del DNA. ⁽³⁾ Dichas mutaciones se traducen en alteraciones fisiológicas en la célula neoplásica. En general, existen seis alteraciones fisiológicas que inducen en la célula un crecimiento maligno, y éstas son: autonomía a las señales mitógenas, insensibilidad a las señales anti-mitógenas, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogenesis sostenida y por último la invasión a otros tejidos o metástasis. ⁽⁴⁾

Sin embargo, las células no mutan y proliferan descontroladamente sin ninguna resistencia del organismo, ya que existen mecanismos celulares intrínsecos que detectan y reparan los daños genéticos, o inducen apoptosis en las células con potencial maligno. Si los mecanismos de regulación intrínsecos fallan, la respuesta inmune es capaz de reconocer y destruir a las células cancerosas (mecanismo extrínseco), al mantener un sistema permanente de reconocimiento y destrucción de células cancerosas; esta regulación por parte del sistema inmune tiene que ser sobrepasada para que se desarrolle cáncer en el hospedero. ^(5,6)

Cáncer pulmonar

El cáncer pulmonar es el cáncer con mayor incidencia, mortalidad y prevalencia en el mundo (12.3% de todos los cánceres). La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que para el año 2030 habrá en el mundo diez millones de fallecimientos por enfermedades relacionadas con el tabaco incluyendo el cáncer pulmonar, la incidencia mundial es de 38 casos por 100 000 en hombres y 11 por 100 000 mujeres. ⁽⁹⁾ Hay diferencias en la incidencia debidas a la geografía, raza y género pero la incidencia se ha incrementado en las mujeres. ^(7,8)

En México, la mortalidad por cáncer pulmonar representa del 10% al 20% de todas las muertes reportadas por cáncer. En el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias es la principal causa de mortalidad y se ha encontrado una alta frecuencia de adenocarcinoma pulmonar en pacientes entre 61 y 70 años. ⁽⁹⁾

La principal causa del desarrollo del cáncer pulmonar es la exposición a los carcinogénicos del humo del cigarro, que causan cáncer pulmonar en el 11% de los fumadores. El humo del tabaco contiene más de cincuenta agentes carcinógenos para el pulmón, especialmente hidrocarburos policíclicos aromáticos y la nitrosamina específica del tabaco 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-1 butanona (NNK). La susceptibilidad al cáncer aumenta por el polimorfismo que reduce la actividad de la familia de la glutatión-S-transferasa, que inactiva a estos carcinógenos, o que incrementa la actividad de la familia del citocromo P450, la cual los activa. La exposición al asbesto, arsénico, cromo, níquel, clorometil éter y radón, también provocan el desarrollo de cáncer pulmonar.

Los agentes carcinogénicos pueden unirse al DNA y formar aductos que generan mutaciones, especialmente transversiones guanina-timina (G-T) que de no ser reparadas persisten o llevan a la apoptosis. ⁽⁷⁾ Las principales mutaciones implicadas en la patogénesis del cáncer pulmonar producen alteraciones en los genes *c-myc*, *K-ras*, y en la sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidermoide (EGFR), de la ciclina D1 y de BCL2; así como mutaciones en genes supresores de tumores como *tp53*, *Rb* y *p16*. Dentro de los cambios epigenéticos se encuentra la inactivación de genes por hipermetilación (por ejemplo en el gen *apc*). ⁽⁷⁾ Ver Fig 1.

El riesgo de desarrollar cáncer pulmonar se reduce después de un periodo de abstinencia del hábito tabaquico de aproximadamente siete años, pero el daño previo es irreversible. ⁽⁷⁾

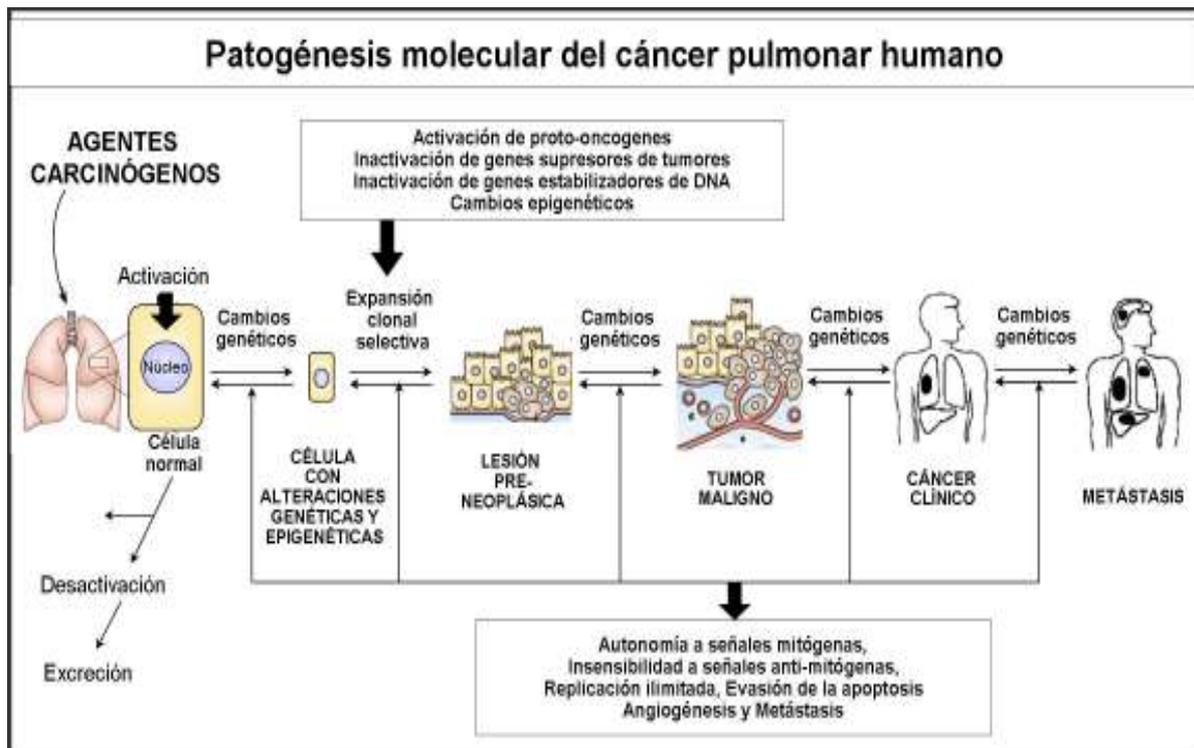
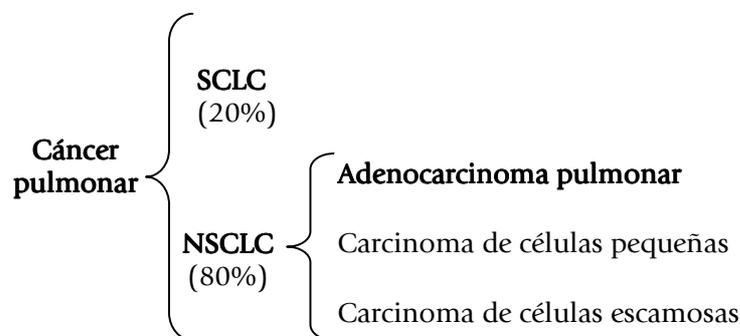


Fig 1. Patogénesis del cáncer pulmonar en el humano. Las mutaciones en las células son causadas por agentes químicos que se encuentran principalmente en el humo del tabaco. Si dichas mutaciones no son reparadas por los mecanismos intrínsecos celulares, se acumulan causando alteraciones fisiológicas, que progresan hasta el desarrollo de cáncer pulmonar. (Modificada de 10)

Clasificación del cáncer pulmonar

El cáncer pulmonar primario se clasifica en dos tipos principales: el carcinoma pulmonar de células no pequeñas (non-small cell lung cancer, **NSCLC**) que representa el 80% de los casos y el carcinoma pulmonar de células pequeñas (small cell lung cancer, **SCLC**) el cual se presenta en el 20% de los pacientes. ⁽⁸⁾ A continuación se presenta en general la clasificación histológica del cáncer pulmonar:



INTRODUCCIÓN

El principal subtipo histológico que presenta la población mexicana es el adenocarcinoma pulmonar (representa el 70% de todos los casos de cáncer pulmonar), el cual provoca una manifestación clínica (en los estadios tardíos del cáncer) denominada derrame pleural. ⁽⁹⁾ Éste se produce por la acumulación de líquido en el espacio pleural, debido a la obstrucción de los ganglios linfáticos por la presencia del tumor. En el derrame pleural se encuentran tanto células del sistema inmune como células cancerosas y los factores solubles liberados por ambos tipos de células. ^(11,12)

En la mayoría de los casos de cáncer pulmonar el diagnóstico se realiza al aparecer los síntomas relacionados con el tumor primario, metástasis o síndrome paraneoplásico. ⁽⁷⁾ La progresión del cáncer pulmonar se divide en los siguientes estadios:

Carcinoma oculto, Estadio 0 (Carcinoma *in situ*), Estadio I (tumor de tamaño variado con invasión limitada), Estadio II (el tumor afecta a la pleura y diafragma), Estadio IIIa (hay metástasis en ganglios linfáticos y derrame pleural), Estadio IIIb (hay infiltración al corazón, vasos sanguíneos grandes, tráquea, esófago, cuerpos vertebrales y derrame pleural), y por último el Estadio IV (hay metástasis a órganos distantes). ⁽¹³⁾

A pesar de contar con tratamiento de quimioterapia y radioterapia, más del 90% de los pacientes con cáncer pulmonar mueren en un periodo menor a cinco años, ⁽⁷⁾ por lo cual es necesario buscar otras estrategias terapéuticas como la inmunoterapia.

Respuesta inmune antitumoral

El sistema inmune está compuesto por una variedad de células y factores solubles, los cuales interactúan de forma compleja y dinámica para proteger al organismo de patógenos exógenos y de células neoplásicas. El sistema inmune se divide en dos: el innato y el adaptativo. ⁽¹⁴⁾ El sistema innato se compone de granulocitos, células dendríticas (DCs), macrófagos, células cebadas, células NK, células NKT, linfocitos $T\gamma\delta$ y el complemento. El sistema adaptativo está compuesto por linfocitos B y linfocitos T, éstos últimos se dividen en dos poblaciones: CD4 o cooperadores, y los linfocitos T CD8 o citotóxicos, ⁽¹⁵⁾ ver Fig 2.

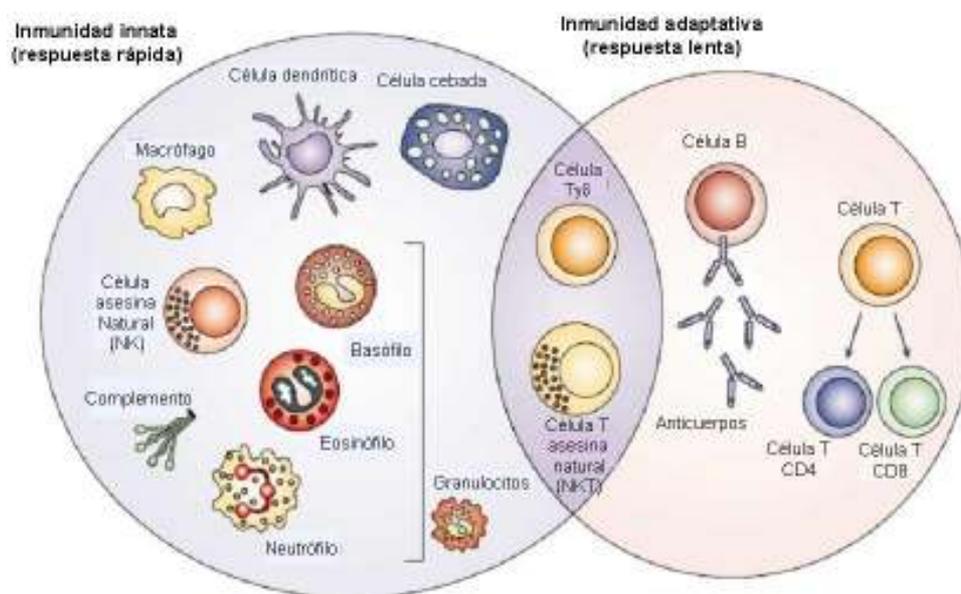


Fig 2. Componentes del sistema inmune innato y adaptativo. (Modificado de 15)

Si bien en la respuesta inmune antitumoral participan un gran número de células inmunes, interacciones célula-célula, mediadores solubles y a nivel molecular diversas vías de señalización; el describirlas va más allá de los fines de este trabajo, por lo cual a continuación, se describe brevemente el desarrollo de la respuesta inmune en el control del desarrollo del cáncer. Ver Fig 3
 Para tratar de explicar el inicio de la respuesta inmune antitumoral se han planteado dos modelos.
 1) El primer modelo implica el reconocimiento directo de las células tumorales por células del sistema innato. Las células de la inmunidad innata utilizan receptores que reconocen moléculas expresadas en la superficie de las células tumorales. En este contexto las células neoplásicas expresan los ligandos MICA y MICB de los receptores NKG2D expresados en las células NK, en linfocitos T citotóxicos y en células fagocíticas. Las células NK también monitorean la pérdida de

moléculas clase I del MHC en la superficie de las células tumorales. El segundo modelo involucra la producción de señales de alarma o señales proinflamatorias, como citocinas y otros factores solubles, que son liberados por el daño del tejido debido al crecimiento del tumor. La respuesta inflamatoria provoca el flujo de células del sistema inmune innato al sitio del tumor y el consecuente reconocimiento de las células neoplásicas. Ambos modelos explican el inicio de la respuesta inmune antitumoral. ⁽¹⁶⁾ **2)** Las células NK, NKT y T $\gamma\delta$ del sistema innato secretan localmente IFN- γ que produce la muerte a un número limitado de células neoplásicas por mecanismos antiproliferativos, proapoptóticos y angiostáticos. **3)** La célula NK induce muerte celular a la célula cancerosa por medio de la vía del receptor de muerte y por la vía de granzimas-perforina, produciéndose cuerpos apoptóticos. **4)** Los cuerpos apoptóticos son fagocitados, por macrófagos o por células dendríticas, ambas son células presentadoras de antígenos profesionales (APCs) y son reclutadas por las citocinas proinflamatorias presentes en el ambiente tumoral. **5)** Las APCs procesan y presentan los antígenos tumorales (neoantígenos que son proteínas anormales), asociados a moléculas clase II del MHC. Además secretan citocinas que modulan la respuesta inmune. **6)** Se presenta el antígeno a las células T inmaduras; que se activan a linfocitos T CD4 Th1 antígeno-específico las cuales secretan citocinas (especialmente IL-2) y promueven la respuesta inmune celular. **7)** La activación de estos linfocitos T CD4 facilita la inducción y diferenciación de linfocitos T CD8 antígeno-específico de: célula naïve a célula efectora. **8)** El linfocito T CD8 efector o citotóxico (CTL) reconoce a la célula tumoral por medio del complejo péptido-molécula clase I del MHC y de manera similar a la NK, induce muerte a la célula tumoral. De este modo el hospedero desarrolla una respuesta inmune en contra del tumor, primero de forma inespecífica como parte de la respuesta inmune innata, a este proceso se le denomina inmunovigilancia del cáncer. Como consecuencia de la respuesta inmune innata se activa una respuesta inmune específica (adaptativa). En conjunto ambas respuestas destruyen a las células neoplásicas, evitando así el desarrollo de cáncer. ^(5,6,16)

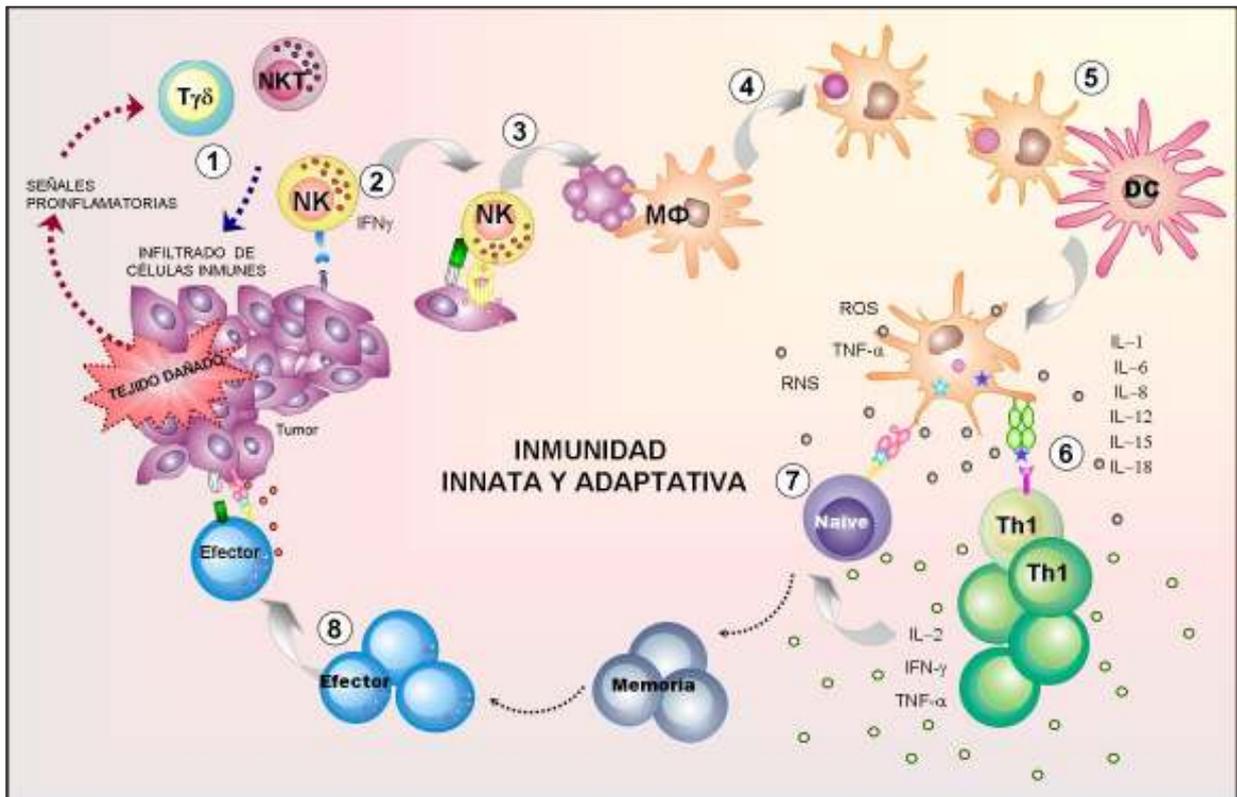


Fig 3. Respuesta inmune antitumoral. Ver texto para descripción

Inmunoedición del cáncer

Durante la progresión del cáncer en el hospedero, se establece una relación tumor-sistema inmune que implica un proceso denominado inmunoedición del cáncer, el cual comprende tres etapas; la eliminación, el equilibrio y el escape. ⁽¹⁶⁾ Ver Fig 4.

