



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTO DEL IFN-GAMMA EN LA EXPRESIÓN DE LAS
MOLÉCULAS PD-L1 Y PD-L2 EN LÍNEAS CELULARES
DE CARCINOMA PULMONAR Y DETERMINACIÓN DE
LA FUNCIONALIDAD DE PD-L1

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:
ERÉNDIRA GUADALUPE PÉREZ HERNÁNDEZ



MÉXICO, D.F.

AÑO 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Agradezco al Programa Nacional de Becas (PRONABES) y al Programa de Becas de Inicio a la Investigación (PROBEI) el apoyo brindado en la formación académica y en el desarrollo del presente trabajo.

Dedicatoria

A mis padres

A ellos que han depositado en mí una gran confianza, y que sin importar que tan grandes hayan sido sus esfuerzos y sacrificios lograron darme lo necesario para que hoy sea posible este momento.

“The highest result of education is tolerance”

Helen Keller

“Everything should be made as simple as posibles, but not simpler”

Albert Einstein

Agradecimientos

Gracias a Dios, porque siempre me acompaña en los momentos más difíciles y me da fuerzas para seguir adelante.

A mis padres y a mis hermanos por todo su apoyo, su cariño, su comprensión...muchas gracias por estar ahí.

A Ricardo, te agradezco muchísimo tu compañía, cariño, tus consejos, tu comprensión...en fin muchas gracias.

A mis amigos de la Facultad de Química, especialmente a Raúl, Luz, Sebas, Helia, Lili, Lalito, Lila, Gustavo, Sandino, Karlita, Tanis, Edgar, Denisse, muchas gracias por todos los momentos que compartimos en la facultad...no tienen idea de cuanto los quiero y extraño.

A los profesores que siempre me apoyaron durante mi estancia en la facultad, a la maestra Pili, a la maestra Norma Castellanos, al Dr. Martín Iglesias y especialmente a la Doctora Viri.

A mis amigas de la prepa Angélica, Jaque, Viro, Mariana, muchas gracias por todo su apoyo, las quiero mucho.

Al Dr. Sullivan por todo su apoyo, tiempo, paciencia y por sus enseñanzas.

A los integrantes del Laboratorio de Cáncer Pulmonar: Dolores, Manuel, Pati, Susana, Fidel, Osvaldo, muchas gracias por sus consejos y apoyo; a Vero, Lorenzo, Norma, Rodolfo, Ángeles, Ricardo, Edith, Lili, Victor muchas gracias por todo, no tengo palabras para decirles lo mucho que les agradezco, son muy buenos amigos.

Al Dr. Heriberto, por todo lo que me ha enseñado, su tiempo, paciencia y dedicación...muchas gracias por todo su apoyo.

Con respeto, gratitud y orgullo a la UNAM, Facultad de Química.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 GENERALIDADES DEL CÁNCER.....	1
1.1.1 Características de los tumores malignos.....	1
1.2 CÁNCER PULMONAR.....	5
1.2.1 Patogénesis.....	5
1.2.2 Tipos histológicos del cáncer pulmonar.....	6
1.3 RESPUESTA INMUNE EN CÁNCER.....	6
1.3.1 Activación del linfocito T.....	7
1.3.2 Teoría de la inmunoedición del cáncer.....	9
2. ANTECEDENTES	17
2.1 Expresión y función de PD-1 (CD279).....	17
2.2 Expresión de PD-L1.....	18
2.3 Expresión de PD-L2.....	18
2.4 Función inmunológica de PD-L1 y PD-L2.....	19
2.5 EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS PD-L1 Y PD-L2 EN TUMORES Y EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL.....	23
2.5.1 Expresión de PD-L1 en tumores.....	23
2.5.2 Regulación de la expresión de PD-L1 en tumores.....	23
2.5.3 Funcionalidad de PD-L1 en tumores.....	25
2.5.4 Expresión de PD-L2 en tumores.....	26
3 JUSTIFICACIÓN	27
4 HIPÓTESIS	28
5 OBJETIVOS	29
6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	30
6.1 Estimulación de las líneas celulares tumorales con IFN- γ	30
6.2 Evaluación de la funcionalidad de PD-L1.....	31

7 MATERIALES Y MÉTODOS	32
7.1 CULTIVO CELULAR.....	32
7.2 ANTICUERPOS.....	32
7.3 ESTIMULACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES CON IFN- γ	33
7.4 EXTRACCIÓN DE RNA, RETROTRANSCRIPCIÓN (RT) Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	33
7.4.1 Extracción de RNA.....	33
7.4.2 RT-PCR.....	34
7.4.3 Electroforesis.....	35
7.5 SEPARACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES (CMN) Y PURIFICACIÓN DE LINFOCITOS T CD8+.....	35
7.6 ESTIMULACIÓN DE LINFOCITOS T CD8+.....	36
7.7 TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS TUMORALES CON MITOMICINA C.....	36
7.8 COCULTIVO.....	36
7.9 CITOMETRÍA DE FLUJO.....	37
7.9.1 Determinación de la expresión de PD-L1 y PD-L2 en las líneas celulares de carcinoma pulmonar.....	37
7.9.2 Inmuntinción de linfocitos T CD8+ provenientes del cocultivo.....	37
7.9.2.1 Tinción para CD69/CD25/CD95L y PD-1/PD-L1.....	38
7.9.2.2 Tinción para Granzima A/Perforina.....	38
8 RESULTADOS	39
8.1 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL mRNA PARA PD-L1 Y PD-L2 EN LÍNEAS CELULARES DE CARCINOMA PULMONAR.....	39
8.2 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL IFN- γ EN LA EXPRESIÓN DE PD-L1 Y PD-L2.....	40
8.2.1 Efecto del IFN- γ en la expresión del mRNA para PD-L1 y PD-L2 en líneas celulares de carcinoma pulmonar.....	40
8.2.2 Efecto del IFN- γ en la expresión de las proteínas PD-L1 y PD-L2 en líneas celulares de carcinoma pulmonar.....	41
8.3 DETERMINACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE PD-L1.....	43
9 DISCUSIÓN	49
10 CONCLUSIONES	53
11 BIBLIOGRAFÍA	54