El reconocimiento y eliminación (o inmunovigilancia), que se describió en la Respuesta inmune antitumoral, es un proceso continuo que debe repetirse cada vez que surgen células neoplásicas con distinta antigenicidad. ⁽⁶⁾

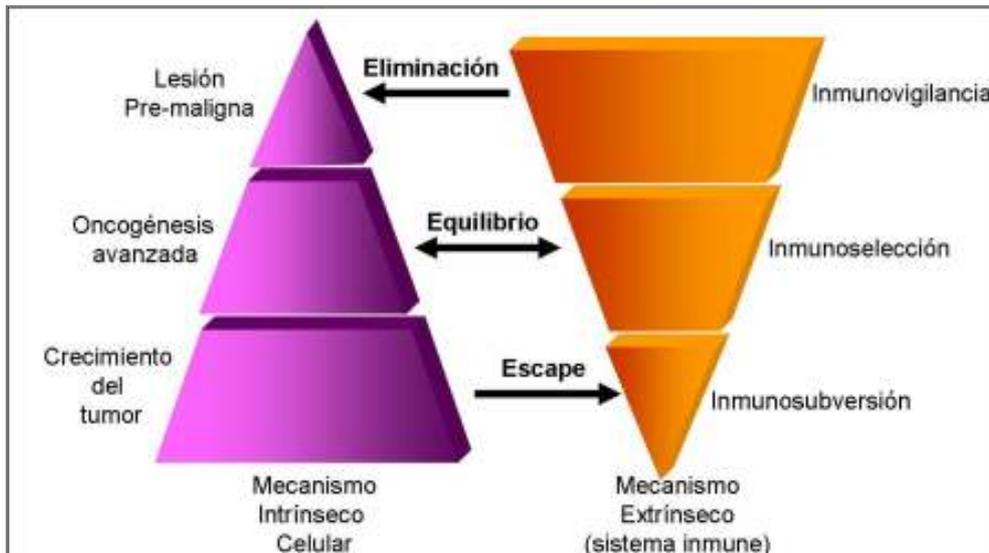


Fig 4. Relación Tumor y Sistema Inmune. Mediante la inmunovigilancia se elimina la lesión pre-maligna, al avanzar la oncogénesis se establece un equilibrio entre las células cancerosas que son destruidas y las nuevas variantes que surgen; esto hace que el tumor sea heterogéneo y desarrolle mecanismos de evasión hacia la respuesta inmune (inmunoselección) escapando de ésta e incluso provocando la disfunción de la misma (inmunosubversión) ^{Modificada de 16}

La segunda etapa, el equilibrio, es la más larga y se prolonga por años en el hospedero. Se debe a la formación de un equilibrio dinámico entre las células tumorales que sobrevivieron a la fase de eliminación y las células del sistema inmune. Éste se establece debido a que las células cancerosas continúan proliferando, acumulando mutaciones e incrementando la inestabilidad genética. Éstas células se exponen de manera continua a la presión del sistema inmune que, de ser suficiente, contiene la progresión del tumor, de lo contrario se establece un periodo de selección Darwiniana. En este proceso surgen nuevas variantes de células malignas (heterogeneidad) que portan nuevas mutaciones que incrementan su resistencia al ataque del sistema inmune. ⁽⁶⁾

El producto final del proceso de equilibrio es una nueva población de células tumorales con baja inmunogenicidad. En esta fase actúan principalmente linfocitos T CD4 y CD8 específicos al tumor. ^(5, 6, 16)

El escape de un tumor es resultado de su alta tasa de replicación celular, que rebasa su destrucción por la respuesta inmune. En esta etapa, el sistema inmune se ve limitado por la heterogeneidad del tumor, aunado al hecho de que las variantes de células tumorales son resistentes a la eliminación. Además las células tumorales son capaces de modular negativamente a la respuesta inmune (inmunosubversión), por la adquisición de mecanismos de evasión que se explicarán posteriormente (ver: Antecedentes), ver Fig 5. Después de que las células tumorales han escapado de la respuesta inmune antitumoral el cáncer es detectado clínicamente. ⁽¹⁶⁾

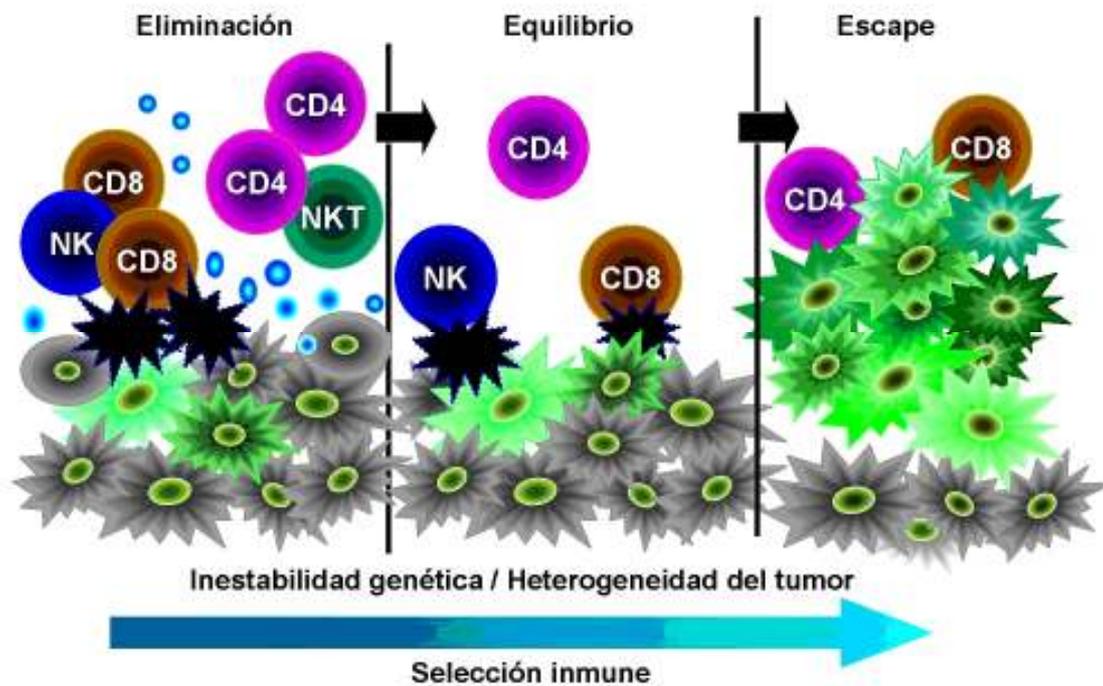


Fig 5. Inmunooedición del cáncer. A la eliminación de las células tumorales por parte del sistema inmune innato se la denomina inmunovigilancia. El equilibrio representa el proceso por el cual el sistema inmune selecciona y promueve la generación de variantes de células tumorales con mecanismos de evasión. Finalmente el escape es el proceso en el cual el tumor heterogéneo prolifera incontroladamente, rebasando la respuesta inmune del hospedero. (Modificada de 6)

Generalidades de la activación del linfocito T

Los linfocitos T son las principales células que reconocen y eliminan a las células neoplásicas, dicho reconocimiento es mediado por el receptor del linfocito T (TCR), el cual es específico para un péptido antigénico. ^(17,18) Dicho péptido se asocia a las moléculas clase I o de clase II del MHC (CD8 y CD4, respectivamente) durante la presentación del antígeno, esto es esencial para que la célula T pase de la fase G₀ (quiescencia) hacia la proliferación y diferenciación. ⁽¹⁹⁾

Lo anterior comprende la "primera señal" en la activación del linfocito T, pero para que ésta sea eficiente se necesita de un segundo estímulo o señal denominado co-estimulación, que amplifica las señales de activación inducidas por la primera señal. De no presentarse la coestimulación, el linfocito T entra a un estado no responsivo denominado anergia. ⁽²⁰⁾

La activación de un linfocito T CD4 (Th₀) implica la producción de citocinas que favorecen la respuesta inmune celular (Th1) o la respuesta inmune humoral (Th2); en el caso de los linfocitos

T CD8, implica ejercer su actividad citotóxica sobre la célula blanco o tumoral. En términos generales la activación involucra la proliferación y diferenciación del linfocito T. ⁽¹⁴⁾

Estructura del complejo TCR/CD3

El TCR es un heterodímero conformado por dos cadenas α y β que median el reconocimiento del péptido antigénico durante la presentación de antígeno; además, necesita de un complejo multiprotéico, el CD3, para tener estabilidad y transmitir las señales de activación al interior del linfocito T.

El CD3 se compone de las siguientes seis cadenas polipeptídicas: una cadena γ , una δ , dos ϵ y dos ζ . Estas cadenas se asocian en dos heterodímeros (ϵ - δ) y (ϵ - γ) y un homodímero invariante de la cadena zeta (ζ - ζ). ⁽¹⁷⁾ Ver Fig 6

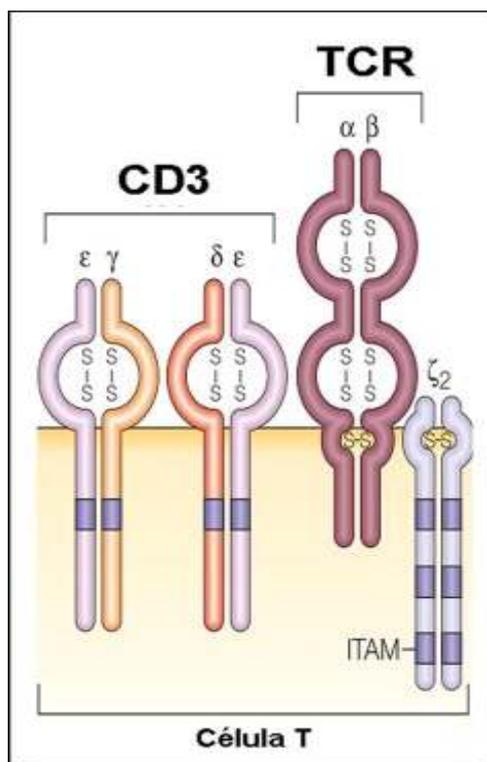


Fig 6. Estructura del complejo TCR/CD3 del linfocito T. Componentes del complejo TCR-CD3. El TCR está conformado por dos cadenas $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ (no mostradas). El CD3 es un complejo multiprotéico indispensable para la actividad del linfocito T. (Modificado de 21)

Las cadenas γ , ϵ y δ presentan homología y pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, están codificadas en el cromosoma 11 en el humano, y cada una posee un ITAM (motivo de activación basado en tirosina). La cadena ζ no presenta homología con las demás cadenas del complejo CD3, está codificada en el cromosoma 1, tiene un dominio corto extramembranal (9 aa)

INTRODUCCIÓN

y un dominio intracelular largo (113 aa) que contiene tres ITAMs que se activan por la acción de tirosinas cinasas. Esta cadena es indispensable para la transducción de señales en el linfocito T. (17,21)

El complejo CD3 se ensambla en la membrana del linfocito T, este proceso es muy controlado, se realiza en el retículo endoplasmático y la cadena ζ es la proteína limitante de dicho ensamblaje. Como otros receptores de superficie, el receptor TCR-CD3- ζ es internalizado y reciclado de nuevo a la superficie de la célula, este proceso implica una regulación negativa que reduce el número total de receptores en la superficie, ya que el complejo se degrada vía lisosomal. (17,22) Ver Fig 7.

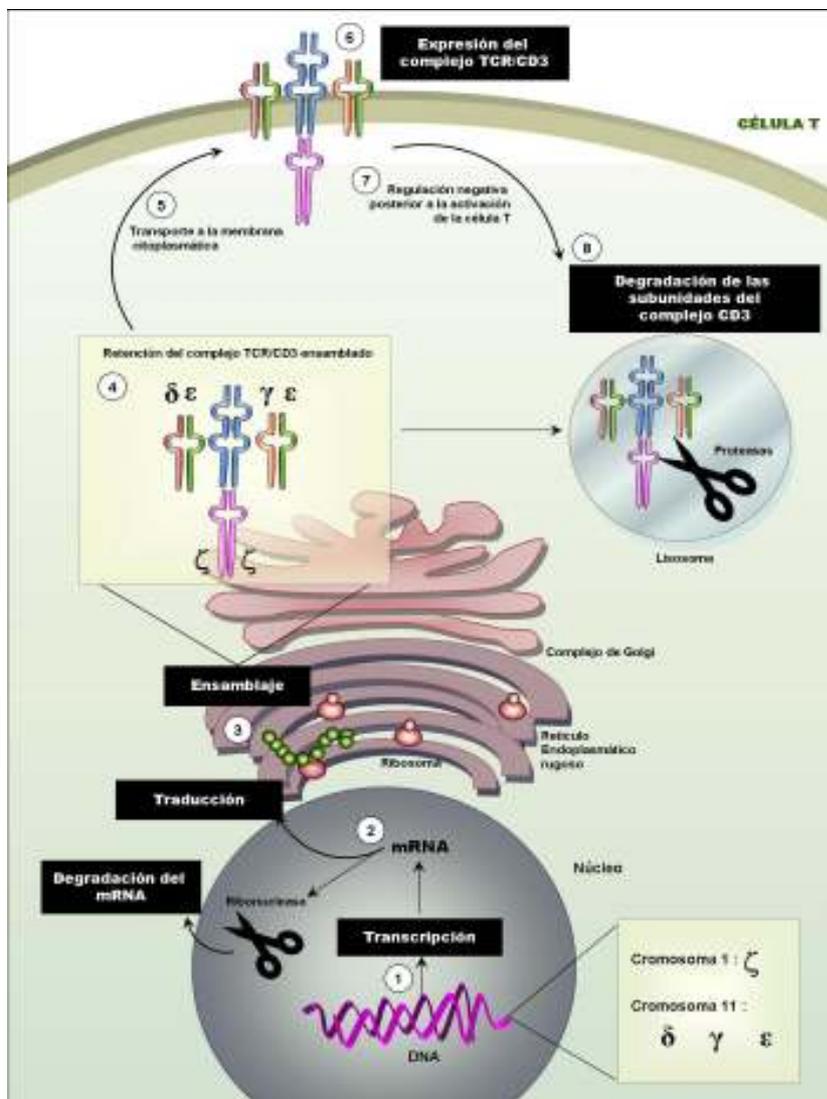


Fig 7. Expresión y degradación del complejo TCR/CD3.

- 1) La expresión del mRNA de la subunidad CD3 ζ difiere de las demás subunidades del complejo CD3, debido a su distinta organización genética, localización cromosomal y estructura proteica.
- 2) Después de la transcripción se lleva a cabo la traducción de las cadenas del complejo CD3.
- 3) Éste complejo se ensambla en el retículo endoplasmático, y 4) puede acumularse o degradarse.
- 5) Después de ser madurado en el complejo de Golgi, el complejo CD3 es transportado a la membrana plasmática.
- 6) El complejo TCR/CD3 se expresa en la superficie, y es estabilizado por la cadena ζ , la cual bloquea estéricamente la internalización del complejo. En las células T maduras, CD3 ζ se considera el factor limitante en el ensamblaje y transporte a la membrana plasmática del complejo TCR/CD3.
- 7) Después de la activación de la célula T, la expresión del complejo TCR/CD3 disminuye al ser internalizado. 8) Por último el complejo CD3 es degradado en los lisosomas y la expresión del complejo TCR/CD3 disminuye hasta la siguiente activación del linfocito T.

La regulación negativa del TCR controla la activación del linfocito T porque al disminuir su expresión en la superficie, las células T estimuladas se desensibilizan. (18)

Señalización y activación mediada por el complejo TCR/CD3

Los ITAMs permiten llevar a cabo una serie de fosforilaciones y la transducción de señales. Si alguna cadena del complejo CD3 está ausente o su expresión disminuye, el linfocito T tiene deficiencias tanto en el reconocimiento como en su activación. ⁽²¹⁾ Fig 8

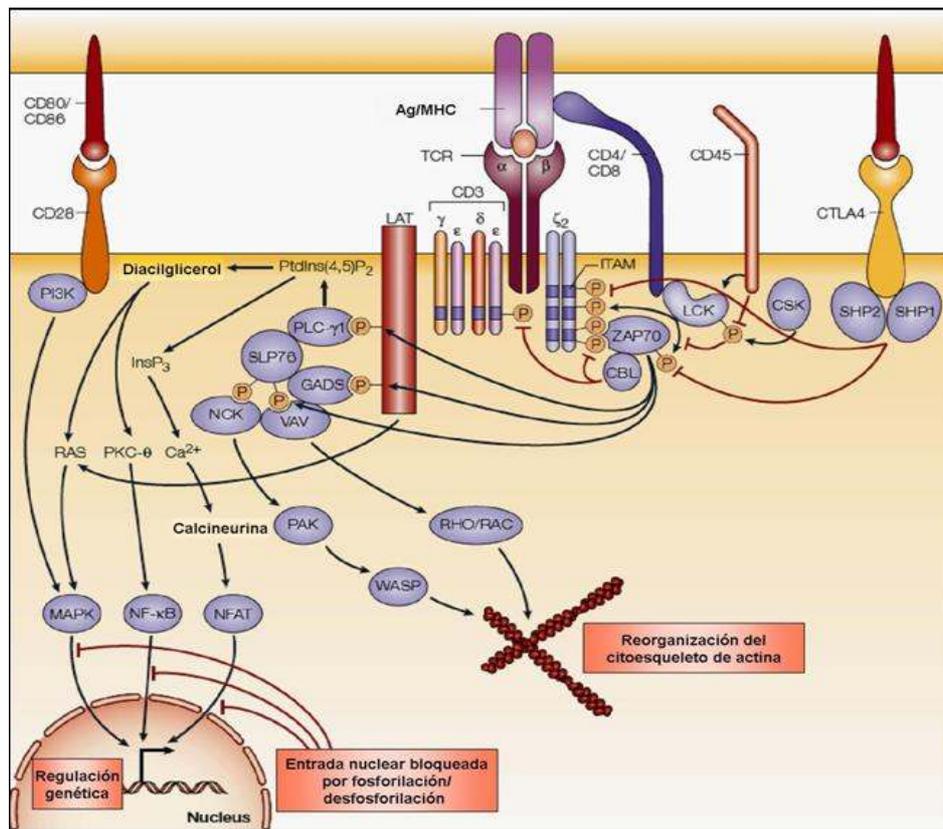


Fig 8. Señalización en la activación del linfocito T. A) La estimulación antigénica de las células T provoca la activación de dos proteínas tirosinas cinasas (PTKs) de la familia *src*, p56^{Lck} y p59^{Fyn}; éstas fosforilan a los ITAMs, que están presentes en todas las cadenas del complejo, pero en mayor número en CD3ζ. Los ITAMs fosforilan a ZAP-70 desencadenándose así una cascada de fosforilación y señalización que activa a segundos mensajeros, provocando la reorganización del citoesqueleto de actina y la activación de factores de transcripción en el núcleo, que permiten la proliferación y diferenciación del linfocito T. (Modificado de ²¹)

La célula T se activa al encontrarse con una APC madura durante la presentación de antígeno. La activación celular es un término genérico que agrupa diversos eventos de señalización que permiten la respuesta de la célula, éstos incluyen a la proliferación, rearrreglos del citoesqueleto, activación de mecanismos antiapoptóticos, cambios en la expresión de genes, aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular y el incremento de la actividad metabólica. ⁽¹⁷⁾

Subsecuentemente, se forman estructuras micro y macromoleculares que facilitan la formación de la sinapsis inmunológica y la activación completa del linfocito T. La activación es mediada por factores de transcripción como NF- κ B y NFAT que inducen la transcripción de genes, por ejemplo de citocinas como IL-2, la cual promueve la proliferación celular. Además la activación de la células T es importante para que los linfocitos naïve que son células inmunes quiescentes se diferencien a células de memoria y efectoras. ^(17,21)

Por lo tanto, para que la respuesta del linfocito T sea eficiente y óptima, es indispensable que tanto el receptor como la serie de moléculas implicadas en el reconocimiento, en la presentación de antígeno, coestimulación y en la señalización, permanezcan estructuralmente íntegros y que se expresen en cantidad suficiente en la membrana plasmática. ⁽¹⁹⁾

Coestimulación del linfocito T mediada por CD28

Las vías de coestimulación tienen diversas funciones en la regulación de los distintos estados de la respuesta de las células T, se expresan en un tiempo y localización adecuados. ⁽²³⁾ En el linfocito T, la principal vía co-estimuladora es la de CD28/B7, CD28 es una proteína transmembranal que forma un homodímero en la célula T y pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. En humanos se expresa en el 90% y 50% de células T CD4+ y CD8+, respectivamente.

CD28 funciona como un receptor de membrana, cuyos ligandos son B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86) expresados en las APCs. ⁽¹⁹⁾ En el linfocito T naïve la coestimulación mediada por CD28 incrementa la proliferación inducida por el TCR y la diferenciación, activa factores de transcripción, aumenta la expresión de citocinas como IL-2, IFN- γ , IL-4 y quimiocinas, por lo cual es crucial para las funciones efectoras de las células T; además promueve la formación de células de memoria, el programa antiapoptótico y el aumento de la expresión de otros receptores de coestimulación. ⁽¹⁹⁾ Ver Fig 9.

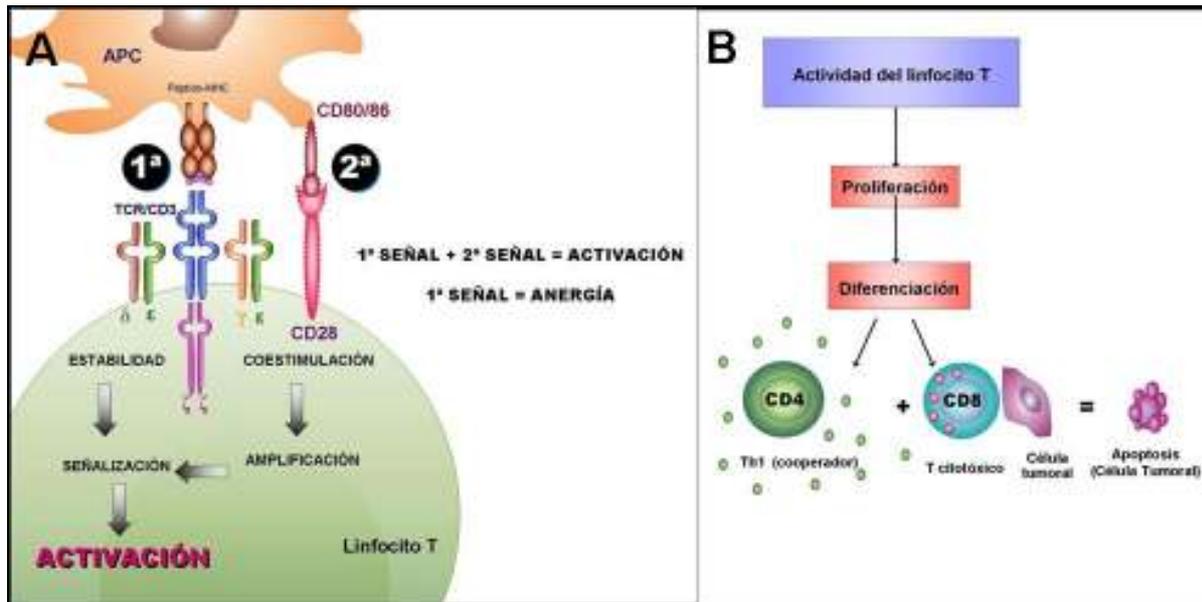


Fig 9. Coestimulación y actividad del linfocito T. **A)** El complejo del péptido-MHC es reconocido por el TCR/CD3 lo cual conforma la "primera señal" en la activación del linfocito T, para que esta señal permita la activación eficiente del linfocito T, es necesario que una "segunda señal" amplifique la señalización intracelular. Si la coestimulación no se presenta el linfocito T se anergiza. **B)** Los linfocitos T cooperadores y los T citotóxicos favorecen la respuesta inmune antitumoral mediante la cual las células tumorales son eliminadas por apoptosis.

Apoptosis

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular controlado genéticamente que permite mantener la homeostasis tisular al controlar el número de células y tamaño de los tejidos, además participa en la regulación de la respuesta inmune al eliminar a los linfocitos T citotóxicos después de que éstos eliminaron a las células blancas, por ejemplo a las células neoplásicas. No obstante las células tumorales han desarrollado la capacidad de evadir la apoptosis e inclusive inducirla en los linfocitos T (ver Antecedentes).

La apoptosis un proceso que implica tanto cambios morfológicos como bioquímicos. ⁽²⁴⁾ Durante la apoptosis, las células disminuyen de tamaño, la membrana plasmática pierde su asimetría exponiendo en la parte extracelular el fosfolípido fosfatidilserina (PS), que en condiciones normales se encuentra en la parte intracelular de la membrana. Posteriormente, el citoplasma y el retículo endoplasmático se contraen y forman vesículas, en el núcleo la cromatina se condensa y el DNA se fragmenta por la acción de endonucleasas. ⁽²⁵⁾ Mediante este mecanismo, el contenido celular es encapsulado formándose cuerpos apoptóticos, que en condiciones fisiológicas son endocitados por las células fagocíticas, las cuales poseen receptores para moléculas expresadas por los cuerpos apoptóticos (por ejemplo para la PS). La endocitosis de los cuerpos apoptóticos

permite que las células muertas sean removidas del microambiente sin desencadenar un proceso inflamatorio. ^(25,26)

A nivel bioquímico, la apoptosis se caracteriza por la permeabilización de la membrana mitocondrial (MMP) y la activación masiva de caspasas. Se han reportado dos vías que desencadenan la apoptosis: la vía extrínseca y la intrínseca; ambas vías convergen en una vía común mediante la activación de caspasas.

En la vía extrínseca de la apoptosis se requiere de la activación de receptores de muerte por medio de sus respectivos ligandos, dichos receptores son: el Receptor 1-TNF, Fas, DR3, DR4, DR5 y DR6 presentes en la membrana plasmática de la célula blanco; mientras que sus ligandos son TNF- α , FasL, ligando APO3 y TRAIL. Dichos ligandos se localizan en la membrana o pueden liberarse en forma de vesículas por las células NK, NKT, CTL, monocitos y fibroblastos. La unión del ligando con el receptor de muerte provoca la trimerización de éste, y la formación de un complejo intracelular (DISC) que contiene "dominios efectores de muerte". En el DISC se reclutan caspasas iniciadoras, como las caspasas-8, -10, -9; las cuales forman homodímeros o heterodímeros, y se activan por autoproteólisis. Las caspasas iniciadoras activan a caspasas efectoras cuya función se describe en la vía común de la apoptosis. ^(25,26, 27)

En la vía intrínseca participan receptores a nivel del citoplasma y núcleo que se activan en respuesta al estrés oxidativo, daño directo al DNA, por radiaciones o por agentes citotóxicos. Las señales desencadenadas son detectadas por la mitocondria, en la cual se produce una falla bioenergética que causa la MMP y la liberación del citocromo c. Esta señalización es mediada por las proteínas proapoptóticas de la familia Bcl₂ (BAX, Bad, Bcl_x), permitiendo la formación de un complejo llamado apoptosoma (conformado por la procaspasa 9 y el citocromo c que activa a caspasas efectoras. ⁽²⁷⁾

En la vía común, las caspasas -3,-6 y-7 (efectoras) son las responsables de la muerte celular por proteólisis de sustratos celulares como proteínas reguladoras del ciclo celular, componentes del citoesqueleto, precursores de citocinas, catabolismo del DNA y del RNA, transducción de señales y factores de transcripción. ⁽²⁸⁾

Si los cuerpos apoptóticos no son fagocitados, el contenido celular se libera produciéndose necrosis. La necrosis también es un tipo de muerte celular, pero a diferencia de la apoptosis, se produce por estímulos físicos o químicos muy intensos que dañan la integridad de las células, que causa una falla energética, el aumento de los radicales libres, la destrucción masiva de los organelos y la liberación descontrolada del contenido intracelular, por lo cual se desencadena un proceso inflamatorio. ⁽²⁹⁾ Ver Fig 10

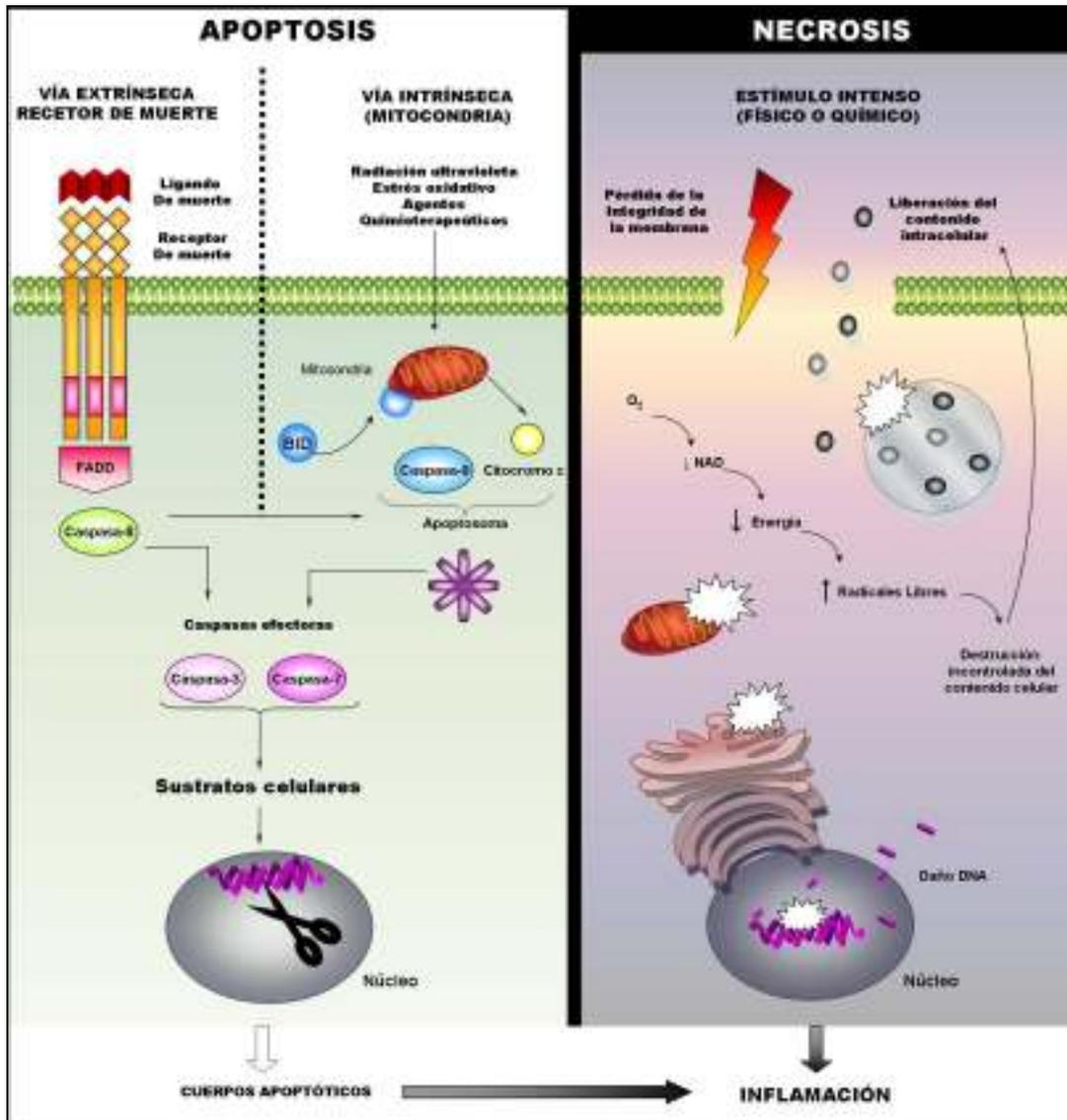


Fig 10. Apoptosis y necrosis. La apoptosis puede iniciarse por dos vías: la vía extrínseca y la vía intrínseca. Ambas vías convergen en la vía común mediante la cual se activan caspasas efectoras que tienen distintos sustratos de muerte que permiten el encapsulamiento del contenido celular para formar los cuerpos apoptóticos. La muerte por necrosis se efectúa cuando el estímulo de muerte es demasiado intenso y se libera el contenido celular produciendo inflamación (que también ocurre si los cuerpos apoptóticos no son fagocitados)

ANTECEDENTES

Mecanismos de evasión de las células tumorales en contra de la respuesta inmune.

Los pacientes con enfermedades malignas en estadios avanzados presentan una respuesta inmune disfuncional, esto se debe a los mecanismos de evasión adquiridos en la fase de escape por las células tumorales en contra del sistema inmune.⁽³⁰⁾ Los mecanismos de evasión tumoral pueden clasificarse en tres tipos: 1) Falta de reconocimiento e insensibilidad hacia la respuesta inmune antitumoral, 2) Producción y promoción de factores inmunosupresores que alteran la respuesta inmune, tanto a nivel local como a nivel sistémico, y 3) Inducción de muerte a las células inmunes (contraataque tumoral).⁽⁶⁾ Ver Fig 11.

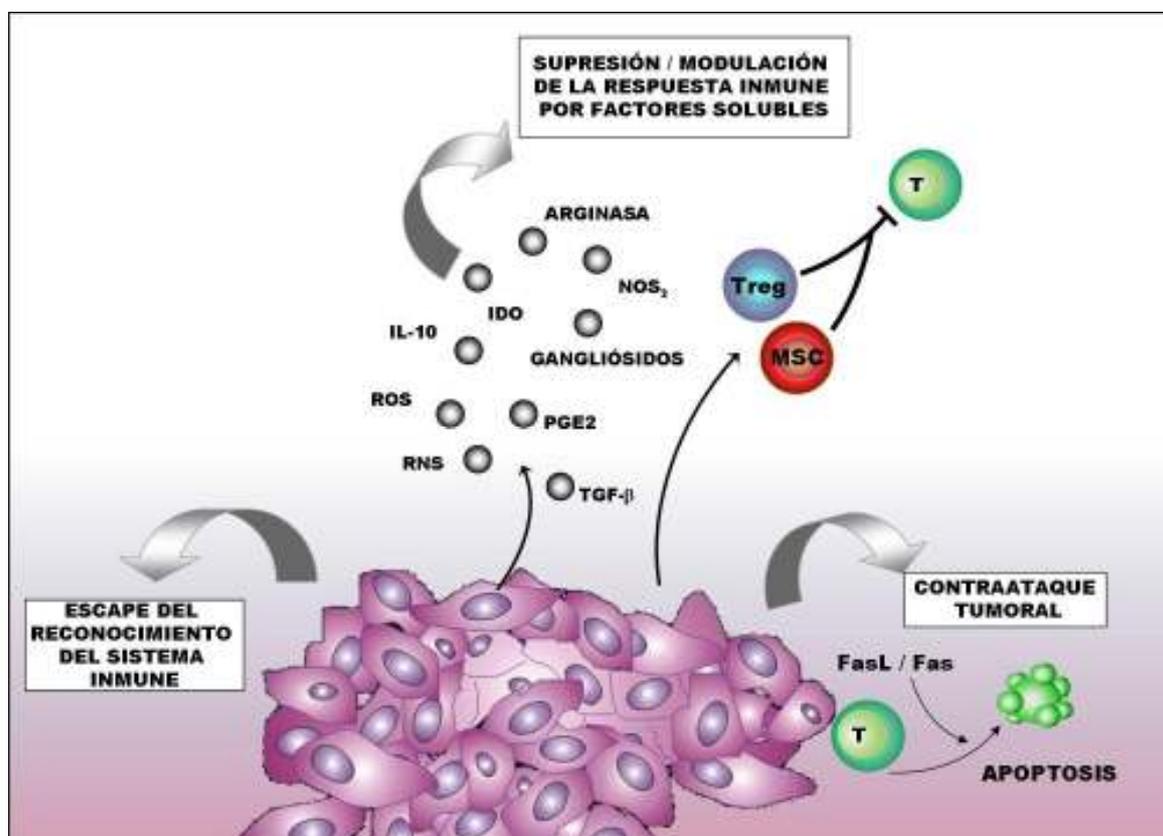


Fig 11. Mecanismos de evasión tumoral contra el sistema inmune. Los mecanismos de evasión se pueden dividir en tres tipos: 1) Los propios de la célula tumoral, como la deficiencia en la presentación de antígeno y la evasión de la apoptosis al sobreexpresar proteínas antiapoptóticas (como Bcl2) o por la inhibición en la expresión de proteínas proapoptóticas (como Fas y Bax). A la célula tumoral, esto le permite escapar del reconocimiento y control de la respuesta inmune. 2) El segundo tipo de mecanismos involucra la liberación o inducción de factores solubles inmunosupresores como TGF-β, IL-10, la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), prostaglandina E₂ (PGE₂), especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS), etc. 3) El tercer tipo de mecanismos es el ataque directo de la célula tumoral que provoca la muerte del linfocito T (contraataque tumoral)

Escape e insensibilidad a la respuesta inmune antitumoral

El primer tipo de mecanismo implica que los tumores pueden crecer sin ser detectados por el sistema inmune, vistos como “tejidos normales”.⁽³¹⁾ La evasión del tumor hacia el reconocimiento y la destrucción es multifactorial, e incluye la regulación negativa de moléculas de clase I del MHC, la deficiencia en la actividad del proteasoma y la pérdida de los antígenos tumorales.

La falta de presentación de antígeno provoca que la célula tumoral no sea reconocida y sea insensible a la muerte inducida por los linfocitos T efectores (pero no así por las células NK). Otro mecanismo por el cual las células tumorales pueden resistir el ataque citotóxico de los linfocitos T efectores se debe a que expresan inhibidores de proteasas o tienen alteraciones en la señalización inducida por los distintos receptores con dominios de muerte (por ejemplo, Fas).⁽¹⁶⁾

Modulación y supresión de la respuesta inmune antitumoral

El segundo tipo de mecanismo involucra la modulación de la respuesta inmune antitumoral para que ésta sea tolerante hacia el tumor. A nivel molecular esto es posible por la secreción e inducción de factores solubles inmunosupresores (por parte de la célula tumoral) que provocan la deficiencia en la transducción de señales y en la actividad de las células del sistema inmune al favorecer un patrón de citocinas del tipo Th2 que disminuye la respuesta inmune celular o de tipo Th1).⁽¹⁶⁾

Como ejemplos de este tipo de mecanismo se encuentra la capacidad de la célula tumoral para impedir la maduración de las APCs por la secreción de IL-10 (provocando que no realicen eficientemente la presentación de antígeno), o a la disminución de la expresión de moléculas coestimuladoras que, además de producir anergia, induce la tolerancia de células T antígeno-específicas.^(32, 33)

Entre los factores solubles se encuentran citocinas inmunosupresoras, enzimas, moléculas de bajo peso molecular, etc. (ver Tabla 1). Las células tumorales también pueden inducir la presencia de los dos principales tipos de células inmunosupresoras: de linfocitos T reguladores (Treg) y las células mieloides inmunosupresoras (MSCs).⁽³⁴⁾

Los linfocitos Treg secretan principalmente TGF- β (potente citocina inmunosupresora) e IL-10. Las MSCs regulan la actividad de los linfocitos T a través del metabolismo de aminoácidos, como la L-arginina y el triptofano. No obstante, las células tumorales por sí mismas son capaces de sintetizar estas enzimas y disminuir la disponibilidad de dichos aminoácidos.⁽¹⁶⁾

Dentro de los principales mecanismos de evasión que afectan directamente a los linfocitos T, se encuentra la reducción o la pérdida de la expresión de las moléculas del complejo CD3, principalmente de CD3 ζ y de CD3 ϵ , lo que en parte es consecuencia de los factores inmunosupresores secretados o inducidos por el tumor. ^(21, 35)

Contraataque tumoral

Por último, en el tercer tipo de mecanismo de evasión hay inducción de muerte en las células inmunes, este mecanismo también es conocido como contraataque tumoral. Se postula que está mediado por la expresión en la célula tumoral de ligandos de muerte como FasL, o bien, por la secreción de éstos al microambiente a través de microvesículas. ^(36,37)

Las microvesículas expresan marcadores tumorales y han sido aisladas de los sobrenadantes de líneas celulares tumorales, del líquido ascítico y del plasma de pacientes con cáncer de ovario y de melanoma. Tienen un diámetro de 50 a 100 nm y son biológicamente activas al contener FasL, TRAIL, y antígenos asociados a moléculas clase I del MHC. ⁽³⁷⁾ Se ha reportado que dichas microvesículas inducen apoptosis en los linfocitos T Jurkat. Sin embargo, no se ha comprobado que sean exclusivamente de origen tumoral, también puede ser de origen inmune o ser estructuralmente híbridas (tumoral-inmune), incluso en un mismo paciente pueden coexistir microvesículas de diferente composición y por lo tanto variar en su actividad biológica. ⁽³¹⁾

También se han aislado microvesículas en líquido pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar, su análisis proteómico muestra que contienen principalmente de inmunoglobulinas, de proteínas del citoesqueleto, proteínas que participan en la presentación de antígeno y en la transducción de señales, pero no se han realizado ensayos biológicos con estas microvesículas como los realizados con las aisladas en otros tipos de malignidades. ^(38, 37)

No obstante, el contraataque tumoral mediado por FasL todavía se encuentra en controversia ya que no se ha encontrado que sea un mecanismo general en la mayoría de los cánceres, y además la evidencia que muestra el contraataque tumoral es cuestionable debido a problemas metodológicos. ⁽³¹⁾

Existen otras maneras por las cuales las células tumorales puede inducir la muerte de los linfocitos T, por ejemplo, por la activación crónica o por la acción de radicales libres producidos por el estrés oxidativo en el sitio del tumor.⁽¹⁶⁾

En general, los mecanismos de evasión funcionan al provocar la tolerancia inmunológica hacia el tumor o bien implican el ataque directo por las células tumorales a las células del sistema inmune, para que estas últimas sean disfuncionales o entren en apoptosis (dicha muerte celular se ha

observado principalmente en los linfocitos T).⁽³⁰⁾ Los mecanismos de evasión tumoral se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Mecanismos de evasión tumoral hacia la respuesta inmune del hospedero. (Modificada de 34)

ESTRATEGIA	MECANISMO
Ignorancia e inducción de tolerancia inmunológica	Ausencia de antígenos tumorales Crecimiento de tumores en sitios inmunoprivilegiados Falta de moléculas de adhesión en la célula tumoral Inducción de anergia en linfocitos T (Falta de moléculas coestimuladoras como CD28) Desviación inmune hacia un patrón de citocinas tipo Th2 Inducción células Treg y MSCs Reducción de células T Disminución de la expresión del complejo CD3 en el linfocito T (principalmente de CD3ζ y de CD3ε)
Presentación de antígenos inadecuada	Ausencia en la expresión de antígenos tumorales Mutaciones en la maquinaria del gen del MHC Defectos en el procesamiento de antígeno (ejemplo, TAP, deficiencia de LMP)
Expresión o inducción de factores y moléculas inmunosupresoras	Citocinas: TGF-β, IL-10, IL-4, IL-6, gangliósidos asociados al tumor Enzimas:IDO, arginasa 1, óxido nítrico sintetasa inducible (NOS ₂) Moléculas de bajo peso molecular: ROS como H ₂ O ₂ , RNS, PGE ₂ , histamina y epinefrina
Evasión a la apoptosis	Sobreexpresión de proteínas de la familia BCL-2, Survivina Reducción de la actividad de las caspasas, insensibilidad al TNF
Contraataque (?)	Expresión de FasL en la célula tumoral Expresión de otros ligandos de muerte (TRAIL) en la célula tumoral

Apoptosis de linfocitos T en pacientes con cáncer

Se ha reportado un aumento de la apoptosis en los linfocitos T infiltrantes al tumor (TIL) y de los linfocitos de sangre periférica (PBLs) provenientes de pacientes con distintos tipos de cánceres como el de pulmón, cabeza y cuello, renal, melanoma, gástrico; tanto *in situ* (determinado por la técnica de TUNEL o midiendo la actividad de caspasas), como *ex vivo* (utilizando el marcaje con anexina V o detectando la degradación de DNA).^(39, 40, 41, 42, 43 44, 45, 46) Algunos reportes sugieren que la inducción de apoptosis *in vitro* en linfocitos T Jurkat cocultivados con líneas celulares tumorales, puede estar mediada por FasL.^(31, 43, 46) También se ha reportado apoptosis en células T Jurkat cultivadas con microvesículas FasL⁺ provenientes de pacientes con cáncer de ovario, carcinoma oral y en melanoma.^(47, 48) La inducción de apoptosis por parte del tumor hacia los linfocitos T *in vivo* provoca un incremento inapropiado en el recambio de los linfocitos T, es decir,

que disminuye la cantidad de los linfocitos T CD8 infiltrantes al tumor, lo cual tienen efectos desfavorables en la implementación de la inmunoterapia como una alternativa del tratamiento de los pacientes con cáncer. ⁽³¹⁾

Por lo tanto, la disfunción en la célula T puede originarse de dos formas, por mecanismos de evasión ejercidos directamente por la célula tumoral (ya sea por contacto directo, o por factores solubles secretados), o bien por la desregulación inmune inducida por la presencia del tumor en el hospedero.