Índice de Figuras y Tablas

Figuras

Fig 1. Patogénesis del cáncer pulmonar.....	6
Fig 2. Eventos requeridos para la activación del linfocito T	9
Fig 3. Respuesta inmune en cáncer pulmonar.....	12
Fig 4. Estructura del receptor PD-1 y señalización mediada por su interacción con alguno de sus ligandos.....	17
Fig 5. Mecanismos mediante los cuales la interacción de PD-1/PD-L1 inhibe la activación del linfocito T.	20
Fig 6. Representación de la metodología empleada para la realización del cocultivo	37
Fig 7. Expresión del mRNA para PD-L1 y PD-L2 en 11 líneas celulares de carcinoma pulmonar.....	39
Fig 8. Expresión del mRNA para PD-L1 y PD-L2 en la línea celular OSJV-1 sin estimular y estimulada con IFN- γ a las concentraciones de 0.1 ng/mL y 1.0 ng/mL	40
Fig 9. Efecto del IFN- γ en la expresión de las proteínas PD-L1 y PD-L2 en la línea celular OSJV-1	42
Fig 10. A. Figura representativa de la expresión de PD-1 en los linfocitos T CD8+ previamente estimulados con anticuerpo anti-CD3 y anti-CD28. B. Efecto de la mitomicina C en la expresión de PD-L1 en las células tumorales.....	44
Fig 11. Evaluación de la apoptosis en linfocitos T CD8+, provenientes de sujetos sanos, después de su cocultivo con la línea celular SKMES-1 por 96 h.....	45
Fig 12. Análisis representativo de la expresión de PD-L1 y de PD-1 en los linfocitos T CD8+ provenientes del cocultivo empleando a la línea celular 1.3.11	45
Fig 13. Modulación de la expresión de PD-1 y PD-L1 en linfocitos T CD8+ debido a la actividad funcional de PD-L1.	46
Fig 14. Análisis de la expresión de Perforina PE y Granzima A representativo del cocultivo de la línea celular SKMES-1 con linfocitos T CD8+.	47
Fig 15. Efecto funcional de PD-L1 sobre la expresión de Granzima A y Perforina en los linfocitos T CD8+	47
Fig 16. Análisis representativo del porcentaje de linfocitos T CD8+ que expresan CD25, CD69 o CD95L	48

Tablas

Tabla 1. Factores inmunosupresores que favorecen el crecimiento del tumor.....	15
Tabla 2. Expresión de PD-L1 en tumores humanos y su asociación inmunológica, clínica o patológica	24
Tabla 3. Determinación de la funcionalidad de PD-L1 expresada en distintos tipos de tumores.....	25
Tabla 4. Expresión de PD-L2 en tumores humanos y su asociación inmunológica, clínica o patológica	26
Tabla 5. Expresión relativa del mRNA para PD-L1 y PD-L2 en líneas celulares de carcinoma pulmonar sin estimular y estimuladas con IFN- γ	41
Tabla 6. Expresión de PD-L1 y PD-L2 en líneas celulares de carcinoma pulmonar sin estimular y estimuladas con IFN- γ	43

Abreviaturas

APC	Célula presentadora de antígeno
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Albúmina sérica bovina
CMN	Células mononucleares
COX2	Ciclooxigenasa 2
CTLA-4	Antígeno-4 del linfocito T citotóxico
CTLs	Linfocitos T citotóxicos
DAMPs	Patrones moleculares asociados al daño
DCs	Células dendríticas
DEPC	Dietil pirocarbonato
FasL	Fas ligando
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
IDO	Indolamino 2,3-dioxigenasa
IFN-γ	Interferón gamma
IL	Interleucina
ITAM	Motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina
ITIM	Motivo inhibitorio del inmunoreceptor basado en tirosina
ITSM	Motivo de cambio del inmunoreceptor basado en tirosina
LCMV	Virus de la coriomeningitis linfocitaria
MDSCs	Células supresoras derivadas del linaje mieloide
Mϕs	Macrófagos
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
Min	Minutos
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
ND	No detectado
NK	Asesinas naturales
NKT	Célula T asesina natural
NSCLC	Carcinoma pulmonar de células no pequeñas
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD-1	Receptor de muerte programada 1
PD-L1	Ligando de muerte programada 1
PD-L2	Ligando de muerte programada 2
PE	Ficoeritrina
PEG2	Prostaglandina E2
pRb	Proteína del retinoblastoma
QR	Quantum Red
RMFI	Intensidad media de fluorescencia relativa
RT	Retrotranscripción
SCLC	Carcinoma pulmonar de células pequeñas

SP	Sangre periférica
TAP	Proteína asociada al transporte de antígenos
TCR	Receptor de la célula T
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
Th	Linfocitos T cooperadores
TILs	Linfocitos infiltrantes del tumor
TNF	Factor de necrosis tumoral
T_{Reg}	Células T reguladoras
UV	Ultravioleta
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
ZAP70	Proteína cinasa 70 asociada a la cadena zeta

1. Introducción

1.1 GENERALIDADES DEL CÁNCER

Las células que constituyen un organismo vivo están expuestas constantemente a sustancias presentes en el medio ambiente, entre estas se encuentran agentes químicos, físicos y biológicos capaces de ocasionar alteraciones genéticas y epigenéticas que conducen a la transformación progresiva de una célula normal a una célula tumoral. (Barrett., 1993; Weinberg., 1996)

El cáncer es la manifestación clínica que resulta del crecimiento descontrolado de una población celular, la cual presenta alteraciones acumulativas en su genoma dada por la activación de protooncogenes y/o la inactivación de genes supresores de tumor. Esta población celular prolifera dando lugar a clonas que no responden a señales inhibitorias del microambiente, adquiriendo gradualmente mayor autonomía hasta alcanzar un crecimiento considerable con la formación de un tumor clínicamente detectable. (Ponder., 2001; Croce., 2008)

Al tumor que no es capaz de crecer por tiempo indefinido, no invade los tejidos circundantes sanos y está morfológicamente bien diferenciado se denomina benigno. El que prosigue su crecimiento y de forma progresiva invade tejidos adyacentes y crece a distancia (metástasis), se denomina maligno; por lo que el término cáncer se refiere de manera específica a un tumor maligno. (Kindt., 2007)

1.1.1 Características de los tumores malignos

Se ha sugerido que las células cancerosas se caracterizan por manifestar seis alteraciones esenciales en la fisiología celular. Estas seis alteraciones son: (Hanahan et al., 2000)