Disminución en la expresión de CD3 ζ de linfocitos T en cáncer y otras patologías

Como se mencionó anteriormente, dentro de los mecanismos de evasión más importantes y conservados de la anergia de los linfocitos T y la posterior tolerancia hacia el tumor, se encuentra la regulación negativa de CD3 ζ . Diversos estudios del complejo CD3 han demostrado la reducción en la expresión de esta cadena en los linfocitos T provenientes de pacientes con distintos tipos de cánceres incluyendo el de pulmón. ^(21, 45, 47, 49) Además se ha reportado que la cadena ζ reduce su expresión en los linfocitos T provenientes de pacientes con enfermedades no malignas como las autoinmunes (lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide) y en infecciosas crónicas (HIV, lepra y tuberculosis). ⁽²¹⁾

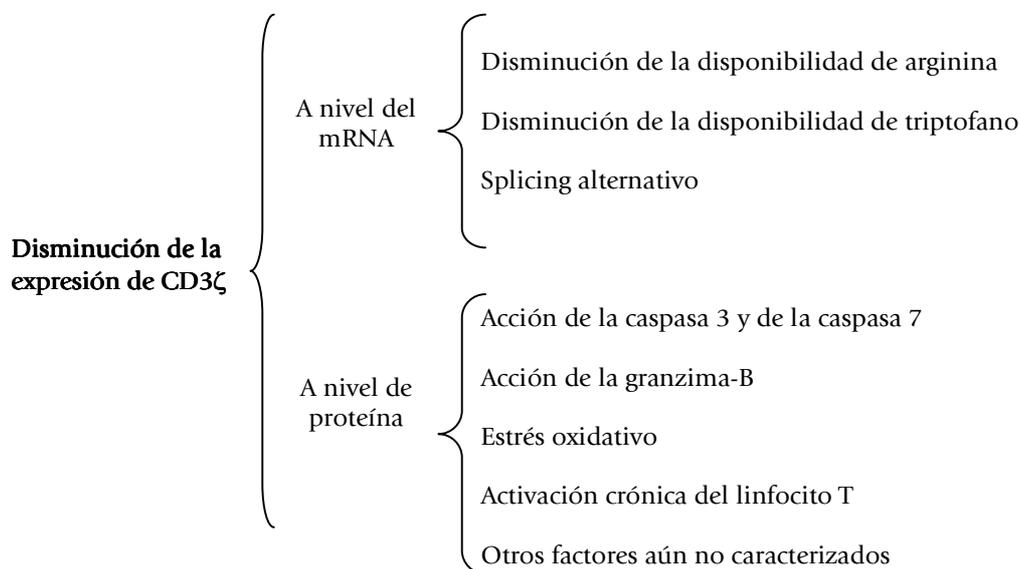
Se ha demostrado *in vivo* la disminución de la cadena ζ en los linfocitos T infiltrantes al tumor (TIL) y en los linfocitos T asociados al tumor (TAL), estos últimos están presentes en tejidos y ganglios linfáticos regionales próximos al tumor primario. ^(49, 50) Ésta alteración no sólo se ha manifestado a nivel local, sino también a nivel sistémico, ya que, se ha encontrado la disminución de la cadena ζ en los linfocitos de sangre periférica (PBLs). ^(39, 44, 45, 48, 51) Aunado a estas alteraciones, se ha observado que no sólo los linfocitos T antígeno-específico son afectados, también la población total de linfocitos T (efecto bystander), lo que sugiere que este mecanismo de evasión puede ser tanto específico como inespecífico. ⁽²¹⁾

En estudios *in vitro* se ha demostrado que los linfocitos T Jurkat cocultivados con líneas tumorales de cáncer de cabeza y cuello así como oral, reducen la expresión de CD3 ζ . ^(39,47)

Factores responsables de la reducción de la expresión de la molécula CD3 ζ en linfocitos T

Existen distintos factores por los cuales disminuye la expresión de la cadena ζ . Un tipo de mecanismo actúa a nivel de la síntesis o de la estabilidad de su mRNA. La mayoría reducen los niveles de la proteína CD3 ζ como parte de la regulación postransduccional que implica el

aumento de su degradación. A continuación se muestra la clasificación general de los mecanismos que disminuyen la expresión de CD3 ζ :



A nivel del mensajero se ha encontrado que la reducción de las concentraciones de L-arginina provoca la reducción de la expresión de CD3 ζ al disminuir la estabilidad de su mRNA. La disminución de la disponibilidad de la L-arginina se debe a su catabolismo por parte de la arginasa I y la NOS₂, secretadas por varios tumores, incluyendo el de pulmón y por las células MCSs y DCs.⁽⁵²⁾ Otro aminoácido importante es el triptofano cuya deficiencia por la acción de laIDO provoca en los linfocitos T, la acumulación de RNAs de transferencia y por lo tanto la insuficiencia en la traducción de las proteínas, con la consecuente disminución de CD3 ζ ; además de causar el arresto de las células T en la fase G1 del ciclo celular.

Como se mencionó anteriormente, en algunos tipos de cáncer y otras enfermedades, la disminución de la cadena ζ ha sido consecuencia de la reducción de su mRNA⁽⁴⁵⁾.

En otros estudios dicha alteración fue exclusivamente a nivel de la proteína, por el aumento de su degradación. En este sentido, la expresión reducida o la ausencia de CD3 ζ , se ha asociado a diversos factores e incluso a la inducción de apoptosis de los linfocitos T durante el contraataque tumoral. En este tipo de muerte celular se activan la caspasa 3 y la caspasa 7, estas proteasas tienen como sustrato común a la cadena CD3 ζ . Si bien la hipótesis del contraataque tumoral se encuentra en controversia, es posible que la apoptosis detectada en los linfocitos T aislados del tumor o de sangre periférica, sea inducida por los propios linfocitos T activados, lo que es denominado fratricidio.⁽³⁶⁾ También los linfocitos T citotóxicos pueden inducir la muerte a otros

linfocitos T por la vía de granzimas-perforina (además de la vía del receptor de muerte) y activar a la granzima B, que también es una proteasa que degrada a CD3 ζ .^(53,54)

También existen reportes en los cuales la cadena ζ disminuye como consecuencia de la apoptosis de los linfocitos T; sin embargo, otros estudios sugieren que dichos fenómenos son independientes, por ejemplo, la reducción de la expresión de la cadena ζ como consecuencia del estrés oxidativo provocado por los macrófagos asociados al tumor provenientes de derrames pleurales malignos.⁽⁵⁵⁾

Además, la disminución de la expresión de CD3 ζ también puede ocasionarse por la activación crónica del linfocito T (mecanismo de autorregulación). En este contexto es importante mencionar que la activación crónica del linfocito se debe a la exposición continua hacia los antígenos tumorales y a la inflamación crónica.⁽²¹⁾ Este tipo de inflamación se presenta en los distintos tipos de cáncer, (e inclusive favorece la progresión de los mismos), en las enfermedades autoinmunes y en las infecciones crónicas en las cuales se reporta la reducción en la expresión de la cadena ζ . Otro factor soluble poco estudiado que aumenta la degradación de CD3 ζ es un factor aun no caracterizado llamado ZIP (proteína inhibidora de la cadena ζ) secretado por las células tumorales *in vitro*.⁽⁵⁶⁾

La disminución en la expresión de la cadena ζ también tiene un significado clínico, debido a que se correlaciona con un pobre pronóstico y en la supervivencia de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello.⁽⁴⁰⁾

Reducción de la expresión de CD3 ϵ y de la molécula CD28 en linfocitos T

Además de la reducción de la expresión de CD3 ζ , se ha reportado que los linfocitos T pueden presentar alteraciones en la expresión de CD3 ϵ . Esta molécula se encuentra disminuida en TIL, en TAL y PBLs provenientes de pacientes con cáncer renal y de próstata,^(51, 57) lo cual sugiere que, los factores involucrados en la regulación negativa de CD3 ϵ afectan progresivamente hasta un nivel sistémico. También se han observado niveles bajos de la cadena ϵ en los PBL y en células T Jurkat cocultivadas con líneas celulares de carcinoma de ovario, así como en los linfocitos T de pacientes con tuberculosis y de pacientes con lepra.⁽⁵⁸⁾

No se conocen los mecanismos moleculares responsables de la disminución de CD3 ϵ , sólo se ha encontrado que su expresión se ve reducida en linfocitos T apoptóticos y cuando hay ausencia de CD3 ζ .

Por otro lado, hay reportes de la reducción en la expresión de la molécula coestimuladora CD28 en los linfocitos T apoptóticos de pacientes con hepatocarcinoma y de pacientes con hepatitis C. *In vitro* se ha demostrado la regulación negativa de CD28 en linfocitos T Jurkat en apoptosis (inducida por FasL).⁽⁵⁹⁾

La reducción de la molécula coestimuladora CD28 puede explicar la presencia de linfocitos T no responsivos o anérgicos en los pacientes con cáncer.

Aunado a la disminución de las moléculas del complejo CD3 así como la inducción de apoptosis, hay otras alteraciones de la respuesta a mitógenos del linfocito T en distintos tipos de cáncer, por ejemplo: en la movilización de Ca^{2+} intracelular, en la reducción de la actividad de tirosinas cinasas, en la capacidad de proliferación y en la secreción de citocinas.⁽⁵¹⁾

Factores solubles y células inmunes presentes en el líquido pleural y plasma de pacientes con cáncer pulmonar

Si bien cada tipo de cáncer es diferente, el cáncer pulmonar comparte mecanismos de evasión con respecto a otros tipos de cáncer. En este contexto, se ha reportado que las células tumorales de pulmón secretan arginasa I (mencionada anteriormente) y citocinas que tienen efectos inmunosupresores. En los pacientes con NSCLC hay una polarización de los linfocitos T a un tipo Th2 (secretor de un patrón de citocinas tipo 2) que desfavorece la respuesta inmune celular. Además, tanto las células de mesotelioma, como las células infiltrantes en el espacio pleural⁽⁶⁰⁾ y las líneas celulares de carcinoma pulmonar⁽⁶¹⁾, pueden producir concentraciones elevadas de TGF- β en los derrames pleurales, y por lo tanto tener un efecto inmunosupresor en los linfocitos T presentes en el cáncer pulmonar.⁽⁶⁰⁾ En cuanto a las células inmunes de los pacientes con cáncer pulmonar se ha encontrado que, en el derrame pleural hay un reclutamiento ineficiente de células T por lo cual además de ser ineficientes se encuentran en cantidad reducida.⁽⁶²⁾ La presencia de las células T en el sitio del tumor es importante, ya que la disminución de la relación CD4/CD8 es un marcador de mal pronóstico en pacientes con adenocarcinoma pulmonar⁽⁶³⁾. Por lo tanto es importante conocer que tipo de disfunciones presentan los linfocitos T para diseñar nuevas estrategias terapéuticas.

En el cáncer pulmonar, además de encontrarse células T y las propias de una reacción inflamatoria (NK, neutrófilos, APCs), se han detectado células inmunosupresoras. Dentro de este contexto, se ha reportado un incremento del porcentaje de células Treg en el líquido pleural de pacientes con cáncer pulmonar. Mientras que en la sangre periférica de pacientes con NSCLC se han caracterizado recientemente a células mieloides supresoras que pueden estar contribuyendo a la deficiencia de los linfocitos T de estos pacientes.⁽⁶⁴⁾

La población de linfocitos T CD8, aislada del líquido pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar, es principalmente de memoria y no efectora, por lo cual se postula que, en el cáncer pulmonar pueden existir factores solubles en el microambiente que impidan la diferenciación de la célula CD8 hasta célula efectora, o esté disminuyendo su cantidad por apoptosis selectiva en ésta población. ⁽⁶⁵⁾ Estos resultados son el antecedente directo de este trabajo, en el cual se evaluó la apoptosis y la expresión de CD3 ζ , CD3 ϵ y de CD28 en linfocitos T Jurkat cultivados con líneas tumorales de adenocarcinoma pulmonar. En este estudio, se observó la disminución tanto en la expresión de CD3 ϵ como de CD28, no así de la cadena ζ . Mediante esta metodología no se indujo apoptosis en las células T Jurkat, lo cual es congruente con la falta de expresión de la proteína FasL así como de su mRNA en las líneas tumorales empleadas. Con base en lo anterior, se planteó la posibilidad de que no se esté ejerciendo el contraataque tumoral como un mecanismo de evasión en el cáncer pulmonar, pero si se provoca una disfunción en la célula T, al disminuir la expresión de moléculas indispensables para su activación (CD3 ϵ y CD28). ^(65,66)

En general, los antecedentes muestran que las células tumorales son capaces de reducir la expresión de CD3 ζ , CD3 ϵ y CD28, además de inducir apoptosis en los linfocitos T tanto *in vivo* como *in vitro*, por un contacto directo célula tumoral-linfocito T, o bien, por los factores que se secretan o inducen en el microambiente tumoral. Si bien este fenómeno no se ha demostrado en el cáncer pulmonar, dichos factores inmunosupresores pueden encontrarse tanto en los derrames pleurales (a nivel local) y pueden circular en el plasma de pacientes con cáncer pulmonar, provocando que una inmunosupresión local progrese a una inmunosupresión sistémica, que permita la expansión incontrolada del cáncer y la muerte del hospedero.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer pulmonar es un problema de salud pública, en nuestro país se estima que en el año 2010 habrá más de 10 000 muertes anuales debidas a esta enfermedad. El cáncer pulmonar es el de más alta mortalidad, y a pesar del tratamiento con quimioterapia y radioterapia, los pacientes con cáncer pulmonar tienen una baja sobrevida. ⁽⁹⁾ Por lo tanto, es crucial entender la patogénesis de este cáncer así como los procesos biológicos que pueden impedir y controlar su progresión, como es el caso de la respuesta inmune antitumoral. Conociendo cómo se da esta respuesta y los defectos cualitativos y cuantitativos que presentan las células inmunes de los pacientes, es posible tratar de implementar inmunoterapias que restituyan la actividad eficiente de la respuesta inmune antitumoral y que los pacientes con cáncer prolonguen su vida y se restablezcan de la enfermedad. Debido a que los linfocitos T son los principales efectores de la respuesta inmune antitumoral, es fundamental el estudio de su participación y disfunción en los pacientes con cáncer. En investigaciones previas se ha encontrado la disfunción de las células T provenientes del líquido pleural y del plasma de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar ⁽⁶⁵⁾.

Este trabajo de Tesis pretende conocer si estas muestras biológicas tienen el efecto biológico de disminuir la expresión de las moléculas indispensables en la activación del linfocito, CD3 ζ , CD3 ϵ y CD28, así como la capacidad de inducir apoptosis en un modelo de linfocitos T; como ha sido reportado ampliamente en las células T provenientes de pacientes con otros tipos de cáncer. Lo anterior implicaría conocer nuevos mecanismos de evasión del cáncer pulmonar en contra de la respuesta inmune y permitiría explicar la disfunción observada en los linfocitos T de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar.

HIPÓTESIS

El líquido pleural y el plasma de pacientes con adenocarcinoma pulmonar disminuirán la expresión de CD3 ζ , CD3 ϵ y CD28 e inducirán apoptosis en linfocitos T Jurkat como posibles mecanismos de evasión tumoral.

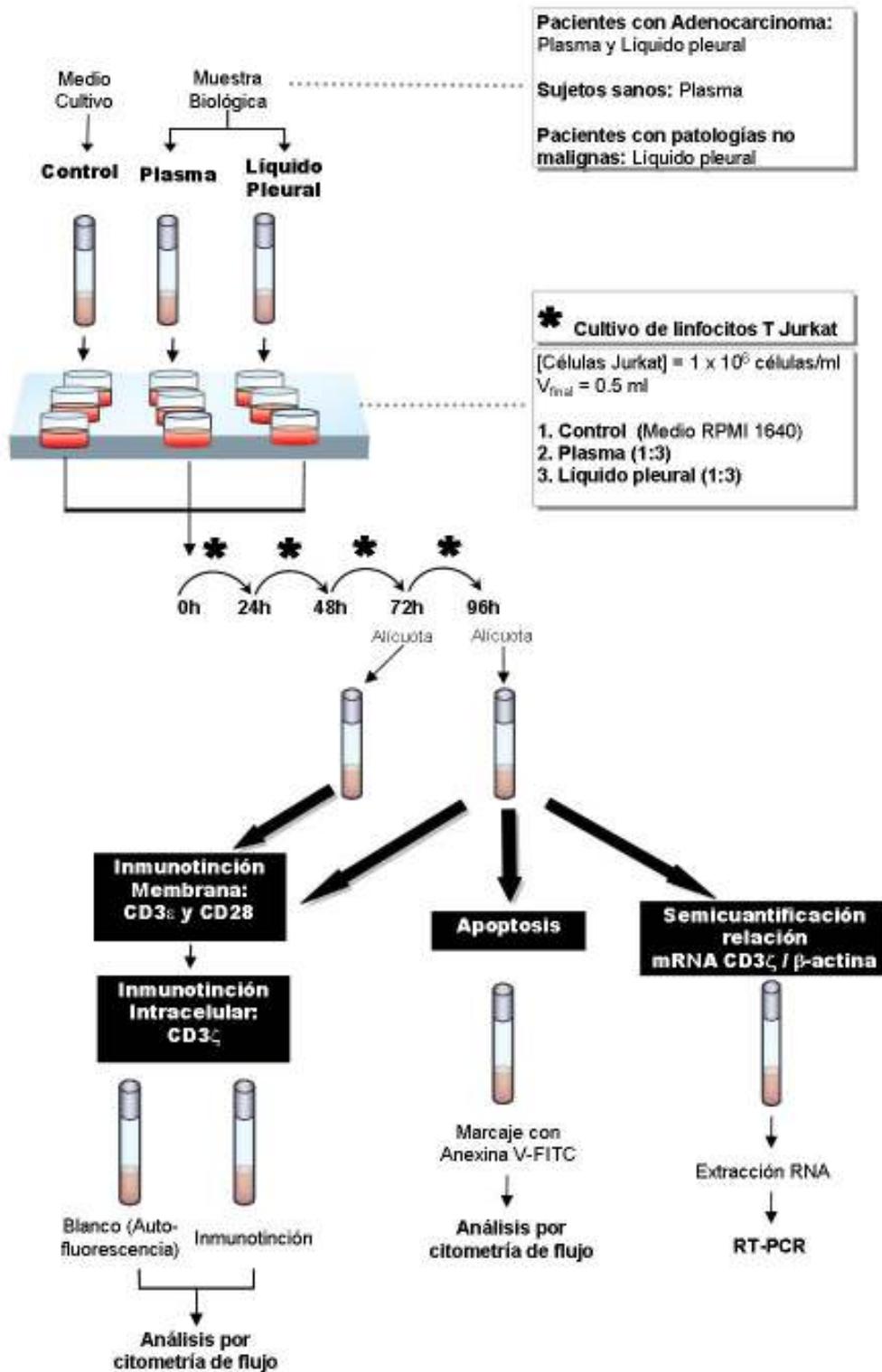
OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del plasma y del líquido pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar en la expresión de CD3 ζ , CD3 ϵ y CD28, y en la inducción de apoptosis en los linfocitos T Jurkat.

Objetivos particulares

- Evaluar el nivel de expresión de CD3 ζ , CD3 ϵ y CD28 en células T Jurkat tratadas con el plasma o el líquido pleural de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar, mediante citometría de flujo.
- Semicuantificar el mRNA de CD3 ζ , para determinar si la alteración de esta molécula es a nivel de la expresión del transcrito.
- Comparar cada una de las determinaciones anteriores con células T Jurkat tratadas con plasma de sujetos sanos.
- Comparar cada una de las determinaciones anteriores con células T Jurkat tratadas con el líquido pleural de pacientes con patologías no malignas.
- Determinar el efecto apoptótico del plasma o del líquido pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar en los linfocitos T Jurkat, por medio de marcaje con Anexina V y yoduro de propidio.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



MATERIALES Y MÉTODOS

Línea celular

Como modelo de linfocitos T humanos se utilizó la línea celular Jurkat clona E6.1 obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Esta línea celular expresa Fas y es susceptible a la apoptosis vía FasL; además se ha empleado en el estudio de las subunidades del complejo CD3. ^(56,67)

Los linfocitos T Jurkat se mantuvieron en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado, 100U/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomina (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA). Las células se incubaron en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C. En cada experimento se utilizaron células en la fase exponencial de su crecimiento con una viabilidad mayor al 90%. Las células Jurkat estuvieron libres de contaminación por micoplasma.

Muestras biológicas

Se utilizaron muestras de plasma y de líquido pleural provenientes de 15 pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar admitidos en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (México, D.F.). Los pacientes tenían un promedio de edad de 60 años (intervalo de 35 a 85 años) con estadios avanzados del cáncer, estadios IIIb (4 pacientes) y IV (11 pacientes). Ningún paciente recibió tratamiento farmacológico previo al estudio. La muestra sanguínea se centrifugó a 1800r.p.m. por 10min y se recuperó el plasma que se mantuvo a -20°C. De manera previa a su uso las muestras biológicas se descongelaron a 37°C, se centrifugaron a 2 000 r.p.m., 10 min a 4°C; se esterilizaron por filtración (membrana de 0.22 µm).

Como controles adicionales se emplearon muestras de plasma provenientes de 12 sujetos sanos y muestras de líquido pleural de 6 pacientes con patologías no malignas (que comprendían EPOC, cardiopatías y neumonías). A estas muestras biológicas se les aplicó el mismo procedimiento que a las muestras provenientes de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar.

Efecto del plasma y del líquido pleural de pacientes con adenocarcinoma en los linfocitos T Jurkat

Las células Jurkat se cultivaron a una densidad de 1×10^6 células/ml en placas de 48 pozos, y para cada condición (control, plasma y líquido pleural) se mantuvo un volumen final de 0.5 ml por pozo. La dilución del plasma y del líquido pleural fue 1:3 con respecto al medio de cultivo.

Después de 24h de incubación, las células se recuperaron por agitación mecánica suave, y lavaron con medio RPMI 1640 por centrifugación a 1 500 r.p.m. 5 min. El paquete celular se resuspendió en medio RPMI 1640 fresco, las células se contaron por medio de una cámara de Neubauer, se determinó su viabilidad mediante tinción vital con azul de tripano y las células se ajustaron a las mismas condiciones de experimentación iniciales (se mantuvieron las mismas proporciones de las muestras biológicas y de densidad celular). Cada 24h se repitió este procedimiento para mantener la misma densidad de células T Jurkat y retirar el medio de cultivo metabolizado. El tiempo total de incubación de los cultivos fue de 96 h.

Detección de apoptosis por el marcaje con Anexina V-FITC

Después de finalizar el tiempo de incubación (96h), 1×10^5 células provenientes de cada condición (control, plasma y líquido pleural), se lavaron con medio de cultivo y resuspendieron con 100 μ l de amortiguador HEPES 1M pH 7.4 con Anexina V-FITC (Santa Cruz Biotechnology, CA) a una concentración de 2.0 μ l / 10^6 células y yoduro de propidio (PI, [Sigma Chemical Co.]), a una concentración de 10 μ g/ml. Las células se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente (TA) en oscuridad, posteriormente se adicionaron a cada tubo 300 μ l de amortiguador HEPES.

La suspensión 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 la detección de Anexina V-FITC unida a la PS extracelular y un filtro > 600 nm para la detección de yoduro de propidio intercalado al DNA.

Con los datos adquiridos de cada condición de cultivo se realizaron gráficos de dispersión de tamaño contra granularidad, se obtuvo la región de análisis en donde la población era homogénea, y con base en esta primera región de análisis, se realizó un segundo gráfico de dispersión de la marca de Anexina V-FITC contra PI para obtener las distintas poblaciones:

células viables, células apoptóticas y las células necróticas. El análisis cuantitativo se efectuó con el programa CELL Quest.