Autosuficiencia de factores de crecimiento. Las células normales requieren de señales de crecimiento para pasar del estado quiescente G_0 a un estado de proliferación activa, estas señales son transmitidas al interior de la célula mediante receptores transmembranales que unen factores de crecimiento difusibles, componentes de la matriz extracelular y moléculas importantes en la adhesión e interacción entre célula y célula. (Alberts., 2007) Las células tumorales adquieren la capacidad de generar sus propias señales de crecimiento, sobreexpresar receptores para los factores de crecimiento y de alterar componentes que participan en el proceso de señalización intracelular que recibe y procesa las señales emitidas por la unión del ligando con su respectivo receptor; lo anterior con la finalidad de disminuir su dependencia a los



estímulos provenientes del microambiente del tejido normal en el que se encuentran. (Hanahan et al., 2000, Croce., 2008)

Insensibilidad a señales inhibitorias de la proliferación celular. En el tejido normal, las señales antiproliferativas actúan manteniendo a las células en un estado quiescente o bien, situando a las células en un estado postmitótico, en el cual las células se diferencian y no proliferan, para mantener la homeostasis. (Alberts., 2007) La mayoría de las señales antiproliferativas son reguladas por la proteína del retinoblastoma (pRb). Cuando pRb se encuentra en un estado hipofosforilado bloquea la proliferación debido a que secuestra y altera la función del factor de transcripción E2F, que controla la expresión de genes esenciales para la progresión de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. El factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) favorece la actividad de pRb, evitando su fosforilación, y por tanto bloquea el avance a través de la fase G1 del ciclo celular. (Weinberg., 1995) De esta forma, debido a alteraciones en los receptores para TGF- β , a mutaciones en el gen que codifica para la proteína pRb, o bien, debido a la menor expresión de integrinas y otras moléculas de adhesión celular -que envían señales antiproliferativas- una gran cantidad de tumores son insensibles a las señales que inhiben su proliferación (Nevins.,2001).

Evasión de la apoptosis. La apoptosis es un proceso inducido y ordenado presente en organismos vivos que se lleva a cabo cuando en una célula se detectan anomalías como daño al DNA, insuficiencia de factores de crecimiento, hipoxia, entre otros. La célula que muere por apoptosis presenta ciertos cambios morfológicos que incluyen un decremento notable del volumen celular, modificación del citoesqueleto- cuyo efecto se manifiesta en la vesiculación de la membrana-, condensación de la cromatina, degradación del DNA y la formación de cuerpos apoptóticos. (Kindt., 2007; Tesniere., 2008)

El proceso de apoptosis se acompaña de la expresión de varios genes. Algunas de las proteínas sintetizadas como producto de estos genes inducen la apoptosis (proapoptóticas) mientras que otras la inhiben (antiapoptóticas). (Hengartner., 2000)

Las células tumorales pueden evadir la apoptosis a través de la pérdida de reguladores proapoptóticos, mediante mutaciones que incluyen al gen supresor de tumor p53, la sobreexpresión de moléculas antiapoptóticas o por alterar moléculas importantes para desencadenar la muerte celular. (Hanahan et al., 2000; Brown et al., 2005)

Potencial replicativo ilimitado. El extremo final de los cromosomas, los telómeros, están compuestos de miles de secuencias cortas repetitivas de 6 pares de bases (pb). Durante la

división celular se pierde parte de este DNA, por lo que la erosión progresiva de los telómeros a través de ciclos sucesivos de replicación ocasiona fusiones entre los extremos finales de los cromosomas, resultando en un desarreglo en el cariotipo asociado con la muerte de la célula afectada. (Hanahan et al., 2000; Harley., 2008)

Las células tumorales adquieren un potencial replicativo ilimitado evitando la erosión de los telómeros. Muchos tipos de cáncer aumentan la expresión de la enzima telomerasa, la cual adiciona hexanucleótidos repetidos en los extremos finales del DNA telomérico, lo cual les confiere la capacidad de replicarse indefinidamente; mientras que un bajo porcentaje de tumores (10-15%) activa un mecanismo que es conocido como prolongación alternativa de telómeros, el cual mantiene los telómeros a través de la recombinación basada en intercambios intercromosomales. (Zitvogel et al., 2006)

Angiogénesis. La angiogénesis es el proceso que conduce a la formación de vasos sanguíneos y es de gran importancia en la organogénesis ya que las células requieren de nutrientes y oxígeno para su sobrevivencia y funcionamiento. (Alberts., 2007)

Una vez que un tejido se ha formado, las células que lo conforman se ven obligadas a residir a una distancia de 100µm de un vaso sanguíneo; sin embargo, el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos es transitorio y altamente regulado. En este mecanismo de regulación participan moléculas que favorecen la angiogénesis (pro-angiogénicas) y moléculas que la inhiben (anti-angiogénicas). (Hanahan et al., 2000)

Debido al potencial replicativo ilimitado presente en las células tumorales, estas requieren de la formación de vasos sanguíneos para su supervivencia por lo que una gran cantidad de tumores promueven la liberación de moléculas pro-angiogénicas, entre las que se encuentran el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF1/2). (Pollard., 2004)

Invasión del tejido y metástasis. El establecimiento de células tumorales en sitios distantes del tumor primario –metástasis– es la causa del 90% de las muertes humanas ocasionadas por cáncer (Zitvogel et al., 2006). El proceso de metástasis es complejo y ocurre a través de una serie de pasos secuenciales que incluyen la invasión de tejidos adyacentes, intravasación, transporte a través del sistema circulatorio, detención en un sitio distinto del tumor primario, extravasación y crecimiento en un órgano secundario; estos pasos se describen de manera breve a continuación. (Steeg., 2003; Mehlen et al., 2006)

Invasión de tejidos adyacentes

Para que una célula tumoral adquiriera capacidad invasiva se requieren alteraciones en las moléculas responsables de la interacción entre célula y célula, tal como la disminución en las moléculas de adhesión celular (por ejemplo, miembros de proteínas pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas y proteínas pertenecientes a la familia de las caderinas e integrinas) y se requiere la participación de proteínas proteolíticas capaces de degradar la matriz extracelular.^(Fragoso et al., 2000) Esto facilita el desprendimiento de la célula tumoral de las demás células tumorales, o bien de la matriz adyacente. Adicionalmente, estudios recientes han propuesto que la transición del tejido epitelial a mesenquimal favorece que las células tumorales invadan tejidos adyacentes,^(García., 2009) puesto que las células con propiedades del tejido mesenquimal poseen más movilidad e invasividad.^(Gillies et al., 2008)

Intravasación y transporte a través del sistema circulatorio

Las células tumorales ingresan a la circulación sanguínea directa o indirectamente mediante el sistema linfático, para lo cual requieren adherirse al lado externo de la membrana basal vascular, degradar localmente la matriz, migrar a través de la membrana basal dañada, pasar entre células endoteliales y llegar a la luz del vaso sanguíneo. En la circulación, las células tumorales deben resistir a la inmunovigilancia y/o a su destrucción por estrés mecánico originado por el flujo sanguíneo. De hecho, evidencia experimental demuestra que solo el 0.01% de células tumorales inyectadas dentro de la circulación son capaces de generar metástasis.^(Gout et al., 2008)

Detención en un sitio distinto del tumor primario, extravasación y crecimiento en un órgano secundario

Para que las células tumorales se establezcan en un sitio distinto del tumor primario deben, por una parte, establecer interacciones con las células endoteliales del órgano blanco y sobrevivir a distintos microambientes.^(Gillies et al., 2008)

Las interacciones entre las células tumorales con las células endoteliales del órgano blanco son importantes ya que determinan el arresto de las células circulatorias en los capilares e inician la cascada de eventos que culminan en la extravasación de las células tumorales en el órgano secundario.^(Gout et al., 2008)

Una vez que se encuentran en el órgano secundario, las células tumorales deben sobrevivir al nuevo microambiente y su proliferación depende de las interacciones moleculares entre las células tumorales y las células del nuevo microambiente. En este proceso muchas células



mueren por apoptosis y sólo una minoría de células tumorales son capaces de iniciar su división celular para formar micrometástasis, y de estas, una pequeña parte es capaz de formar una metástasis macroscópica; por lo que la capacidad de una célula para invadir y hacer metástasis está muy relacionada con su capacidad para evadir la apoptosis. (Mehlen et al., 2006)

1.2 CÁNCER PULMONAR

El cáncer pulmonar representa un grave problema de salud pública ya que es el más frecuente de todos los tipos de cáncer y con más de un millón de muertes anuales alrededor del mundo (Sun et al., 2007) posee una alta tasa de mortalidad. (Proctor., 2001)

1.2.1 Patogénesis

Alrededor del 90% de los casos de cáncer pulmonar es atribuido al consumo de tabaco (Minna et al., 2002; Hong., 2004) ; sin embargo, hay otros factores de riesgo no relacionados al tabaquismo como la exposición a humo de leña, asbestos, cromo, arsénico, cadmio, silica y níquel así como factores genéticos, hormonales y virales. (Sun et al., 2007)

El humo del tabaco contiene más de 4500 componentes (Stämpfli et al., 2009), de los cuales más de 60 se han identificado como carcinógenos por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer. Los carcinógenos más potentes son los hidrocarburos aromáticos policíclicos, como el benzopireno y la nitrosamina específica del tabaco conocida también como nitrosaminacetona derivada de la nicotina (NNK por sus siglas en inglés). (Schuller., 2002; Sun et al., 2007)

Estos carcinógenos son metabolizados por enzimas presentes en un organismo antes de ser excretados. Sin embargo, algunos de los intermediarios formados por estas enzimas son electrofílicos y reactivos por lo que pueden unirse covalentemente al DNA formando aductos. Este daño en el DNA puede repararse o si la célula es incapaz de reparar el daño muere por apoptosis pero si el daño en el DNA persiste da lugar a mutaciones en genes que participan en procesos como la apoptosis (por ejemplo p53), transducción de señales (ras) y en el control del ciclo celular (Rb y c-myc) (Minna et al., 2002; Herbst et al., 2008) que conducen a la formación del cáncer pulmonar. Figura 1.

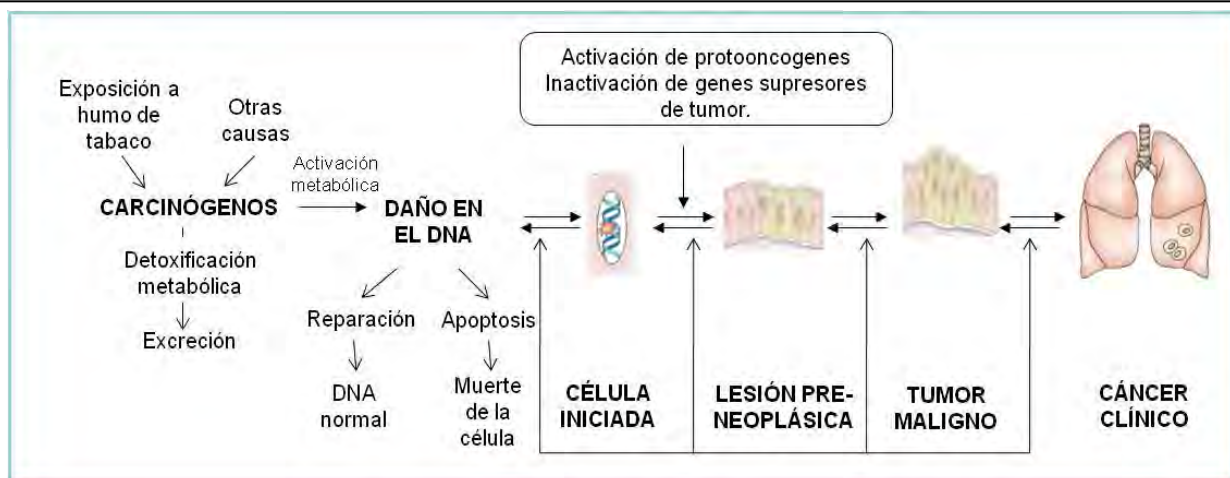


Figura 1. Patogénesis del cáncer pulmonar. Adaptado de Minna et al., 2002

1.2.2 Tipos histológicos del cáncer pulmonar

De acuerdo a sus características clínico-patológicas los carcinomas pulmonares se clasifican como: carcinoma pulmonar de células pequeñas (SCLC, por sus siglas en inglés), el cual representa cerca del 20% de casos de cáncer pulmonar, y el carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC).