Inmunotinción de CD3 ζ , CD3 ϵ y CD28 en linfocitos T Jurkat

A las 72h y 96h de incubación, de cada cultivo se tomó una alícuota conteniendo 1×10^5 células viables en la cual se realizaron las inmunotinciones de CD3 ζ , CD3 ϵ y de CD28. Las células Jurkat restantes fueron empleadas para la extracción de RNA.

De la suspensión celular obtenida de cada condición de cultivo, 1×10^5 células se resuspendieron en 200 μ l de amortiguador PBS adicionado con BSA al 1% y Na₃N al 0.1%, pH 7.4 (amortiguador de tinción). A la suspensión celular se le adicionaron 5.0 μ l del mAb anti CD28-CyChrome clona CD28.2 (PharMingen, USA) y 2.0 μ l del mAb anti CD3 ϵ -FITC clona UCHT-1 (Sigma Co.), se incubaron a 4°C durante 30 min en oscuridad.

Posterior a la incubación las células se lavaron y centrifugaron, el paquete celular se resuspendió en 300 μ l de disolución fijadora de para-formaldehído 1X (Becton Dickinson, CA), las células se incubaron 10 min, a TA en oscuridad. Después de lavar se incubaron con 100 μ l de disolución permeabilizadora 1X (Becton Dickinson, CA) 10 min a TA en oscuridad, se lavaron nuevamente y resuspendieron en 200 μ l de amortiguador de tinción. Tras la adición de 2.5 μ l de mAb anti CD3 ζ -PE clona 2H2D9 (TIA-2) adquirido de Coulter, Marseille, se incubó por 30 min a TA en oscuridad. Se realizó un último lavado, después del cual las células se resuspendieron en 300 μ l de disolución fijadora.

Se adquirieron por lo menos 5 000 eventos en el citómetro de flujo (FACScalibur, Becton Dickinson, CA). Las muestras provenientes de los cultivos de 72 y 96h se analizaron conjuntamente, a fin de mantener la misma sensibilidad y ruido del equipo y hacer equiparables los resultados.

El análisis cuantitativo se realizó con el programa WinMDI 2.8 empleando gráficos de tamaño y dispersión para obtener la región de análisis con la población homogénea. Con base en esta primera región, se realizaron histogramas del número de eventos con respecto a la intensidad de fluorescencia debida a uno de los fluorocromos. Con los histogramas anteriores se obtuvo tanto la intensidad media de fluorescencia (MFI) de las células Jurkat blanco como de las células Jurkat teñidas.

Para cada condición (control, plasma y líquido pleural), se obtuvo la diferencia de la intensidad media de fluorescencia (Δ MFI) entre las células teñidas y la autofluorescencia, empleando la siguiente fórmula: Δ MFI = (MFI células T Jurkat teñidas) - (MFI autofluorescencia de las células T Jurkat). El calcular la Δ MFI fue necesario debido a que las células T Jurkat tratadas con las muestras biológicas cambiaban su granularidad y su autofluorescencia comparadas con las células T Jurkat control.

El efecto de las muestras biológicas sobre las células T Jurkat se comparó con las células incubadas en medio de cultivo (control). Para analizar los cambios en la expresión de las moléculas se realizó una prueba ANOVA pareada; y se aplicó la prueba de Tukey para determinar las diferencias estadísticas entre los diversos tratamientos empleando el programa estadístico (Prism 3.0). Los valores de alfa menores a 0.05 fueron considerados como estadísticamente significativos.

Extracción de RNA total

Se extrajo el RNA total de los linfocitos T Jurkat (5×10^5 a 8×10^5 células), provenientes de cada tratamiento y se lavaron con amortiguador PBS, pH 7.4, estéril y se resuspendieron en 500 μ l de TRIzol Reagent (Invitrogen, CA) almacenándose a -80°C . La extracción del RNA se realizó por el método de fenol-cloroformo: a cada tubo se adicionó 100 μ l de cloroformo, se mezcló vigorosamente y se centrifugó a 12 000 r.p.m., 15 min a 4°C . Se obtuvieron dos fases: la acuosa y la orgánica, la cual se desechó. A la fase acuosa se adicionó 250 μ l de isopropanol para precipitar el RNA, se incubó a TA por 10 min. Posteriormente se centrifugó a 12 000 r.p.m. por 10 min a 4°C , y el paquete se lavó con 500 μ l de etanol al 70%.

El RNA se centrifugó a 12 000 r.p.m., 5 min a 4°C y se dejó secar a TA. El RNA obtenido se disolvió en 50 μ l de agua tratada con dietil pirocarbonato ($\text{H}_2\text{O}/\text{DEPC}$) a 70°C . Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Se cuantificó el RNA por espectrofotometría (espectrofotómetro, Unicam UV 300), para lo cual se determinó la absorbancia a dos longitudes de onda: 280nm (para proteínas) y a 260nm (para ácidos nucleicos), obteniéndose la concentración total de nucleótidos y su pureza.

Retrotranscripción (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de CD3 ζ y β -actina

A partir del RNA total se sintetizó el cDNA por RT, el paso inicial de ésta consistió en la siguiente mezcla de reacción: 1 μ g de RNA de las muestras, en presencia de oligo dT y H₂O/DEPC, se incubó a 70°C durante 10 min. A continuación, a cada muestra se le adicionó 8.25 μ l de la siguiente mezcla de reacción: Amortiguador RT 5X, DTT 2 mM, desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) 0.5 mM, 25 U de inhibidor de RNasa y 200 U de reverso transcriptasa (Gibco BRL). La síntesis de cDNA consistió en un ciclo a 22°C, 10min y la extensión a 37°C por 60 min.

Con el cDNA sintetizado se amplificó el gen de la cadena ζ con 6.5 μ M de cada uno de los siguientes primers sentido/antisentido: 5'-TCT GAG GGA AAG GAC AAG ATG-3' / 5'-GAG TGG TGA AAT CCC CTG GC-3', cuyo transcrito tiene un peso de 535 pb. El amortiguador de reacción de la PCR (24 μ l) constó de amortiguador PCR 10X, MgCl₂ 2mM, dNTPs 0.2 mM, 1.0 μ l del cDNA obtenido en la RT, 1.25 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen, CA).

La amplificación de CD3 ζ implicó la desnaturalización a 94°C por 1 min, la alineación a 60°C por 1.5 min, y la extensión a 72°C por 1.5 min. Este proceso se repitió por un total de 30 ciclos, con una extensión final a 72°C durante 5min.

La amplificación del gen de β -actina se realizó con las mismas condiciones de reacción que las empleadas para la amplificación de CD3 ζ , excepto por la concentración de MgCl₂ (1mM) y de los siguientes primers sentido/antisentido: 5'- GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG - 3' / 5'- GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG - 3', utilizándose una concentración 2 μ M de cada primer y obteniéndose un transcrito de 214pb.

Alícuotas de 10 μ l de la solución del producto amplificado fueron separadas mediante electroforesis de DNA y el producto fue visualizado en un gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio. La banda del producto amplificado fue analizada por densitometría con el equipo ChemiDoc XRS (BIORAD).

La semicuantificación del mRNA de CD3 ζ , se realizó mediante el siguiente índice: (Intensidad de fluorescencia del transcrito del mRNA de CD3 ζ) / (Intensidad de fluorescencia del transcrito del mRNA de β -actina) para cada una de las condiciones de cultivo de las células T Jurkat (control, plasma y líquido pleural).

RESULTADOS

Detección de apoptosis en los linfocitos T Jurkat cultivados con plasma o con líquido pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar

Para el análisis de la apoptosis de las células T Jurkat, cultivadas con las distintas muestras biológicas, se realizaron gráficos de dispersión de la granularidad en función del tamaño; con base en este gráfico se creó una región de análisis (R1) en donde la población celular era homogénea, ver Fig 12. A partir de la R1 se realizó un segundo gráfico de dispersión de la marca de Anexina V-FITC contra PI, este gráfico se dividió en cuatro cuadrantes, y se obtuvieron cuatro subpoblaciones de las células T Jurkat: células viables Anexina V⁻ / PI⁻ (cuadrante inferior izquierdo), células apoptóticas Anexina V⁺ / PI⁻ (cuadrante inferior derecho), las células en apoptosis tardía-necrosis Anexina V⁺ / PI⁺ (cuadrante superior derecho) y por último las células necróticas Anexina V⁻ / PI⁺ en el cuadrante superior izquierdo. Con el fin de descartar si en el plasma se encuentran factores que inducen la apoptosis de las células T Jurkat bajo las condiciones experimentales empleadas, se estudió el plasma de sujetos sanos. En la Figura 12 se muestra un ejemplo representativo.

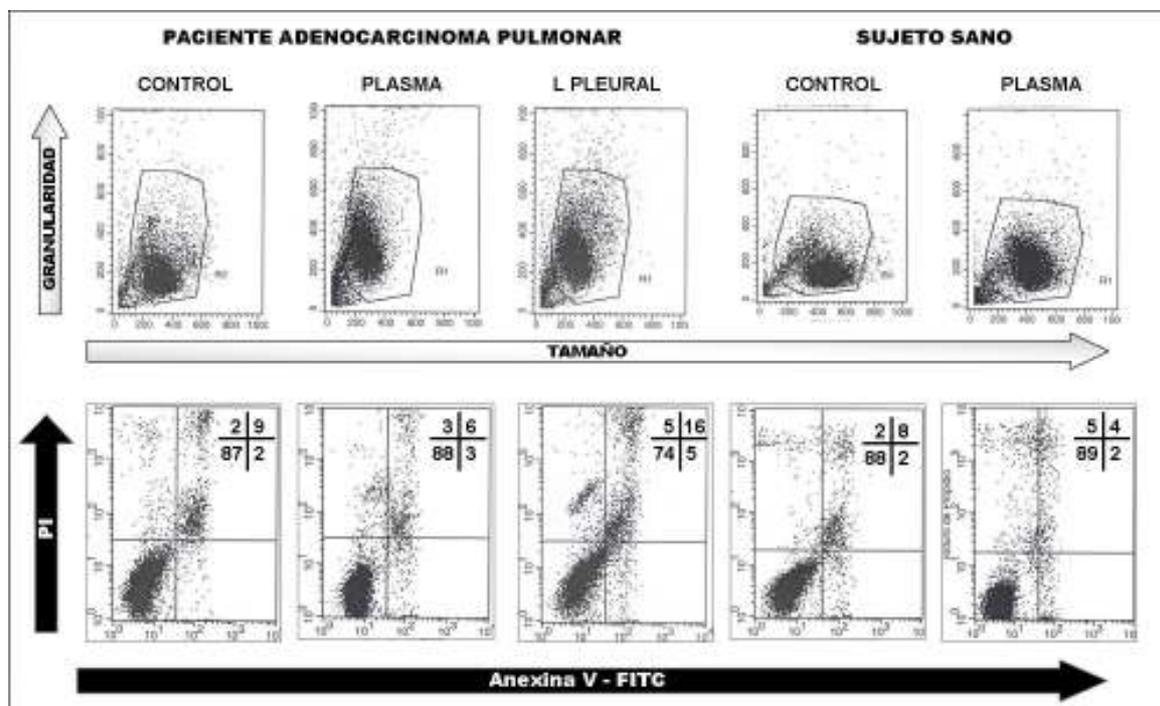


Fig 12. Evaluación de la apoptosis en linfocitos T Jurkat tratados con las muestras biológicas. En el panel superior se muestran los gráficos de dispersión del tamaño contra la granularidad de las células tratadas por 96h con: el plasma o el líquido pleural de un paciente con adenocarcinoma pulmonar, y el plasma de un sujeto sano. En el panel inferior se representan las gráficas de Anexina V vs PI y los porcentajes de células viables, células apoptóticas, células en apoptosis tardía-necrosis y las células necróticas para cada una de las condiciones de cultivo.

RESULTADOS

Los linfocitos T Jurkat cultivados en presencia de las muestras provenientes de un paciente con adenocarcinoma no presentaron apoptosis, en cambio se detectó necrosis a las 96h de incubación (Fig 12). Por lo cual se realizó una cinética para la evaluación de la apoptosis, para descartar que la necrosis fuera producto de los cuerpos apoptóticos no fagocitados en el medio de cultivo; o determinar si estas muestras biológicas inducían directamente la necrosis de las células.

La Fig 13 muestra la cinética de apoptosis en la que se comparó el porcentaje de células Jurkat viables, apoptóticas y necróticas tratadas con líquido pleural de un paciente con adenocarcinoma y su respectivo control. El líquido pleural indujo la disminución de la viabilidad celular y el aumento de células en necrosis, pero no en apoptosis.

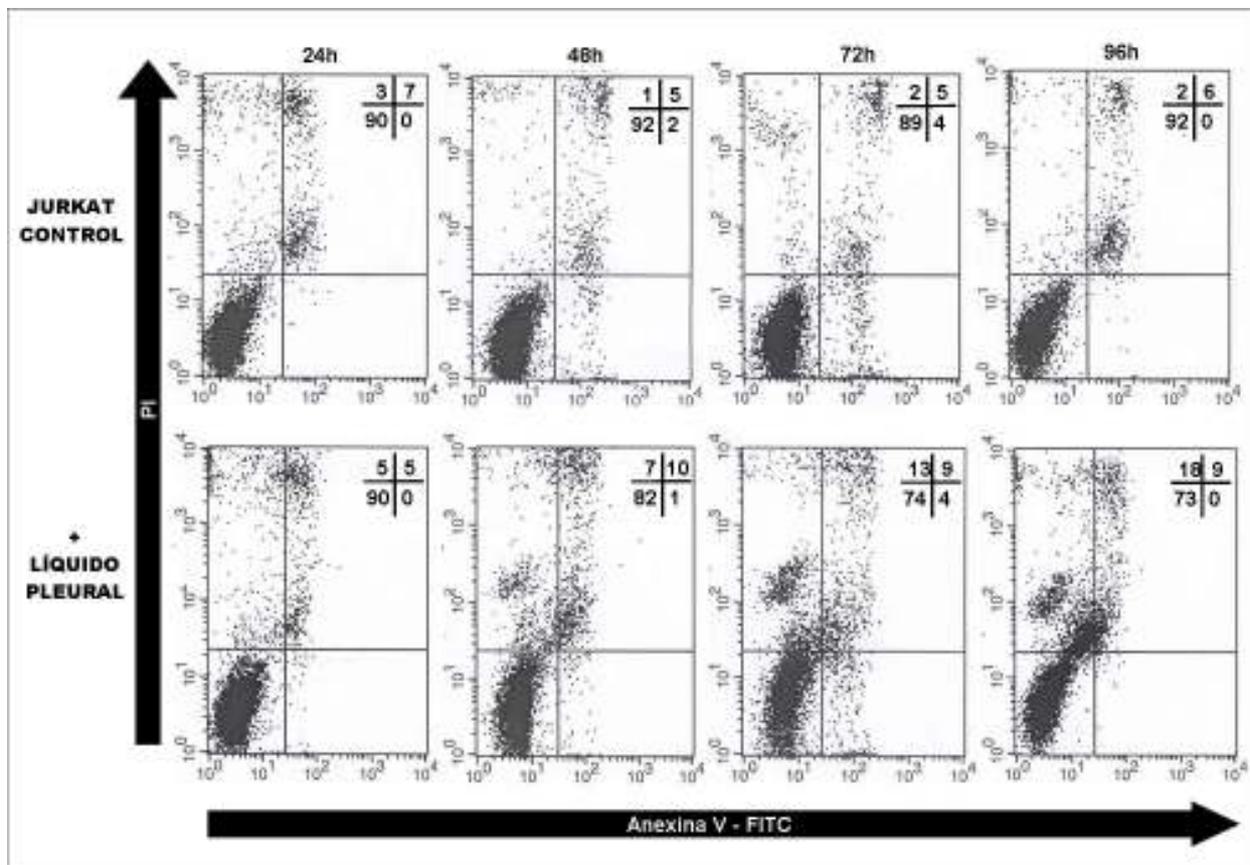


Fig 13. Cinética de la evaluación de la apoptosis en linfocitos T Jurkat cultivados con el líquido pleural de un paciente con adenocarcinoma pulmonar. En el panel superior se muestran los gráficos de dispersión (Anexina V-FITC vs PI) de las células Jurkat control y en el panel inferior las células cultivadas con el líquido pleural de un paciente con adenocarcinoma pulmonar. Debido a que la necrosis se incrementó a partir de las 48 h de incubación en los linfocitos T Jurkat cultivados con el líquido pleural, para el análisis de la viabilidad, se consideró al total de células PI⁺ como células necróticas.

En la figura 14 se muestra el incremento del porcentaje de las células T Jurkat en necrosis, cultivadas en presencia del líquido pleural de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar. Por otro lado, el plasma de los sujetos sanos no provocó ningún tipo de muerte celular en las condiciones experimentales empleadas, lo que permite descartar la presencia de factores solubles inductores de muerte en el plasma de individuos sanos.

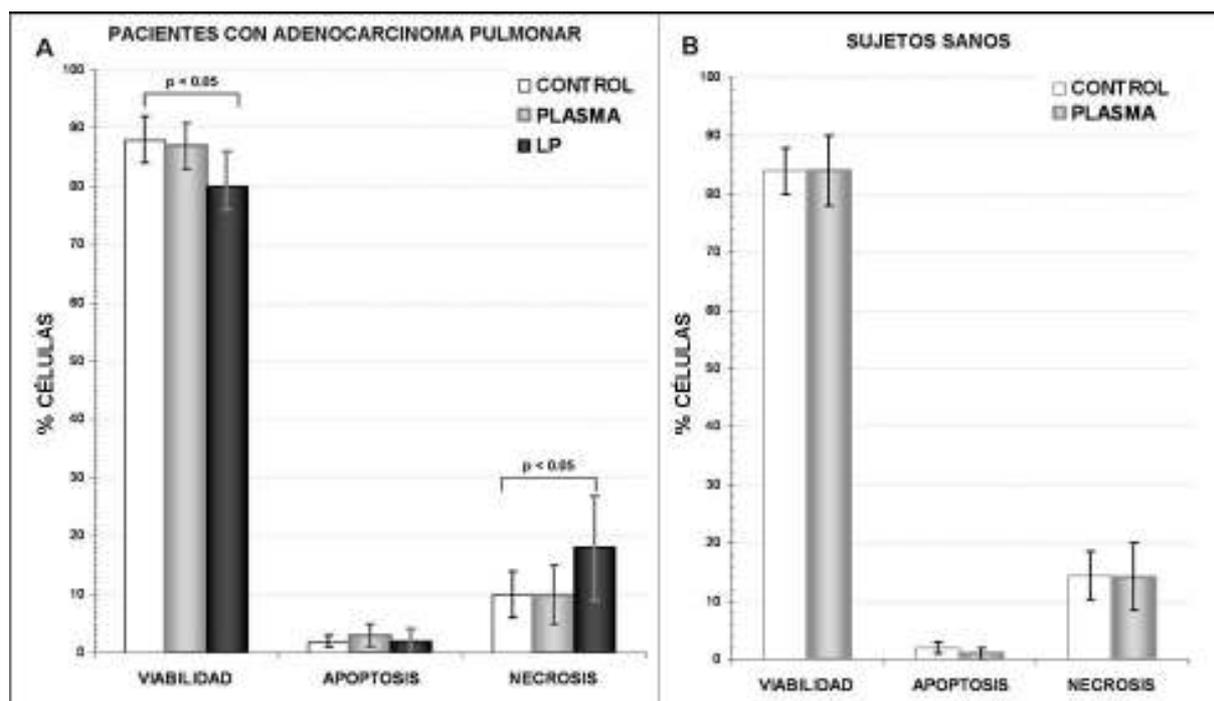


Fig 14. Inducción de muerte celular en los linfocitos T Jurkat con el líquido pleural de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar. Las células T Jurkat fueron cultivadas por 96h con: A) el plasma o el líquido pleural provenientes de pacientes con adenocarcinoma pulmonar y B) el plasma de los sujetos sanos. La viabilidad celular se evaluó por la tinción con Anexina V y PI (Ver Materiales y Métodos).

Expresión de CD3ζ en los linfocitos T Jurkat tratados con el plasma o el líquido pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar

Para determinar que la metodología empleada (citometría de flujo) detecta cambios en la expresión de las moléculas en estudio, los linfocitos T Jurkat fueron tratados con FasL recombinante (rh), como control positivo. En la Fig 15 se observa la disminución en la expresión de las moléculas CD3ζ, CD3ε y CD28 en las células T Jurkat tratadas con FasLrh comparadas con las células control.

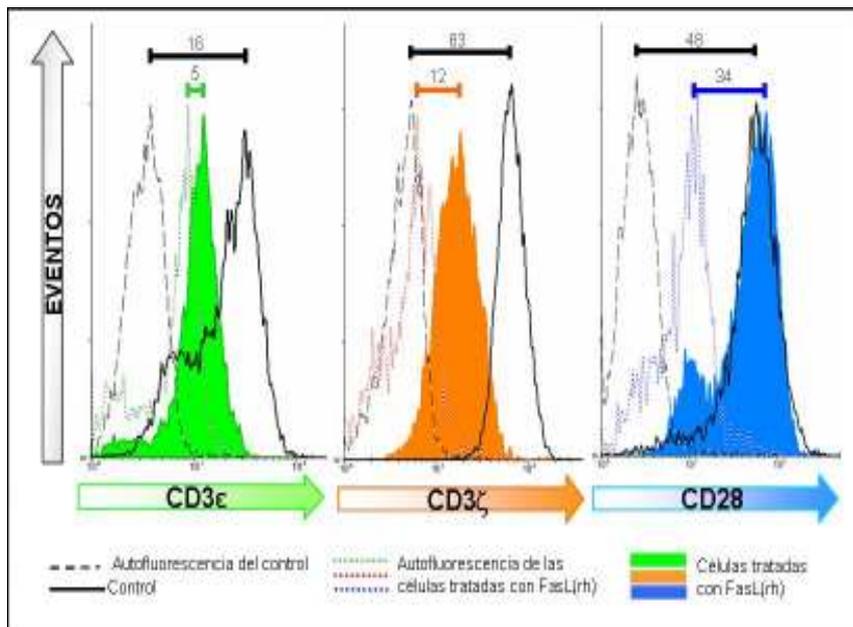


Fig 15. Determinación de la Δ MFI de las moléculas CD3 ζ , CD3 ϵ y CD28 en los linfocitos T Jurkat tratados con FasLrh. La disminución en el valor de la Δ MFI se debe a la reducción de la expresión de las moléculas. Al reducirse la expresión de la molécula en estudio hay menor fluorescencia y por lo tanto un menor valor de Δ MFI

Posteriormente se evaluó el efecto del plasma como del líquido pleural de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar en la expresión de CD3 ζ en los linfocitos T Jurkat. En la Fig. 16 se muestra un ejemplo representativo de la disminución de la expresión de la cadena ζ a las 96h de cultivo con el plasma o el líquido pleural de un paciente con adenocarcinoma pulmonar.

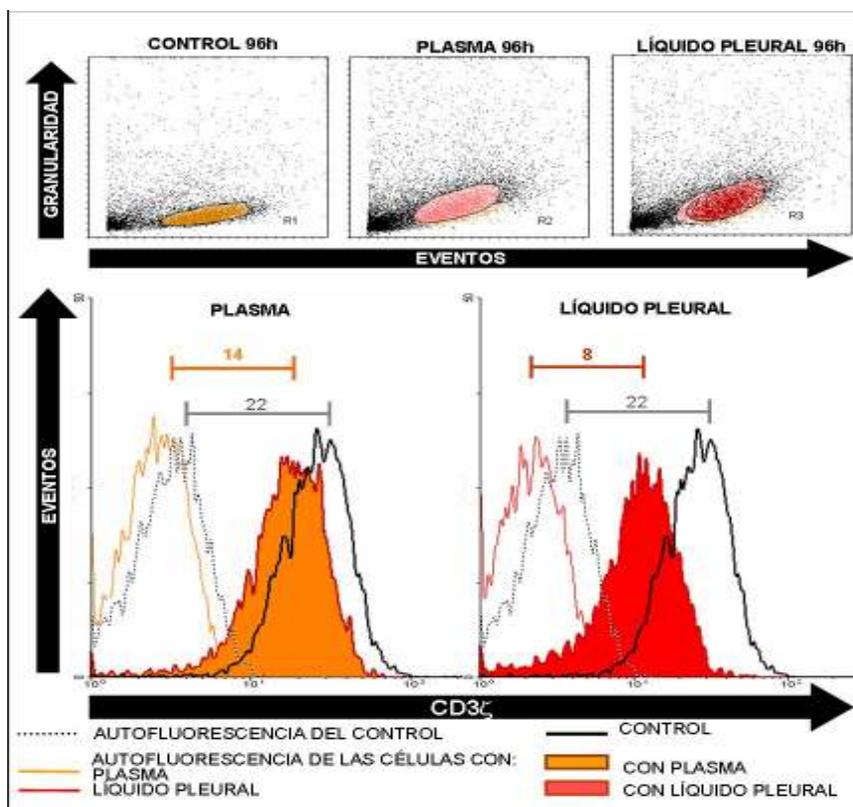


Fig 16. Disminución de la expresión de CD3 ζ en linfocitos T Jurkat cultivados por 96h con plasma y líquido pleural. Se obtuvieron diferentes regiones de análisis en donde las células se distribuían homogéneamente (panel superior). Con base a cada región se realizaron los histogramas (panel inferior) en donde se muestra la disminución de la expresión de CD3 ζ en los linfocitos T cultivados tanto con el plasma, como con el líquido pleural de un paciente con adenocarcinoma pulmonar. La disminución en la expresión de CD3 ζ se muestra con una menor Δ MFI. El valor de la Δ MF se muestra en cada condición.

La expresión de CD3 ζ disminuyó significativamente en los linfocitos T Jurkat cultivados tanto a las 72 como a las 96h con el líquido pleural de los pacientes con adenocarcinoma. Esta reducción también se observó en las células cultivadas durante 96h con el plasma de estos pacientes. En cambio, la expresión de CD3 ζ no se alteró con el plasma derivado de los sujetos sanos, ni con el líquido pleural de los pacientes con patologías no malignas, ver Fig 17. Esto indica que hay factores solubles, tanto en el líquido pleural como en el plasma de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar, que disminuyen la expresión de la cadena ζ . La reducción en la expresión de CD3 ζ fue mayor en las células T Jurkat tratadas con el líquido pleural comparada con la inducida con el plasma ($p < 0.01$). Además el fenómeno fue observado a partir de las 72h en las células tratadas con el líquido pleural de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar.

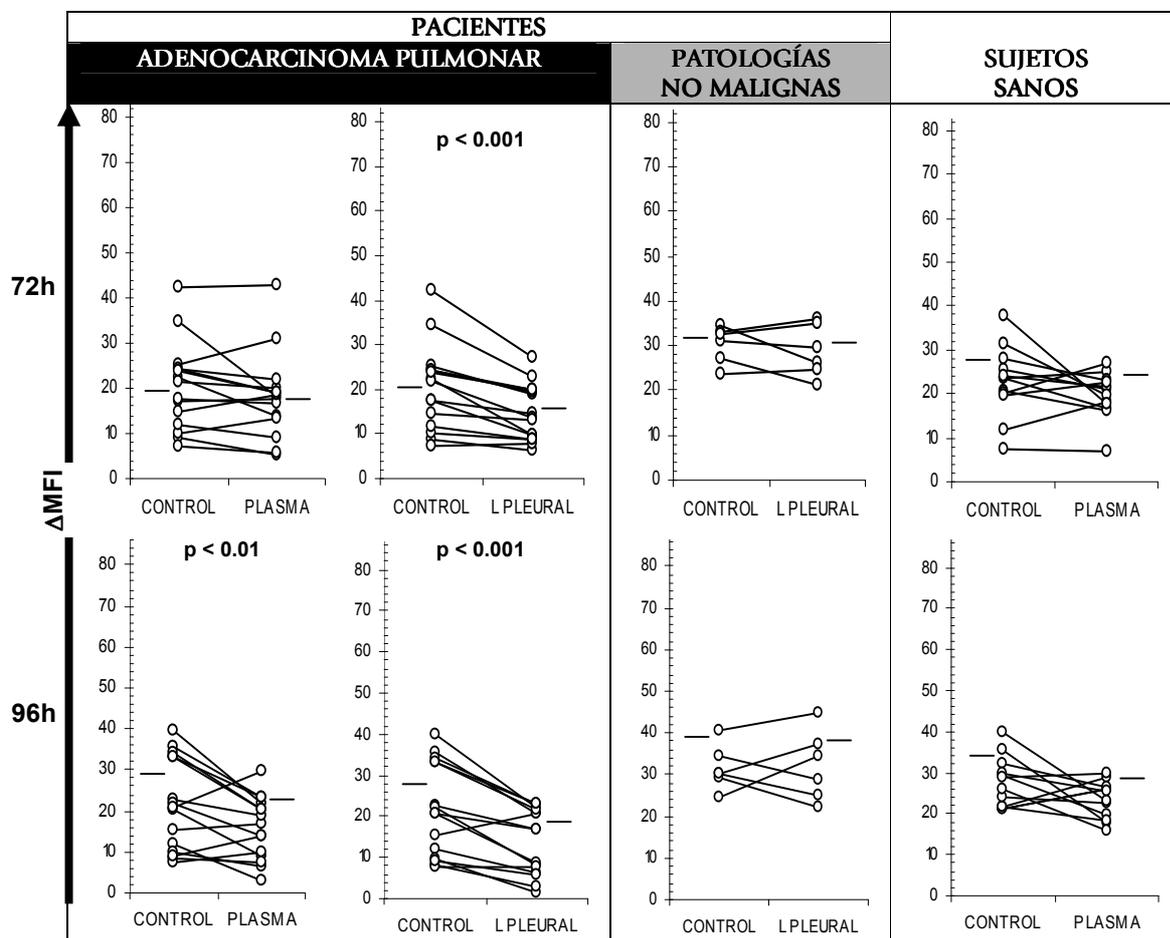


Fig 17. Análisis de la expresión de CD3 ζ -PE de las muestras biológicas con su respectivo control. Se representan los gráficos de correlación (mediante una línea continua) entre el Δ MFI de los linfocitos T Jurkat control y la Δ MFI de los linfocitos T tratados con el plasma o con el líquido pleural. Las líneas horizontales en cada gráfico representan el valor promedio de la Δ MFI para cada tratamiento.

Expresión de CD3ε en los linfocitos T Jurkat tratados con el plasma o el líquido pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar

También se evaluó si la expresión de CD3ε se alteraba por el tratamiento con las muestras provenientes de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar. Esta determinación se realizó de la misma manera que la empleada para CD3ζ descrita anteriormente.

El plasma de los sujetos sanos, el líquido pleural de los pacientes con patologías no malignas y las muestras biológicas de los pacientes con adenocarcinoma, no modificaron significativamente la expresión de CD3ε en los linfocitos T Jurkat. Ver Fig 18

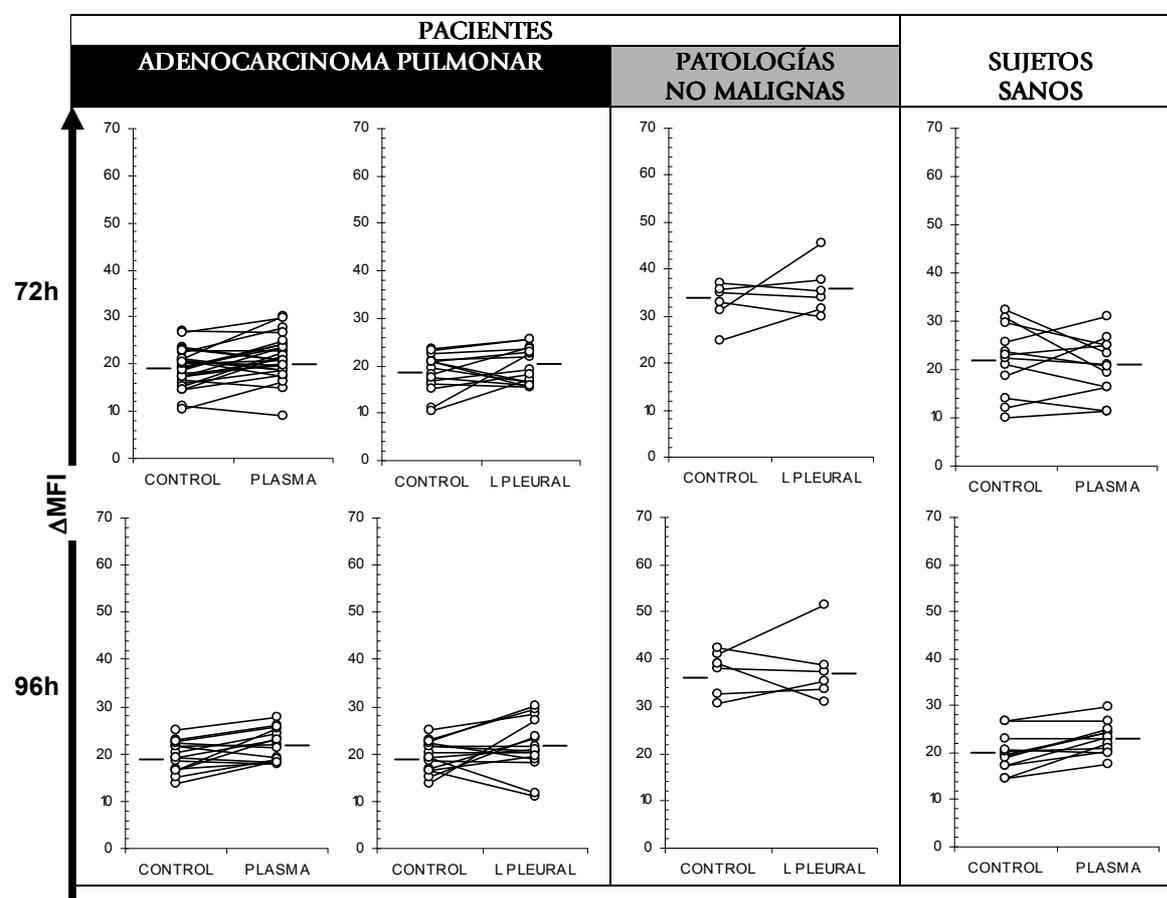


Fig 18. Análisis de la expresión de CD3ε-FITC. Se muestra el ΔMFI en los linfocitos T Jurkat tratados con las distintas muestras biológicas, comparada con su correspondiente control a las 72 y 96h de incubación. Las líneas horizontales en cada gráfico representan el valor promedio de la ΔMFI para cada tratamiento.

Expresión de CD28 en los linfocitos T Jurkat tratados con el plasma o el líquido pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar

La expresión de la molécula coestimuladora CD28 no se alteró con las muestras de plasma de los sujetos sanos, con el líquido pleural de patologías no malignas ni con las muestras biológicas de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar. En las células T Jurkat tratadas con el líquido pleural de los pacientes con patologías no malignas, se indujo una reducción no significativa de la expresión de CD28 a las 72 y 96h ($p=0.056$). Ver Fig 19

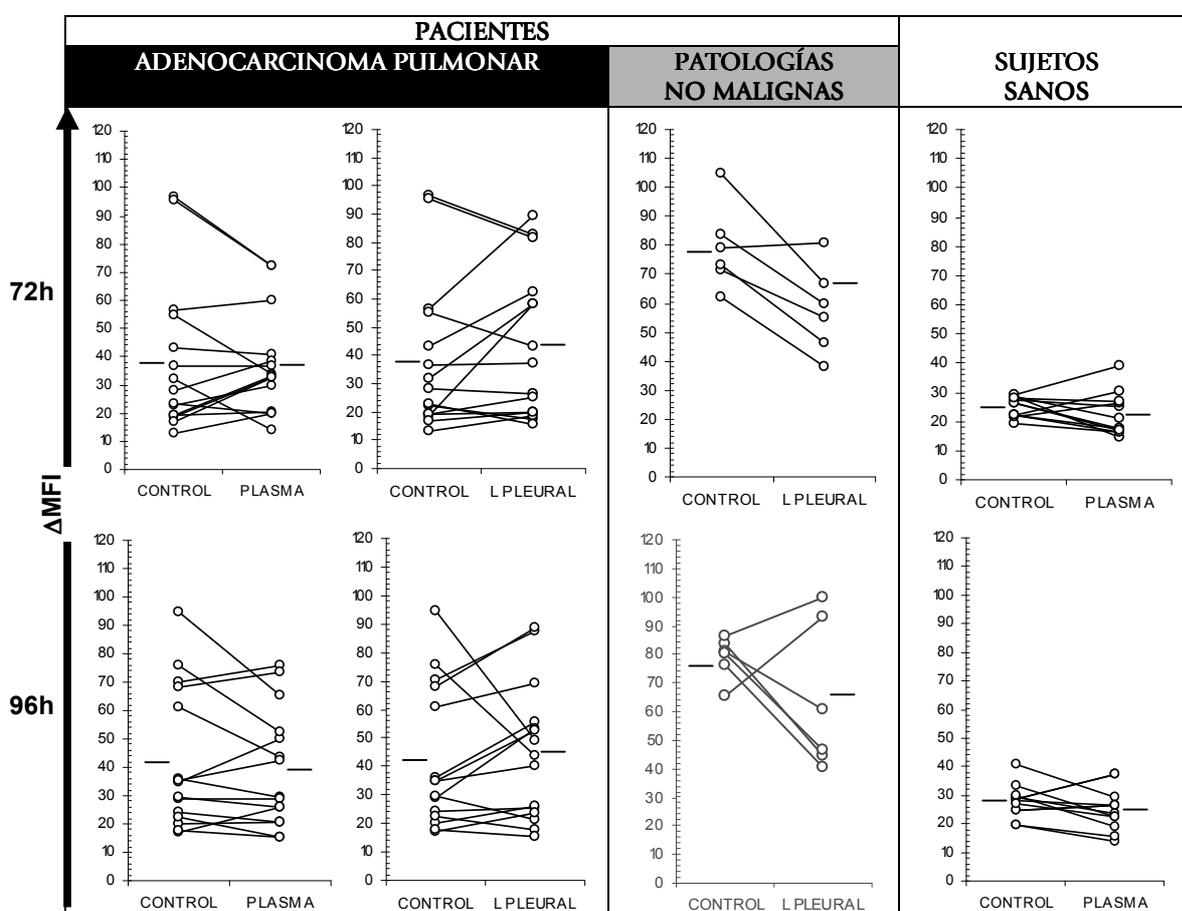


Fig 19. Análisis de la expresión de CD28-CyChrome. Las líneas horizontales en cada gráfico representan el valor promedio de la Δ MFI para cada tratamiento.

Semicuantificación del mRNA de CD3 ζ

Una vez determinada la reducción en la expresión de CD3 ζ a nivel de proteína, se procedió a identificar si dicha disminución era consecuencia del decremento en la expresión de su mRNA.

La semicuantificación del mRNA de CD3 ζ se realizó mediante la comparación de la expresión de este mensajero y la expresión del mRNA del gen constitutivo para β -actina (Ver Materiales y Métodos).

En la figura 20 se muestra un ejemplo de la expresión del mRNA de CD3 ζ de los linfocitos T Jurkat cultivados con: líquido pleural de un paciente con adenocarcinoma pulmonar, líquido pleural proveniente de un paciente con una patología no maligna, y además con plasma de un sujeto sano.

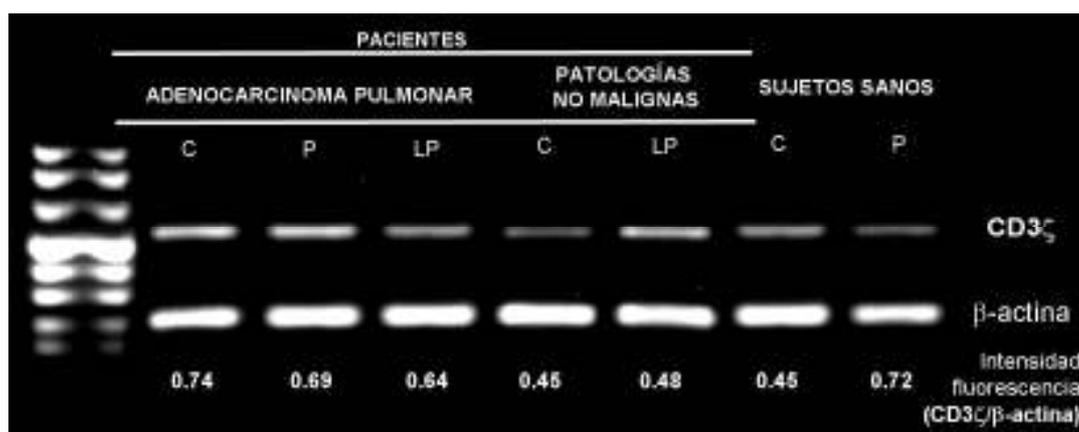


Fig 20. Ejemplo de la semicuantificación del mRNA de CD3 ζ . Se muestra el producto de la RT-PCR del mRNA de CD3 ζ y del mRNA de β -actina (control de expresión), de los linfocitos T Jurkat cultivados con diversas muestras biológicas. En cada caso se presentan las distintas condiciones de cultivo: control (C), células cultivadas con plasma (P) o a las células cultivadas con líquido pleural (LP). Se observa que la expresión del mRNA de CD3 ζ (relación CD3 ζ / β -actina) no se alteró en los linfocitos T Jurkat tratados con las distintas muestras biológicas comparándolas con su respectivo control. (MP = Marcador de peso molecular)

En general, la expresión del mRNA de CD3 ζ no se alteró en los linfocitos T Jurkat tratados con: a) el líquido pleural o con el plasma de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar, b) el plasma de los voluntarios sanos, c) el líquido pleural de los pacientes con patologías no malignas.

La expresión del mRNA de CD3 ζ disminuyó en los linfocitos T Jurkat tratados con el líquido pleural como con el plasma de sólo dos pacientes con adenocarcinoma pulmonar. No obstante,

esta disminución no fue estadísticamente significativa, ver Fig 21. Esto se debe a que en la mayoría de los casos la expresión del mRNA para CD3 ζ no se modificó en los linfocitos T Jurkat cultivados con las muestras de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar. Lo que indica que en dichas muestras biológicas diversos factores solubles disminuyen la expresión de la cadena CD3 ζ , exclusivamente a nivel de proteína.

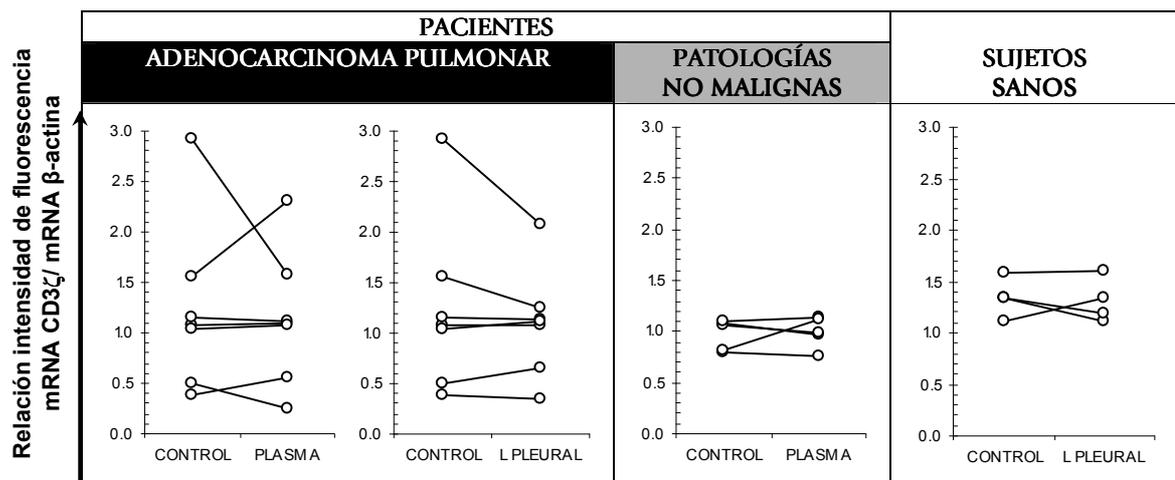


Fig 21. Semicuantificación del mRNA de CD3 ζ en los linfocitos T Jurkat cultivados con el plasma y líquido pleural de los pacientes con adenocarcinoma. En las células T Jurkat cultivadas con el plasma y las cultivadas con el líquido pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar, no se redujo la expresión del mRNA de CD3 ζ .