El carcinoma pulmonar de células no pequeñas, incluye los siguientes grupos: Carcinoma de células escamosas (20-25%), adenocarcinomas (40%) y carcinoma de células grandes (15-20%) (Minna et al., 2002; Hong., 2004)

1.3 RESPUESTA INMUNE EN CÁNCER

El sistema inmune está encargado de proteger al organismo de distintos agentes patógenos así como de la formación de células tumorales. Una vez que se está en contacto con alguno de estos agentes se monta una respuesta conjunta y coordinada en contra de ellos, denominada respuesta inmune. Para su estudio, la respuesta inmune se divide en respuesta inmune innata y respuesta inmune adaptativa pero a pesar de esta división es necesario comprender que todo el sistema participa de manera dinámica para evitar la enfermedad, erradicar al agente patógeno y para restaurar la homeostasis. (Abbas et al., 2008)

La respuesta inmune innata está conformada por barreras físicas y químicas, el complemento y células como granulocitos, macrófagos (MØs), células dendríticas (DCs) y células asesinas naturales (NK); mientras que los linfocitos T y B constituyen la respuesta inmune

adaptativa.^(Dranoff., 2004) Dentro de estas células, el linfocito T tiene un papel importante al ser un intermediario entre las células que constituyen la respuesta inmune innata y la adaptativa, además de ser un constituyente esencial para montar la respuesta inmune antitumoral; de esta forma en la siguiente sección se describirá de forma breve los procesos requeridos para su activación.

1.3.1 Activación del linfocito T

Como parte del proceso de maduración y selección, el linfocito T se diferencia en una de las siguientes poblaciones: Linfocitos T CD4+ restringidos al reconocimiento de antígenos asociados a moléculas clase II del MHC y que funcionan como células colaboradoras (Th) o a linfocitos T CD8+ restringidos a moléculas clase I del MHC y que funcionan como linfocitos T citotóxicos (CTLs). Una vez que estas poblaciones han madurado en el timo, son liberadas al torrente sanguíneo en busca de antígenos. Estos linfocitos se denominan naïve ya que no han reconocido el antígeno específico para su TCR. Para que el linfocito T naïve lleve a cabo su función efectora debe activarse. En este proceso de activación se requiere la ejecución de los siguientes eventos: ^(Sharpe et al., 2002; Inman et al., 2007)

- Reconocimiento de un péptido específico asociado a las moléculas del MHC por el receptor de las células T (TCR)

Para que se lleve a cabo el reconocimiento de un antígeno asociado a las moléculas del MHC por el TCR, se requiere la interacción del linfocito T con una APC. En esta interacción participan moléculas de adhesión celular, entre las que se encuentran CD2, LFA-1 e ICAM3 presentes en el linfocito T y CD58, ICAM-1 y DC-SIGN presente en la APC.

Una vez que el TCR reconoce a un péptido antigénico asociado a moléculas del MHC, se agrupa con los correceptores CD4 o CD8, los cuales se unen a regiones invariantes de la molécula del MHC. La tirosincinasa LCK, que se une a la región citoplasmática de los correceptores cuando la célula se encuentra en estado de reposo, se aproxima a la región citoplasmática de la molécula CD3, en donde fosforila los motivos de activación del inmunoreceptor basado en tirosina (ITAM) presentes en las cadenas polipeptídicas que conforman el CD3. Las tirosinas fosforiladas en los ITAM proporcionan sitios de acoplamiento a los que se une otra tirosincinasa de proteína denominada ZAP70. Entonces, ZAP70 cataliza la fosforilación de varias moléculas adaptadoras unidas a membrana que favorecen el reclutamiento de varias vías de transducción de señales intracelulares que culminan en la

activación de factores de transcripción, producción de citocinas y en la proliferación del linfocito T. (Alegre et al., 2001; Kindt., 2007) Figura 2.

- Coestimulación del linfocito T

Además de las señales generadas por la interacción de un péptido antigénico con el complejo TCR-CD3, el linfocito T requiere señales que promuevan su sobrevivencia y expansión proporcionadas por la interacción de las moléculas coestimuladoras.

La molécula coestimuladora mejor caracterizada es CD28, la cual es una glicoproteína expresada en linfocitos T naïve y en linfocitos T activados que al interactuar con sus ligandos B7-1/CD80 o B7-2/CD86, expresados en las APCs, desencadena distintos efectos en el linfocito T entre los que se encuentran: promover su ingreso y progresión a través del ciclo celular, incrementar la expresión de proteínas antiapoptóticas que promueven su sobrevivencia, reducir el tiempo necesario para que el estímulo antigénico lo active, incrementar su respuesta ante el estímulo antigénico y aumentar la producción de IL-2 así como la expresión de su receptor (IL-2R). (Acuto et al., 2003; Garvin et al., 2009)

- Un microambiente que favorezca la activación del linfocito T

Una vez que el linfocito ha recibido las señales de activación antes mencionadas, se lleva a cabo la síntesis de proteínas requeridas para su división y diferenciación. Por ejemplo, las células Th pueden subdividirse de acuerdo a su distinto patrón de secreción de citocinas en Th1, capaces de liberar IL-2, IL-3, IFN- γ , TNF- β ; y en Th2, que producen IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 con la finalidad de formar un microambiente propicio para la adecuada activación del linfocito T y para regular la respuesta inmunológica en curso, ver Figura 2. (Kindt., 2007; Murphy et al., 2008)

Si alguno de los pasos antes mencionados no se lleva a cabo o es incompleto se producen señales que conducen a dos destinos: muerte de la célula T por apoptosis o la inducción de un estado denominado anergia en el que el linfocito T no responde al estímulo antigénico. Pero si estos pasos se efectúan adecuadamente entonces el linfocito T se activa, lo que conduce a su proliferación y diferenciación.

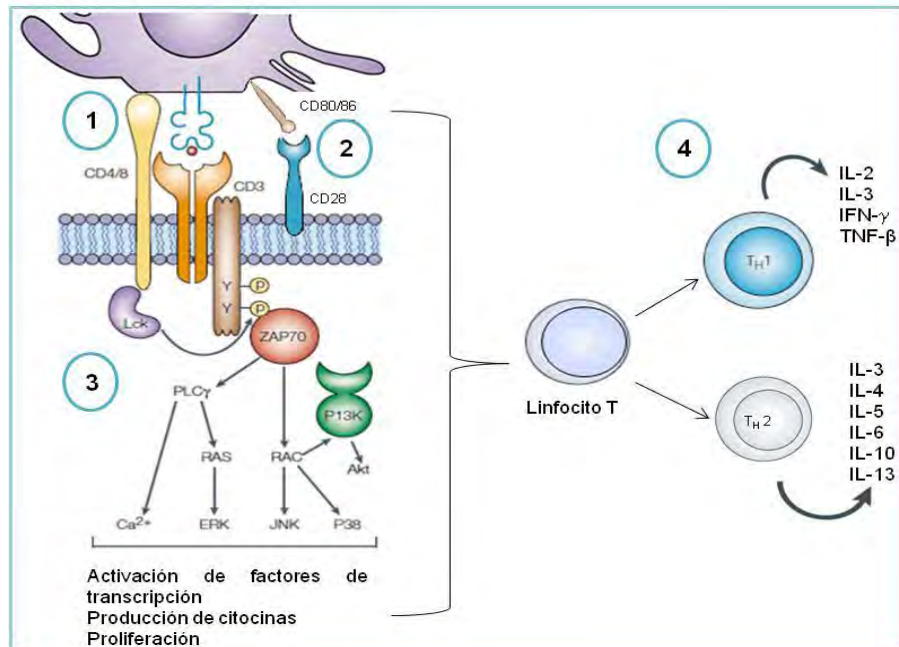


Figura 2. Eventos requeridos para la activación del linfocito T. 1) Reconocimiento de un péptido específico asociado a las moléculas del MHC por el TCR, 2) Coestimulación del linfocito T, 3) Cascada de señalización intracelular, 4) Un microambiente que favorezca la activación del linfocito T. Adaptado de Alegre., 2001.

1.3.2 Teoría de la inmunoección del cáncer

La teoría de la inmunoección del cáncer se sustenta en la hipótesis de la inmunovigilancia, la cual inicialmente fue postulada por Ehrlich, ya que propuso que las células transformadas que surgían continuamente en el cuerpo eran reconocidas y erradicadas por el sistema inmune antes de que fueran clínicamente detectables. A mediados del siglo XX, Burnet y Thomas, basados en el entendimiento de la existencia de antígenos tumorales y en los conocimientos que se tenían a la fecha de la respuesta inmune antitumoral, proponen la hipótesis de la inmunovigilancia del cáncer la cual sostiene que las células tumorales son reconocidas como no propias y son capaces de inducir una respuesta inmune (Dunn et al., 2002; Ryungsa et al., 2007), este concepto fue abandonado y aproximadamente 3 décadas después debido al empleo de modelos animales modificados genéticamente y al mejor entendimiento de la naturaleza molecular de los antígenos tumorales se evidenció la existencia de la inmunovigilancia del cáncer mostrándose que este proceso podría incluirse dentro de un proceso más general denominado inmunoección del cáncer (Dunn et al., 2002; Rosenberg., 2008)

La hipótesis de la inmunomedición del cáncer enfatiza que la presión inmune ejercida sobre las células tumorales puede tener alguno de los siguientes resultados: bloquear el crecimiento, desarrollo y sobrevivencia del tumor o puede promover el crecimiento del tumor.

De esta forma el proceso de inmunedición del cáncer consta de tres fases: Eliminación (también conocida como protección), equilibrio (persistencia) y escape (progresión) (Dunn et al., 2006; Ryungsa et al., 2007)

Eliminación

El proceso de eliminación consiste en el reconocimiento de células transformadas por el sistema inmune innato y adaptativo. Las siguientes fases se han propuesto para describir este proceso. (Dunn et al., 2002; Ryungsa et al., 2007)

a. Reconocimiento de las células tumorales por células del sistema inmune innato:

Se han determinado dos modelos mediante los cuales el sistema inmune innato es capaz de reconocer a las células tumorales:

Modelo de alarma

Cuando un tumor sólido ha crecido más de 2 a 3 mm requiere un suplemento sanguíneo y una remodelación del estroma que ocasiona lesiones en el tejido circundante e incluso la muerte de algunas células tumorales y células presentes en el tejido. Estas células muertas o lesionadas liberan citocinas proinflamatorias y patrones moleculares asociados al daño (DAMPs). (Kono et al., 2008; Tesniere et al., 2008) Los DAMPs funcionan como señales de alarma para reclutar a células dendríticas que captan y procesan los antígenos provenientes de las células tumorales muertas para posteriormente migrar a ganglios linfáticos y presentar dichos antígenos a los linfocitos T, los cuales una vez activados migran al sitio en donde se originó el daño para eliminar a las células tumorales, ver Figura 3.

Entre estos DAMPs se encuentran las proteínas de choque térmico, el ácido úrico y la proteína HMGB1 que son reconocidos por macrófagos y células dendríticas estimulando en ellas la producción de citocinas proinflamatorias indispensables para el reclutamiento de más células del sistema inmune innato. (Kono et al., 2008)

Inmunovigilancia

Este modelo consiste en el reconocimiento de las células tumorales por parte de las células NK. Las células NK constituyen la primera línea de defensa en contra de células infectadas o tumorales y su función está regulada por un balance de señales. Estas señales son transmitidas

por receptores inhibidores los cuales reconocen moléculas clase I codificadas por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y por receptores activadores que se unen a ligandos presentes en las células tumorales y células infectadas por virus. (Smyth et al., 2002; Raulet et al., 2009)

El reconocimiento de ligandos por los receptores activadores indicaría a las células NK la destrucción de la célula blanco, sin embargo esta señal de muerte es contrarrestada por las señales procedentes de los receptores inhibidores cuando reconocen a las moléculas clase-I del MHC. (Kindt., 2007) De esta forma, las células NK eliminan a las células tumorales deficientes en moléculas clase I del MHC o bien, a células cuya expresión de ligandos identificados por los receptores activadores supere a la señal inhibitoria transmitida por el receptor de inhibición: las células son eliminadas por la células NK a través de tres mecanismos principales: por la liberación de gránulos citoplasmáticos que contienen granzimas y perforina, mediante la expresión de FASL, TRAIL o a través de la secreción de IFN- γ (Smyth et al., 2002)

Las células tumorales son reconocidas ya que frecuentemente expresan familias de genes relacionadas al estrés, tal como MICA y MICB, moléculas no clásicas de la familia de las moléculas clase I del MHC, las cuales funcionan como ligandos para el receptor activador NKG2D presente en la célula NK. (Raulet et al., 2009)

b. Migración y maduración de las células presentadoras de antígeno profesionales:

Las células NK y los macrófagos infiltrantes reclutados se activan recíprocamente mediante la producción de IFN- γ e IL-12 lo que les permite eliminar a más células tumorales ya que se incrementa la capacidad fagocítica de los macrófagos y su producción de TNF- α (Dunn et al., 2006). El IFN- γ ejerce sus efectos citotóxicos mediante mecanismos antiproliferativos, anti angiogénicos y proapoptóticos (Ikeda et al., 2002). Los restos celulares provenientes de las células tumorales que han experimentado apoptosis o necrosis son captados por las células presentadoras de antígeno profesionales locales, las cuales posteriormente migran a los ganglios linfáticos más cercanos. Durante este proceso las células dendríticas expresan moléculas de coestimulación como CD40, CD80/ CD86, ver Figura 3.

c. Generación de linfocitos T específicos a los antígenos tumorales: En los ganglios linfáticos las células dendríticas llevan a cabo la presentación de antígeno a los linfocitos T CD4+ naive, los que se diferencian a linfocitos T CD4+ efectores que facilitan la diferenciación de los CTLs específicos del tumor. (Abbas et al., 2008)

d. **Migración de células T específicas de los antígenos tumorales al sitio del tumor y eliminación de las células tumorales:** Los linfocitos T CD4+ y CD8+ migran al sitio primario del tumor, estos últimos tienen la capacidad de reconocer y eliminar células que muestran péptidos no propios asociados a las moléculas de Clase I del MHC, ver Figura 3. Se han descrito dos vías por las que los CTLs eliminan a las células blanco: la vía dependiente de gránulos y la vía dependiente de receptor. (Fan et al., 2005; Prado-García 2004)

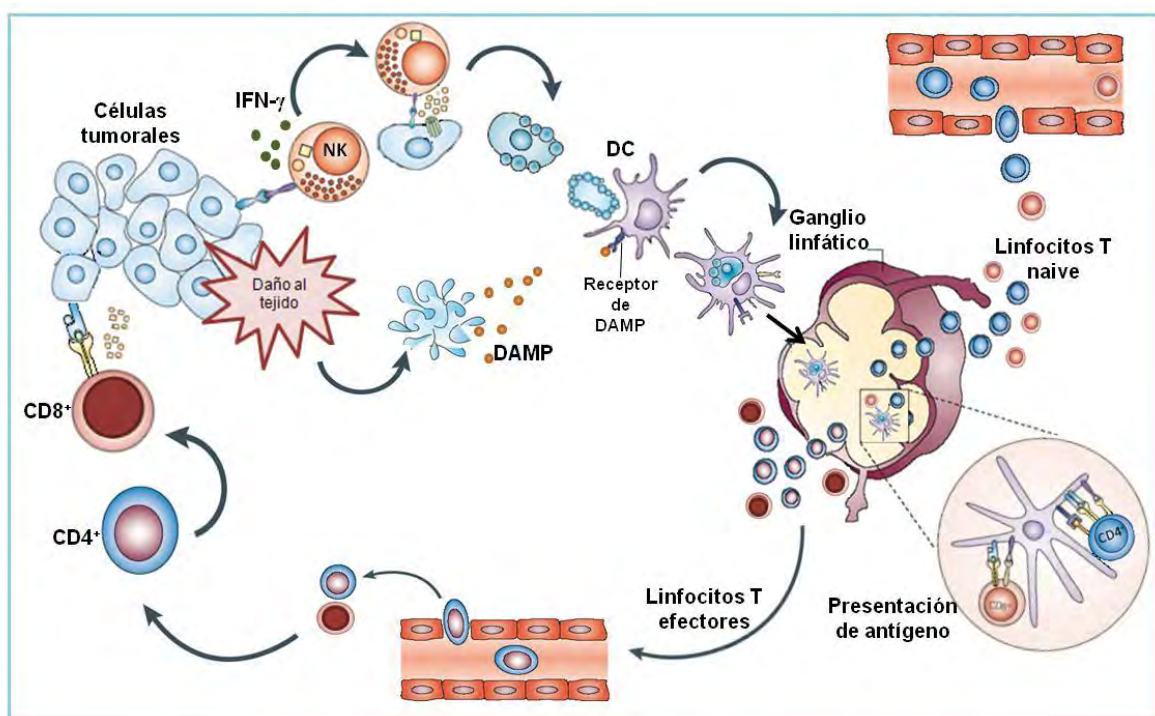


Figura 3. Respuesta inmune en cáncer pulmonar. Adaptado de Castano et al., 2006.

Si algunas células tumorales sobreviven a la fase de eliminación entonces el proceso puede progresar a la segunda fase: la fase de equilibrio.

Equilibrio

En la fase de equilibrio el sistema inmune del hospedero ejerce una presión selectiva en las células tumorales que es suficiente para contenerlas, pero no para eliminarlas completamente lo que permite la selección inmune de células tumorales poco inmunogénicas. Durante este periodo de selección, son destruidas muchas de las células tumorales que escaparon inicialmente del proceso de eliminación pero surgen nuevas variantes celulares que poseen diferentes mutaciones que las hacen más aptas para resistir la respuesta inmune montada en contra de ellas. (Ryungsa et al., 2007)

Escape

La inestabilidad genética presente en las células tumorales favorece el surgimiento de mecanismos que promuevan su sobrevivencia ante la presión inmune ejercida sobre ellas, originando variantes tumorales insensibles a la detección y/o a la eliminación inmune, las cuales son capaces de crecer descontroladamente resultando en un tumor clínicamente detectable. Entre estos mecanismos de evasión se encuentran los siguientes: ^(Dunn et al., 2002)

Evasión del reconocimiento inmune

Los mecanismos principales mediante los cuales las células tumorales evitan ser reconocidas por el sistema inmune son la pérdida de la expresión de antígenos en la superficie de las células tumorales y alteraciones en la expresión de moléculas clase I del MHC, así como en los mecanismos de procesamiento y presentación de antígenos tumorales. Estas alteraciones se deben a:

- Ausencia de la expresión de moléculas clase I del MHC debido a mutaciones en el gen de la β 2microglobulina.
- Disminución en la expresión de moléculas clase I del MHC debido a regulación transcripcional.
- Alteraciones en los mecanismos de procesamiento y presentación de antígenos tumorales, como por ejemplo mutaciones en la proteína asociada con el procesamiento de antígenos (TAP). ^(Rabinovich et al., 2007)

Reclutamiento de poblaciones celulares reguladoras

Las células tumorales pueden perturbar la inmunidad antitumoral al promover la expansión, reclutamiento y activación de células supresoras del sistema inmune, como células supresoras derivadas del linaje mieloide (MDSCs) y células T reguladoras.