La cuantificación de la expresión de CD3 ζ mediante citometría de flujo tiene la limitante de que, al realizarse la inmunotinción intracelular de esta cadena no se sabe su localización, así que no es posible conocer si se trata sólo de la disminución de la expresión por defectos en su transporte o por un incremento de su degradación. Para poder discernir entre estas dos contingencias podrían realizarse estudios de inmunofluorescencia como los realizados por Valitutti S. y cols, ⁽⁷³⁾ en donde se aprecia tanto los niveles de expresión de CD3 ζ y su localización celular, es decir a nivel de membrana o al interior, acumulada en el citoplasma o en los lisosomas.

Otro mecanismo asociado con la disminución de la expresión de CD3 ζ es el estrés oxidativo de los linfocitos T. El estrés oxidativo juega un importante papel en la respuesta defectuosa del linfocito T observada en varios tipos de cáncer, así como en enfermedades no malignas (artritis reumatoide, lepra y VIH). ^(74,75)

El estrés oxidativo es generado por el desequilibrio entre la producción de los radicales libres especialmente las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad antioxidante de la célula, ⁽⁷⁶⁾ además puede ser provocado por factores solubles presentes en las muestras biológicas de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar o por su inducción a nivel intracelular en las células T Jurkat. Los radicales y sus subproductos son liberados durante la inflamación crónica por los macrófagos y por los neutrófilos infiltrantes al tumor. ⁽⁶⁸⁾ Los ROS son capaces de alterar el equilibrio redox en la célula afectando la actividad del retículo endoplásmico, ⁽⁷⁶⁾ que se traduciría en alteraciones en el ensamblaje de CD3 ζ con CD3 ϵ .

En este orden de ideas, la reducción de la expresión de CD3 ζ por efecto de los radicales libres se ha observado en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*, pero se desconoce el mecanismo molecular. ⁽⁷⁴⁾ Un interesante estudio realizado por Cemerski y cols. ⁽⁷⁴⁾, muestra que la reducción de la expresión de CD3 ζ se debe a su alteración conformacional. Los autores determinaron la expresión de CD3 ζ mediante la citometría de flujo en linfocitos T provenientes de pacientes con artritis reumatoide cultivados bajo estrés oxidativo (inducida por neutrófilos), encontrando que la expresión de CD3 ζ disminuyó; sin embargo dicha proteína se expresó en niveles normales al utilizar un mAb anti-CD3 ζ , que reconoce un epítipo no conformacional empleado en Western Blot. Esta modificación estructural provoca que CD3 ζ no sea reconocida por el Ab anti-CD3 ζ (TIA-2), que es el mismo utilizado en este trabajo de Tesis.

La alteración conformacional de CD3 ζ es producto de la capacidad de los radicales libres de modificar químicamente a las proteínas al oxidar enlaces sulfhídrido (mediante los cuales se une el homodímero de CD3 ζ), y como consecuencia se modifica su configuración espacial y le resta rigidez y estabilidad. Así se sugiere que hay niveles normales de CD3 ζ en las células T, pero el

cambio conformacional en esta cadena impide que sea detectada eficientemente mediante citometría de flujo y que aparentemente disminuya su expresión, lo cual es consistente con la expresión normal del mRNA para CD3 ζ .⁽⁷⁴⁾

Por otro lado, los resultados de esta tesis son contrarios al antecedente directo en el cual, en los linfocitos T Jurkat cocultivados con líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar, disminuye la expresión de CD3 ϵ y CD28 aunque no CD3 ζ . (Prado-García y cols. resultados no publicados) Las discrepancias entre estos dos trabajos pudieran deberse a que el efecto en la expresión de CD3 ϵ y CD28 se deba exclusivamente por el contacto directo célula T Jurkat–célula tumoral.

Otra posibilidad por la cual no se observó la disminución *in vitro* de CD3 ζ en los cocultivos de las células Jurkat con las células tumorales, es que las líneas tumorales hayan perdido la capacidad de secretar factores que *in vivo* eran capaces de liberar al microambiente tumoral; no obstante dichos factores si pueden encontrarse en las muestras biológicas de los pacientes con adenocarcinoma y ser capaces de reducir la expresión de CD3 ζ , lo que se observó en este trabajo de Tesis. También es posible que los factores solubles causantes de dicha disminución sean liberados por otras células (por ejemplo del sistema inmune) como consecuencia de la presencia del tumor.

Recapitulando, el líquido pleural y el plasma de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar disminuyen la expresión o alteran la conformación de CD3 ζ . Esta disfunción es mediada por factores solubles que son secretados o inducidos *in vivo* por las células tumorales del cáncer pulmonar en contra de los linfocitos T. Estos factores solubles se encuentran más concentrados en el líquido pleural y son capaces de difundir y pasar a la circulación periférica. Ver Fig 22.

Finalmente, la reducción de la expresión de CD3 ζ puede ser un mecanismo de evasión del cáncer pulmonar, cuyo significado biológico es la disfunción del linfocito T para eliminar y controlar el progreso del tumor. Esto puede explicar en parte la inmunosupresión observada en los pacientes con cáncer. Aunque falta aclarar si la reducción de CD3 ζ es causada directamente por los factores solubles secretados por el tumor, o es provocada por la inflamación crónica presente en los pacientes con cáncer pulmonar.

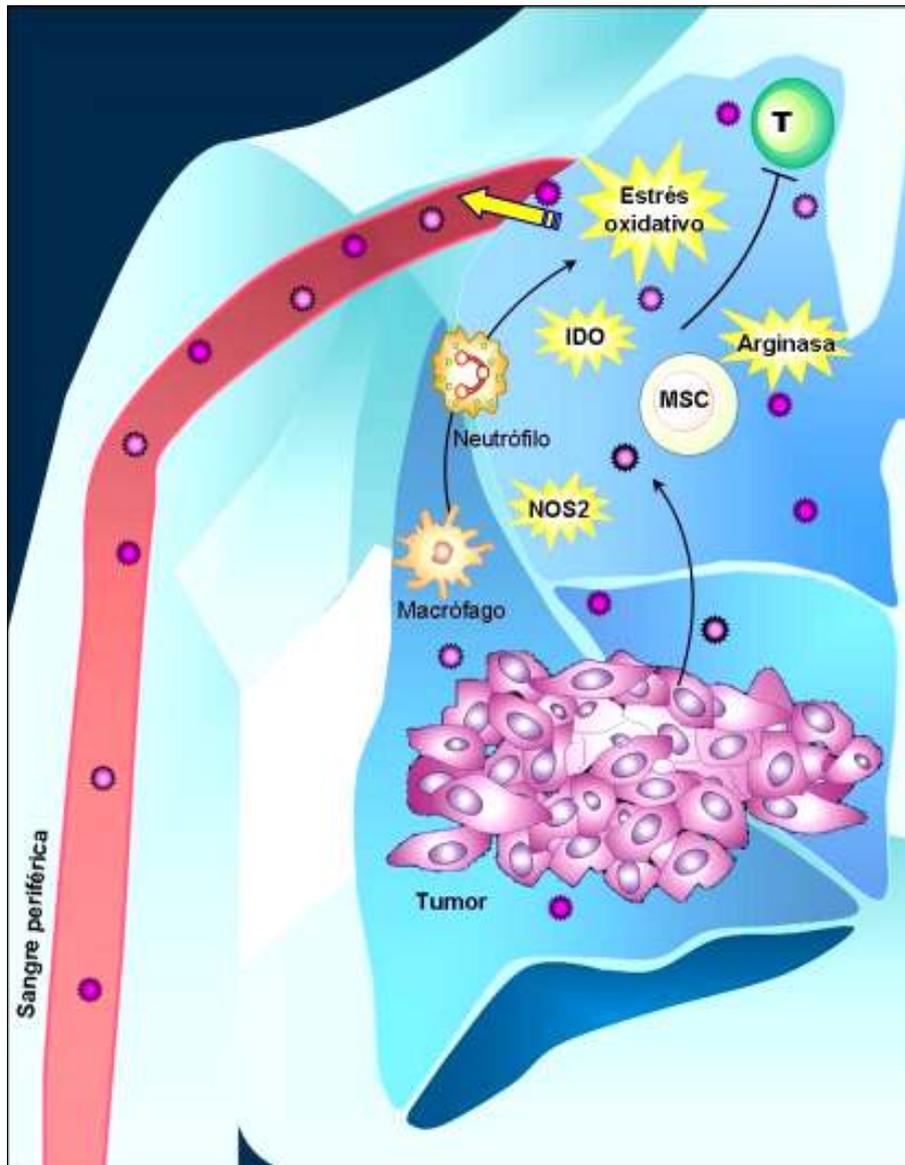


Fig 22. Posibles factores involucrados en la disminución de la expresión de CD3 ζ en los linfocitos T Jurkat tratados con el líquido pleural o el plasma de pacientes con adenocarcinoma pulmonar. Las alteraciones a nivel de la proteína CD3 ζ puede deberse a la inducción del estrés oxidativo en la célula T Jurkat, provocado por factores secretados por los macrófagos o neutrófilos infiltrantes al tumor. En algunos casos, la disminución de la expresión de CD3 ζ fue consecuencia de la reducción de la expresión de su mRNA, probablemente por concentraciones bajas de L-arginina o de triptofano ocasionadas por la acción de enzimas secretadas o inducidas por el tumor. En general, los factores solubles involucrados en la reducción de CD3 ζ tanto a nivel de proteína como de su mensajero, son capaces de difundir a sangre periférica.

DISCUSIÓN

Como se mencionó en los Antecedentes existen distintos mecanismos de evasión tumoral en contra de la respuesta inmune antitumoral. Las células tumorales provocan la disfunción del linfocito T por dos tipos de contacto: el primero implica la interacción directa célula tumoral-célula T, el segundo tipo de contacto es indirecto mediado por factores solubles secretados por la célula neoplásica; o bien que ésta estimule a las células del estroma u otras células del sistema inmune para producirlos. Considerando que dichos factores solubles se presentan en el ambiente tumoral y a nivel sistémico, se planteó la hipótesis de trabajo que consistía en probar si el líquido pleural o el plasma de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar inducen la apoptosis en los linfocitos T Jurkat, y si reducen la expresión de CD3 ζ , CD3 ϵ y de CD28 como posibles mecanismos de evasión del cáncer pulmonar.

Evaluación de la apoptosis en los linfocitos T Jurkat cultivados con el plasma y el líquido pleural de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar.

Se ha demostrado que el plasma de pacientes con cáncer induce apoptosis en los linfocitos T, siendo FasL el principal ligando de muerte que podría encontrarse en su forma soluble o contenido en microvesículas. ^(47,48)

Los resultados muestran que el plasma y el líquido pleural de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar no indujeron apoptosis en los linfocitos T Jurkat, ya que no se incrementó el porcentaje de apoptosis obtenido con el marcaje con Anexina V. No obstante que éstas células T son sensibles a la apoptosis mediada por FasL y a que la metodología empleada fue muy semejante a la reportada en otros trabajos en donde el líquido ascítico de pacientes con cáncer de ovario y el plasma de pacientes con carcinoma oral, indujeron apoptosis en las células T Jurkat. ^(56, 48)

La ausencia de apoptosis en los linfocitos T Jurkat es consistente con la observación de que el cocultivo directo de líneas de adenocarcinoma pulmonar no induce la apoptosis en las células T Jurkat. ⁽⁶⁷⁾ Dichas líneas tumorales no expresaron FasL a nivel de proteína, ni a nivel del mensajero. ^(Comunicación personal) Tampoco es probable que las células tumorales estén induciendo la liberación de factores inductores de apoptosis en otras células.

Con base en estos resultados, no se sustenta la hipótesis del contraataque tumoral mediado por FasL como un mecanismo de evasión del cáncer pulmonar. No obstante, la reducción de la viabilidad por un ligero aumento en el porcentaje de necrosis, exclusivamente en los linfocitos T

Jurkat cultivados con el líquido pleural de los pacientes con adenocarcinoma, muestra que hay factores solubles en el ambiente tumoral que causan directamente la necrosis de las células T Jurkat, sin inducir apoptosis.

Por otro lado, el plasma de los sujetos sanos y el líquido pleural de los pacientes con patologías no malignas, no alteraron la viabilidad de los linfocitos T. Debido a esto es posible afirmar que las condiciones de cultivo fueron apropiadas, se descartó la presencia de factores que indujeran la muerte en los linfocitos T Jurkat, o que se indujera la necrosis por el cambio de la concentración de nutrientes, al cultivarse a las células T Jurkat con muestras biológicas y que no estuvieran en la condición óptima de cultivo *in vitro*.

Cabe resaltar que el aumento en el porcentaje de necrosis no es un artificio por los cuerpos apoptóticos no fagocitados en el medio de cultivo, ni se trata de restos celulares, como se comprobó mediante la evaluación de la apoptosis a distintos tiempos.

Aunque el porcentaje de necrosis no fue mayor al 15%, la necrosis *in vivo* pudiera causar que los linfocitos T no eliminen a las células cancerosas en el cáncer pulmonar, ya que *in vivo* los factores causantes de la necrosis se encontrarían aun más concentrados, así que posiblemente se induzca mayor necrosis en los linfocitos T, lo que sería factible de reconocer por estudios de inmunohistoquímica en cortes histológicos de adenocarcinoma pulmonar.

La inducción de necrosis en los linfocitos T por la célula tumoral como un posible mecanismo de evasión tumoral no ha sido estudiada, pero sí se ha relacionado la necrosis y la inflamación crónica como fenómenos determinantes, tanto en la disfunción de las células T como en la progresión del tumor. ^(21, 68, 69) En el cáncer pulmonar hay inflamación crónica en el pulmón, inclusive en estadios tempranos, ⁽⁹⁾ lo que causa la acumulación de los factores solubles producidos durante la inflamación crónica (por ejemplo, las especies reactivas de oxígeno), y cabe la posibilidad de que éstos sean los causantes de la necrosis de los linfocitos T Jurkat al provocar una falla bioenergética y una pérdida rápida de la integridad de la membrana plasmática. ⁽²⁹⁾

Un factor que permite afirmar que la necrosis es provocada por la presencia del tumor, es el hecho de que los líquidos pleurales no malignos no modificaron la viabilidad de los linfocitos T Jurkat. Una diferencia muy marcada entre los líquidos pleurales malignos y los no malignos utilizados en este estudio, es que los primeros tienen factores secretados por las células tumorales y los productos de la inflamación crónica, por el contrario los líquidos pleurales no malignos no contienen estos factores por ser benignos y provenientes de una inflamación aguda. Si bien esta es sólo una especulación de lo que puede suceder *in vivo*, una perspectiva del trabajo sería evaluar la necrosis de los linfocitos T como un mecanismo de evasión tumoral o determinar si es una consecuencia inherente a la respuesta inmune antitumoral.

Efecto del plasma y del líquido pleural de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar en la expresión de CD3 ζ , CD3 ϵ y CD28 en los linfocitos T Jurkat

La disminución de la expresión de CD3 ζ en los linfocitos T es un importante mecanismo de evasión tumoral y puede llevarse a cabo en el cáncer pulmonar debido a que los resultados muestran que se redujo la expresión de la proteína CD3 ζ .

Aún cuando disminuyó la expresión de CD3 ζ , no se modificó la expresión de la subunidad CD3 ϵ . Tampoco se alteró la expresión de la molécula coestimuladora CD28 en los linfocitos T Jurkat cultivados con las muestras biológicas de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar. Muy poco se sabe de la regulación de la expresión de CD28, pero se ha comprobado que es regulada negativamente en los linfocitos T en apoptosis, ⁽⁵⁹⁾ al igual que CD3 ζ y CD3 ϵ . ^(17, 21) Dado que no se observó apoptosis en las células T Jurkat, no debería de alterarse la expresión de CD28. Esto justifica el hecho de que CD28 no modificó su expresión.

La expresión reducida de CD3 ζ en las células T Jurkat tratadas con el líquido pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar a los dos tiempos de incubación (72 y 96h) y con el plasma sólo a las 96h, puede deberse a que dichos factores se encuentren más concentrados en el líquido pleural. Es posible que estos factores puedan difundir a la sangre periférica y, a pesar de estar en una menor concentración que en el líquido pleural, son capaces de reducir la expresión de CD3 ζ en los linfocitos T Jurkat, y posiblemente alteran sistémicamente la función de las células T *in vivo*.

Como se mencionó, en sólo dos muestras (una de plasma y otra de líquido pleural) provenientes de distintos pacientes con adenocarcinoma pulmonar disminuyó la expresión del mRNA de CD3 ζ . Es probable que en estas muestras biológicas se encuentre la arginasa. Dicha enzima reduce la concentración de L-arginina que provoca la inestabilidad del mRNA de CD3 ζ y la disminución consecuente de la síntesis de la proteína CD3 ζ . Otra enzima que puede estar causando el mismo efecto que la arginasa, es la NOS₂. ⁽⁷⁰⁾ La expresión del mRNA para CD3 ζ también puede disminuir por concentraciones bajas de triptofano por la acción de laIDO que es expresada en las células tumorales de NSCLC, ⁽⁷¹⁾ y por ende también puede encontrarse en alguna de las muestras biológicas de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar.

Posibles mecanismos responsables de la reducción de la expresión de CD3 ζ en los linfocitos T Jurkat

Al no disminuir la expresión del mRNA para CD3 ζ , los principales mecanismos implicados en la reducción de la expresión de la proteína estarían actuando a nivel post-transcripcional. Se sabe que

los mecanismos de la reducción de la expresión de la proteína CD3 ζ operan principalmente a nivel de su síntesis, transporte, ensamblaje en la membrana citoplasmática, o en su degradación.

(22)

Con base en los resultados, se puede sugerir que el mecanismo implicado en la reducción de la expresión de CD3 ζ es específico, ya que no se modificó la expresión de CD3 ϵ y de CD28. Esto permite descartar que dicha reducción en la expresión de la cadena ζ sea un artificio como ha sugerido Deakin, (72) quien postula que la disminución de la cadena ζ (en modelos *in vitro*), se debe a la acción de proteasas liberadas durante el procesamiento de las muestras biológicas. Dado que la acción de estas proteasas extracelulares es inespecífica, hubiera provocado la disminución de CD3 ϵ y CD28 que se localizan en la superficie de la células T Jurkat y no de CD3 ζ que tiene un dominio extracelular corto y que se encuentra casi en su totalidad en la parte intracelular de la célula, por lo que no es accesible a la degradación de proteasas extracelulares.

Dentro de los mecanismos que reducen la expresión de CD3 ζ a nivel de proteína se encuentra la inducción de apoptosis. Sin embargo, dicho fenómeno no se observó en las células T Jurkat tratadas con las muestras de los pacientes, por lo que otros mecanismos pueden estar involucrados. Aunque se presentó la necrosis, en un porcentaje bajo de las células T tratadas con el líquido pleural de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar; dicho fenómeno no se presentó con el plasma de los mismos, y la disminución de la expresión de CD3 ζ se observó en los dos tipos de muestras biológicas; por lo tanto la necrosis y la disminución de CD3 ζ en los linfocitos T Jurkat no están relacionadas.

La expresión de CD3 ζ también disminuye por incremento de su degradación en linfocitos T activados crónicamente, no obstante en este trabajo no se activaron a las células T Jurkat con anti-CD3, así que la activación crónica no explica la reducción de CD3 ζ observada en los resultados.

Al reducirse la expresión de CD3 ζ se esperaba que concomitantemente disminuyera la expresión de CD3 ϵ debido a que no sólo se co-expresan, sino a que la cadena ζ es la subunidad limitante del ensamblaje, del transporte y de la expresión de las otras subunidades del complejo CD3. (22)

Debido a que la expresión de CD3 ϵ no se modificó, existen dos posibilidades: primero, que la disminución de CD3 ζ se deba por un aumento de su degradación lisosomal, y que el recambio de CD3 ϵ sea más lento que el de CD3 ζ . En segundo lugar, se ha reportado que en la ausencia de CD3 ζ se activan moléculas "subrogadas" que estabilizan a CD3 ϵ en la superficie de la célula T y por lo tanto se expresa en niveles normales. (21) Estas dos posibilidades explicarían porque no hay alteraciones en la expresión de CD3 ϵ , pero sí de CD3 ζ .

La cuantificación de la expresión de CD3 ζ mediante citometría de flujo tiene la limitante de que, al realizarse la inmunotinción intracelular de esta cadena no se sabe su localización, así que no es posible conocer si se trata sólo de la disminución de la expresión por defectos en su transporte o por un incremento de su degradación. Para poder discernir entre estas dos contingencias podrían realizarse estudios de inmunofluorescencia como los realizados por Valitutti S. y cols, ⁽⁷³⁾ en donde se aprecia tanto los niveles de expresión de CD3 ζ y su localización celular, es decir a nivel de membrana o al interior, acumulada en el citoplasma o en los lisosomas.

Otro mecanismo asociado con la disminución de la expresión de CD3 ζ es el estrés oxidativo de los linfocitos T. El estrés oxidativo juega un importante papel en la respuesta defectuosa del linfocito T observada en varios tipos de cáncer, así como en enfermedades no malignas (artritis reumatoide, lepra y VIH). ^(74,75)

El estrés oxidativo es generado por el desequilibrio entre la producción de los radicales libres especialmente las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad antioxidante de la célula, ⁽⁷⁶⁾ además puede ser provocado por factores solubles presentes en las muestras biológicas de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar o por su inducción a nivel intracelular en las células T Jurkat. Los radicales y sus subproductos son liberados durante la inflamación crónica por los macrófagos y por los neutrófilos infiltrantes al tumor. ⁽⁶⁸⁾ Los ROS son capaces de alterar el equilibrio redox en la célula afectando la actividad del retículo endoplásmico, ⁽⁷⁶⁾ que se traduciría en alteraciones en el ensamblaje de CD3 ζ con CD3 ϵ .

En este orden de ideas, la reducción de la expresión de CD3 ζ por efecto de los radicales libres se ha observado en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*, pero se desconoce el mecanismo molecular. ⁽⁷⁴⁾ Un interesante estudio realizado por Cemerski y cols. ⁽⁷⁴⁾, muestra que la reducción de la expresión de CD3 ζ se debe a su alteración conformacional. Los autores determinaron la expresión de CD3 ζ mediante la citometría de flujo en linfocitos T provenientes de pacientes con artritis reumatoide cultivados bajo estrés oxidativo (inducida por neutrófilos), encontrando que la expresión de CD3 ζ disminuyó; sin embargo dicha proteína se expresó en niveles normales al utilizar un mAAb anti-CD3 ζ , que reconoce un epítipo no conformacional empleado en Western Blot. Esta modificación estructural provoca que CD3 ζ no sea reconocida por el Ab anti-CD3 ζ (TIA-2), que es el mismo utilizado en este trabajo de Tesis.

La alteración conformacional de CD3 ζ es producto de la capacidad de los radicales libres de modificar químicamente a las proteínas al oxidar enlaces sulfhídrido (mediante los cuales se une el homodímero de CD3 ζ), y como consecuencia se modifica su configuración espacial y le resta rigidez y estabilidad. Así se sugiere que hay niveles normales de CD3 ζ en las células T, pero el

cambio conformacional en esta cadena impide que sea detectada eficientemente mediante citometría de flujo y que aparentemente disminuya su expresión, lo cual es consistente con la expresión normal del mRNA para CD3 ζ .⁽⁷⁴⁾

Por otro lado, los resultados de esta tesis son contrarios al antecedente directo en el cual, en los linfocitos T Jurkat cocultivados con líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar, disminuye la expresión de CD3 ϵ y CD28 aunque no CD3 ζ . (Prado-García y cols. resultados no publicados) Las discrepancias entre estos dos trabajos pudieran deberse a que el efecto en la expresión de CD3 ϵ y CD28 se deba exclusivamente por el contacto directo célula T Jurkat–célula tumoral.

Otra posibilidad por la cual no se observó la disminución *in vitro* de CD3 ζ en los cocultivos de las células Jurkat con las células tumorales, es que las líneas tumorales hayan perdido la capacidad de secretar factores que *in vivo* eran capaces de liberar al microambiente tumoral; no obstante dichos factores si pueden encontrarse en las muestras biológicas de los pacientes con adenocarcinoma y ser capaces de reducir la expresión de CD3 ζ , lo que se observó en este trabajo de Tesis. También es posible que los factores solubles causantes de dicha disminución sean liberados por otras células (por ejemplo del sistema inmune) como consecuencia de la presencia del tumor.

Recapitulando, el líquido pleural y el plasma de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar disminuyen la expresión o alteran la conformación de CD3 ζ . Esta disfunción es mediada por factores solubles que son secretados o inducidos *in vivo* por las células tumorales del cáncer pulmonar en contra de los linfocitos T. Estos factores solubles se encuentran más concentrados en el líquido pleural y son capaces de difundir y pasar a la circulación periférica. Ver Fig 22.

Finalmente, la reducción de la expresión de CD3 ζ puede ser un mecanismo de evasión del cáncer pulmonar, cuyo significado biológico es la disfunción del linfocito T para eliminar y controlar el progreso del tumor. Esto puede explicar en parte la inmunosupresión observada en los pacientes con cáncer. Aunque falta aclarar si la reducción de CD3 ζ es causada directamente por los factores solubles secretados por el tumor, o es provocada por la inflamación crónica presente en los pacientes con cáncer pulmonar.

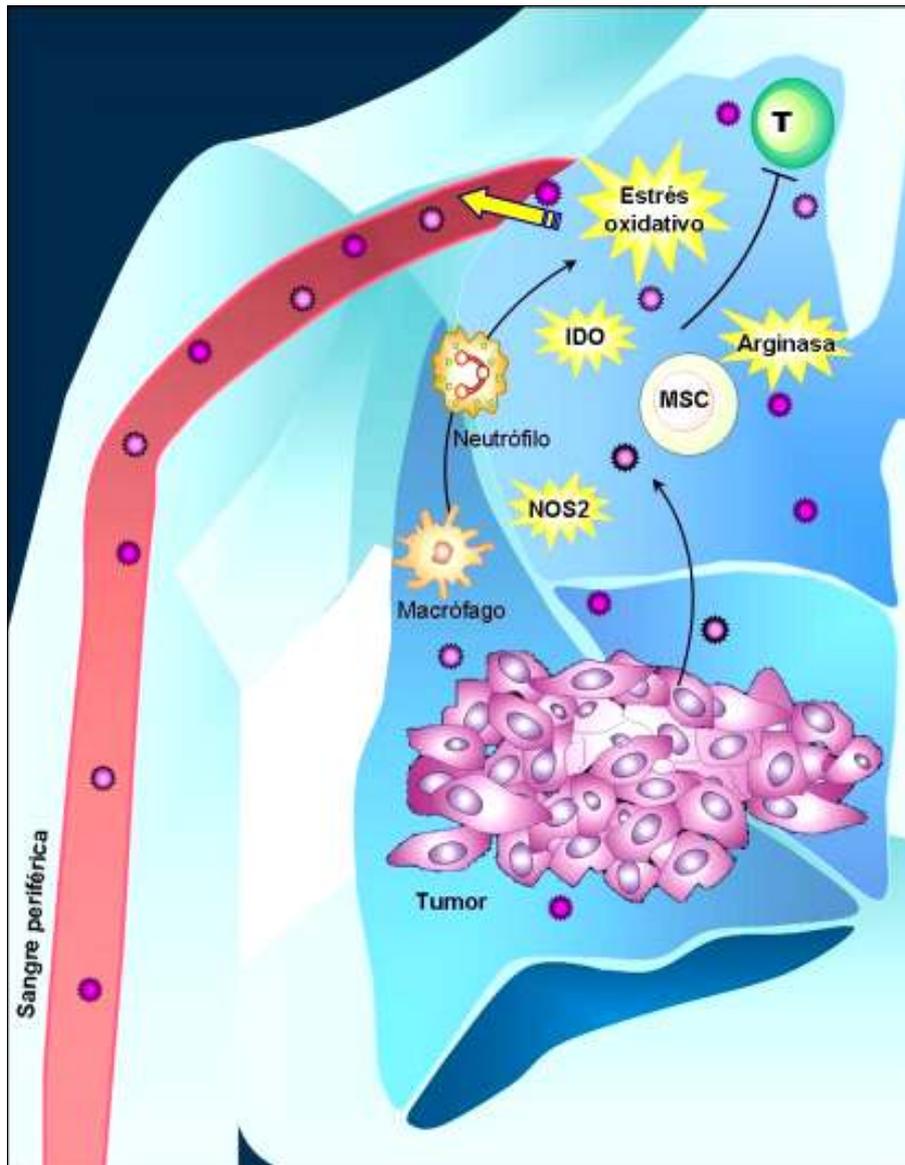


Fig 22. Posibles factores involucrados en la disminución de la expresión de CD3 ζ en los linfocitos T Jurkat tratados con el líquido pleural o el plasma de pacientes con adenocarcinoma pulmonar. Las alteraciones a nivel de la proteína CD3 ζ puede deberse a la inducción del estrés oxidativo en la célula T Jurkat, provocado por factores secretados por los macrófagos o neutrófilos infiltrantes al tumor. En algunos casos, la disminución de la expresión de CD3 ζ fue consecuencia de la reducción de la expresión de su mRNA, probablemente por concentraciones bajas de L-arginina o de triptofano ocasionadas por la acción de enzimas secretadas o inducidas por el tumor. En general, los factores solubles involucrados en la reducción de CD3 ζ tanto a nivel de proteína como de su mensajero, son capaces de difundir a sangre periférica.

CONCLUSIONES

- ▶ El plasma y el líquido pleural de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar, no indujeron apoptosis en los linfocitos T Jurkat.
- ▶ El líquido pleural de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar indujo un ligero aumento en el porcentaje de necrosis en las células T Jurkat cultivadas durante 96h.
- ▶ No hubo cambios en la expresión de CD3 ϵ ni en CD28 en los linfocitos T Jurkat tratados con el plasma o el líquido pleural de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar.
- ▶ Hubo disminución significativa en la expresión de CD3 ζ a nivel de proteína en los linfocitos T Jurkat tratados con el plasma o el líquido pleural de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar.
- ▶ La reducción de la expresión de CD3 ζ en los linfocitos T Jurkat tratados con el líquido pleural de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar fue mayor que en las células T Jurkat cultivadas con el plasma de dichos pacientes, lo que sugiere que los factores responsables de la disminución de CD3 ζ se encuentran más concentrados en el líquido pleural.
- ▶ La expresión del mRNA para CD3 ζ no disminuyó en los linfocitos T Jurkat cultivados con el plasma o el líquido pleural de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar, lo que implica que la disminución de CD3 ζ es a nivel de proteína.

BIBLIOGRAFÍA

1. Igney F. H., Krammer P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer*; 2: 277-288. 2002
2. Lowe S.W., Cepero E., Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature*; 432: 307-315. 2004
3. Vogelstein B., Kinzler K. W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.*; 10 (8):789-799. 2004
4. Hanahan D., Weinberg R.A. The Hallmarks of Cancer. *Cell*; 100: 57-70. 2000
5. Dunn G. P., Old L. J., Schreiber R. D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*; 21: 137-148. 2004
6. Dunn G.P., Old L. J., Schreiber R. D. The three es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.*; 22: 329-60. 2004
7. Minna J. D., Roth J. A., Gazdar A. F. Focus on lung cancer. *Cell*; 1: 49-52. 2002
8. Miller Y. E. Pathogenesis of lung cancer. *Am. J. Res. Cell Mol. Biol.*; 33: 216-223. 2005
9. Cano Valle F., Ibarra Pérez C., Morales Gómez J., y cols. Enfermedades Respiratorias. Temas selectos. Elsevier. España: 141-148. 2006
10. Hussain S. P., Hofseth L. J., Harris C. C. Tumor suppressor genes: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology and human risk assessment. *Lung Cancer*; 34: S7-S15.2001
11. Medford A., Maskell N. Pleural effusion. *J. Postgrad. Med.*; 81: 702-710. 2005
12. de Visser K.E., Eichten A. Coussens L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat. Rev. Cancer*; 6: 24-37. 2006
13. Hong W. K. Tumores del pulmón. *El Manual Merck. Décima edición. Harcourt. España. Sección 6; Cap. 81.* 2004
14. Parkin J.,Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet*; 357: 1777-1789. 2001
15. Dranoff G .Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*; 4:11-22.2004
16. Zitvogel L., Tesniere A., Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat. Rev. Immunol.*; 6: 715 -727. 2006

17. Davis M. M., Chein Y-H. T cell Receptor. Cap 8. Paul W. Fundamental Immunology. 5^a Edition. Lippincott Williams and Williams. USA. 2003
18. Wang S., Chen L. T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family. *Cel. Mol. Immunol.*; 1(1):37-42.2004
19. Acuto O., Michel F. CD28-mediated co-stimulation: a cuantitative support for TCR signalling. *Nat. Rev. Immunol.*; 3: 939-951.2003
20. Bour-Jordan H., Bluestone J. A. CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals. *J. Clin. Immunol.*; 22 (1): 1-7. 2002
21. Baniyash M. TCR ζ -chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nat. Rev. Immunol.*; 4: 675-687. 2004
22. Call M. E., Wucherpfennig K. W. The T cell receptor: critical role of the membrane environment in receptor assembly and function. *Annu. Rev. Immunol.*; 23: 101-25. 2005
23. Sharpe A. H., Abbas A. K. T-Cell costimulation-biology, therapeutic potential, and challenges. *NEJM.*; 355(10): 973-975. 2006
24. Hengartner M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*; 407: 770 -776. 2000
25. Lawen A. Apoptosis an introduction. *BioEssays*; 25(9): 888-896. 2003
26. Rossi D, Gaidano G. Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica*; 88(2): 212-218.2003
27. Danial N. N., Korsmeyer S. J., Cell death: critical control points. *Cell*; 116: 205-219.2004
28. Chanh H. Y., Yang A. Y. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Micro. Mol. Biol. Rev.*; 64 (4): 821-846. 2000
29. Zong WH., Thompson C. B. Necrotic death as a cell fate. *Genes and Dev.*; 20:1-15. 2006
30. Rabinowich H., Reichert T. E., Kashii Y., *et al.* Lymphocyte apoptosis induced by Fas ligand-expressing ovarian carcinoma cells. Implications for altered expression of T cell receptor in tumor-associated lymphocytes. *J. Clin. Invest.*; 101:2579-2588.1998
31. Whiteside T. L. Tumor-induced death of immune cells: its mechanisms and consequences. *Sem. Cancer Biol.*; 12: 43-50. 2002
32. Frey A. B., Monu N. Effector-phase tolerance: another mechanism of how cancer escapes antitumor immune response. *J. Leukoc. Biol.*; 79:652-662. 2006

33. Kim R., Emi M., Tanabe K. Cancer immunosuppression and autoimmune disease: beyond immunosuppressive networks for tumour immunity. *Immunol.*; 119: 254–264. 2006
34. Whiteside T. L., Rabinowich H. The role of Fas/FasL in immunosuppression induced by human tumors. *Cancer Immunol. Immunother.*; 46: 175-184. 1998
35. Whiteside T. L. Down-regulation of ζ -chain expression in T cells: a biomarker of prognosis in cancer? *Cancer Immunol. Immunother.*; 53: 865-878. 2004
36. Bohana-Kashtan O., Civin C.I. Profiling tumor counterattack: do Fas ligand-containing microvesicles reduce anticancer immunity? *Clin. Cancer Res.*; 11: 968-970. 2005
37. Andre F., Scharz N. E., Movassagh M., *et al.* Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet*; 360: 295–305. 2002
38. Bard M. P., Hegmans J. P. Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*; 31: 114-121. 2004
39. Kuss I., Saito T., Johnson J.T., *et al.* Clinical significance of decreased ζ chain expression in peripheral blood lymphocytes of patients with head and neck cancer. *Clin. Cancer Res.*; 5: 329–334. 1999
40. Saito T., Kuss I., Dworacki G., *et al.* Spontaneous ex vivo apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with head and neck cancer. *Clin. Cancer Res.*; 5(6): 1263-1273. 1999
41. Saito T., Dworacki G., Gooding W., *et al.* Spontaneous apoptosis of CD8+ lymphocytes in peripheral blood of patients with advanced melanoma. *Clin. Cancer Res.*; 6(4):1351-1364. 2000
42. Bennett M. W., O'Connell J., O'Sullivan G. C., *et al.* The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma. *J. Immunol.*; 160: 5669-5675. 1998
43. Uzzo R.G., Raymen P., Kolenko V., *et al.* Mechanisms of apoptosis in T cells from patients with renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*; 5(5): 1219-1229. 1999
44. Dworacki G., Meidenbauer N., Kuss I., *et al.* Decreased zeta chain expression and apoptosis in CD3+ peripheral blood T lymphocytes of patients with melanoma. *Clin. Cancer Res.*; 7(Suppl 3): 947s-957s. 2001

45. Takahashi A., Kono K., Amemiya H., *et al.* Elevated caspase-3 activity in peripheral blood T cells coexist with increased degree of T-cell apoptosis and down-regulation of TCR zeta molecules in patients with cancer gastric. *Clin. Cancer Res.*; 7(1): 74- 80. 2001
46. Niehans G. A., Brunner T., Frizelle S.P., *et al.* Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer Res.*; 57:1007-1012. 1997
47. Kim J.W., Wieckowski E., Taylor D. D., *et al.* Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induced apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin. Cancer Res.*; 11: 1010-1020. 2005
48. Taylor D.D., Taylor C. G., Lyons K.S., *et al.* T-cell apoptosis and suppression of T-cell receptor/CD3- ζ by Fas ligand-containing membrane vesicles shed from ovarian tumors. *Clin. Cancer Res.*; 9: 5113-5119. 2003
49. Sikora J., Zeromski J. Expression of TCR-zeta chain and apoptosis in subpopulations of tumor-associated lymphocytes (TALs) from malignant pleural effusions. *Folia Histochem. Cytobiol.*; 40(4):347-351. 2002
50. Woo E.Y., Yeh H., Chu C. S., *et al.* Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J. Immunol.*; 168: 4272–4276. 2002
51. Whiteside T. L. Immune cell in the tumor microenvironment. Mechanism responsible for functional and signalling defects. *Gene Therapy of Cancer*. Plenum Press, New York: 167-172. 1998
52. Bronte V., Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat. Rev. Immunol.*; 5:641-654. 2005
53. Gastman B. R., Johnson D. E., Whiteside T.L., *et al.* Caspase-mediated degradation of T-cell receptor ζ -chain. *Cancer Res.*; 59: 1422-1427. 1999
54. Wieckowski E., Wang GQ., Gastman B.R., *et al.* Granzyme B-mediated degradation of T-cell receptor ζ chain. *Cancer Res.*; 62: 4884-4889. 2002
55. Sikora J., Dworacki G., Giersz R., *et al.* The role of monocytes/macrophages in TCR- ζ chain downregulation and apoptosis of T lymphocytes in malignant pleural effusions. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*; 18: 26-32. 2004
56. Taylor D.D., Bender D.P., Gerçel-Taylor Ç, *et al.* Modulation of TcR/CD3-zeta chain expression by a circulating factor derived from ovarian cancer patients. *BJC.*; 84(12): 1624-1629. 2001

57. Riccobon A., Gunelli R., Ridolfi R., *et al.* Immunosuppression in renal cancer: Differential expression of signal transduction molecules in tumor-infiltrating, near-tumor tissue, and peripheral blood lymphocytes. *Cancer Invest.*; 22. (6): 871-877. 2004
58. Seitzer U., Kayser K., Hanni H., *et al.* Reduced T-cell receptor CD3 ζ -chain protein and sustained CD3 ϵ expression at the site of mycobacterial infection. *Immunol.*; 104: 269-277. 2001
59. Maki A., Matsuda M., Asakawa M., *et al.* Decreased expression of CD28 coincides with the down-modulation of CD3 ζ and augmentation of caspase-3 activity in T cells from hepatocellular carcinoma-bearing patients and hepatitis C virus-infected patients. *J. Gastro. Hepatol.*; 19: 1348-1356. 2004
60. Lee Y. C., The many faces of transforming growth factor-beta in pleural diseases. *Curr. Opin. Pulm. Med.*; 7(4):173-179. 2001
61. Lopez-Gonzalez J.S., Aguilar-Cazares D., Prado-Garcia H., *et al.* Lack of correlation between growth inhibition by TGF-beta and the percentage of cells expressing type II TGF-beta receptor in human non-small cell lung carcinoma cell lines. *Lung Cancer*; 38(2): 149-158. 2002
62. Atanackovic D, Block A, de Weerth A., *et al.* Characterization of effusion-infiltrating T cells: benign versus malignant effusions. *Clin. Cancer Res.*;10(8):2600-2608. 2004
63. Nakamura H, Saji H, Ogata A. *et al.* Immunologic parameters as significant prognostic factors in lung cancer. *Lung Cancer*; 37(2):161-169. 2002
64. Serafini P., Borrello I., Bronte V. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Sem. Cancer Biol.*; 16: 53-65. 2006
65. Prado-Garcia H., Aguilar-Cazares D., Flores-Vergara H., *et al.* Effector, memory and naïve CD8+ T cells in peripheral blood and pleural effusion from lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer*; 47(3):361-371. 2005
66. Juárez Nicolás A. Evaluación del efecto apoptótico y en el ciclo celular de líneas de carcinoma pulmonar sobre linfocitos T humanos. Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de Química. 2007
67. Abraham R. T., Weiss A. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat. Rev. Immunol.*; 4: 301-308. 2004

68. Ben-Baruch A. Inflammation-associated immune suppression in cancer: the roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. *Sem. Cancer Biol.*; 16: 38-52. 2006
69. Balkwill F., Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*; 357: 539-545. 2001
70. Rodríguez P. C., Ochoa A. C. T cell dysfunction in cancer: role of myeloid cells and tumor cells regulating amino acid availability and oxidative. *Sem. Cancer Biol.*; 16: 66-72. 2006
71. Uyttenhove C., Pilotte L., Théate I., et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based tryptophan degradation by indolamine 2,3-dioxigenase. *Nat. Med.*; 9(10): 1269-1274. 2003
72. Deakin A. M., Singh K., Crowe J. S., et al. A lack of evidence for down-modulation of CD3 ζ expression in colorectal carcinoma and pregnancy using multiple detection methods. *Clin. Exp. Immunol.*; 118 (2): 197-204. 1999
73. Valitutti S., Müller S., Salio M., et al. Degradation of T Cell Receptor (TCR)-CD3- ζ complexes after antigenic stimulation. *J. Exp. Med.*; 185(10): 1859-1864. 1997
74. Cemerski S., Cantagrel A., van Meerwijk J. P., et al. Reactive oxygen species differentially affect T cell receptor signaling pathways. *J. Biochem. Biol.*; 277(22): 19585-19593. 2002
75. Cemerski S., van Meerwijk J.P., Romagnoli P. Oxidative stress induced T lymphocyte hyporesponsiveness is caused by structural modification rather than proteasomal degradation of crucial TCR signaling molecules. *Eur. J. Immunol.*; 33: 2178-2185. 2003
76. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*; 82: 47-95. 2002