Células supresoras derivadas del linaje mieloide (MDSCs)

Las células madre hematopoyéticas se diferencian en células progenitoras mieloides comunes y éstas en células mieloides inmaduras, conocidas también como MDSCs. Normalmente, las MDSCs migran a diferentes órganos periféricos en donde se diferencian en macrófagos, células dendríticas o granulocitos. ^(Gabrilovich et al., 2009) Sin embargo, distintos factores producidos durante infecciones agudas o crónicas, traumas o factores presentes en el microambiente tumoral,

como VEGF, IL-10, IL-6, CSF-1 y PGE₂, promueven la acumulación de MDSCs previniendo su diferenciación e induciendo su activación. Un gran número de estudios en animales han implicado a estas células en la supresión de la actividad efectora de los linfocitos T CD4+ y CD8+ a través de los siguientes mecanismos: Secreción de TGF-β, producción de arginasa I y óxido nítrico sintasa inducible y a través de la producción de especies reactivas de oxígeno. Además se ha reportado que distintos tipos de tumores promueven la expansión de MDSCs tal es el caso del carcinoma pulmonar de células pequeñas, carcinoma renal, carcinoma de cuello y cabeza, melanoma y adenocarcinomas de colon, mama y páncreas. (Stewart et al., 2008)

Células T reguladoras (T_{Reg})

Las células T_{Reg} son una población de células T que suprimen la actividad de la respuesta inmune, los mecanismos mediante los cuales suprimen la actividad del sistema inmune incluyen: (Zou., 2006; Vignali et al., 2008)

- Secreción de IL-10 y TGF-β
- Consumo competitivo de IL-2
- Producción de proteínas citolíticas (granzima y perforina).
- Inducción deIDO en APCs.
- Inducción de la expresión de la molécula coinhibitoria B7-H4 en APCs

Los tumores pueden evadir la respuesta inmune promoviendo la expansión, reclutamiento y activación de las células T_{Reg}. (Rabinovich et al., 2007) En sangre periférica de pacientes con cáncer de mama, cáncer colorectal, cáncer esofágico, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, leucemia, cáncer pulmonar, linfoma, melanoma, cáncer de ovario y cáncer pancreático. (Zou., 2006) se han encontrado células T_{Reg}, lo que sugiere la participación de estas células en promover la formación del tumor.

Secreción de factores inmunosupresores

Un gran número de agentes biológicamente activos sintetizados por las células tumorales o por las células del estroma (incluyendo citocinas y factores de crecimiento) ejercen efectos supresores en el sistema inmune. (Rabinovich et al., 2007) La Tabla 1 muestra algunos ejemplos de estos agentes así como su efecto en la respuesta inmune antitumoral.

Tabla 1. Factores inmunosupresores que favorecen el crecimiento del tumor. (Khong et al., 2002; Pollard., 2004; Zitvogel et al., 2006; Stewart et al., 2008)

Factor	Efecto en la respuesta inmune.
Factor de crecimiento transformante β . (TGF- β)	<ul style="list-style-type: none"> • Promueve la proliferación de células del estroma, tal como fibroblastos y macrófagos asociados al tumor los cuales pueden secretar factores angiogénicos. • Induce a las células del estroma a producir PGE2 a través de la sobreexpresión de COX2 • Reduce la presentación de antígeno mediado por las DCs. • Inhibe la actividad de IFN-γ. • Reduce la activación, proliferación y actividad de las células T. • Suprime la actividad citotóxica de las NK. • Estimula la proliferación de células T_{Reg}.
Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)	<ul style="list-style-type: none"> • Recluta DCs inmaduras y macrófagos al sitio del tumor. • Impide la diferenciación y maduración de DCs. • Favorece la formación de vasos sanguíneos.
IL-10	<ul style="list-style-type: none"> • Afecta la funcionalidad de la DC y protege a las células tumorales de la citotoxicidad mediada por los CTL debido a la disminución de las proteínas TAP1 y TAP2. • Inhibe la producción de IL-12
Prostaglandina E2	<ul style="list-style-type: none"> • Favorece la angiogénesis a través de la producción de VEGF. • Incrementa la producción de IL-10 por los linfocitos y macrófagos. • Inhibe la producción de IL-12 por los macrófagos.
IDO	<ul style="list-style-type: none"> • Bloquea la proliferación de las células T CD8+ en el sitio del tumor y promueve la apoptosis de las células T CD4+ • Degrada al triptófano produciendo metabolitos tóxicos para los linfocitos infiltrantes del tumor.
Arginasa I	<ul style="list-style-type: none"> • Degrada al aminoácido L-arginina a ornitina y urea los cuales inhiben la proliferación y actividad de los linfocitos T.

Contraataque tumoral

La apoptosis puede desencadenarse a través de las señales intracelulares transmitidas por la interacción de la molécula Fas con su ligando FasL. Entre los tejidos que tienen una elevada expresión de Fas se encuentran el timo, hígado, corazón y riñón, mientras que FasL se expresa en linfocitos T activados y células NK. ^(Maher et al., 2002) La apoptosis mediada por la interacción Fas-FasL es de gran importancia para mantener la homeostasis dentro de un tejido; sin embargo, la expresión de FasL en las células tumorales las hace capaces de eliminar a los linfocitos infiltrantes del tumor suprimiendo la respuesta inmune antitumoral, un fenómeno denominado contraataque tumoral. ^(Restifo., 2000; Maher et al., 2002; Rabinovich et al., 2007)

Además, Andreola et al. (2002) reportaron un nuevo mecanismo de contraataque tumoral a través de la secreción de microvesículas conteniendo FasL. Los autores muestran que FasL contenido en las microvesículas pueden ser liberado durante la progresión del tumor e inducir la muerte del linfocito T. ^(Rabinovich et al., 2007)

A pesar de la evidencia que soporta el contraataque tumoral en humanos, muchos estudios han demostrado que los tumores no expresan FasL y en modelos animales al inducir la expresión de FasL en el tumor, éste es eliminado rápidamente e induce una respuesta inflamatoria en ratones; por lo que aún se requiere elucidar y definir con exactitud este mecanismo de evasión empleado por las células tumorales ^(Maher et al., 2002).

Predominancia de señales inhibitorias en el Linfocito T

El regulador central de la respuesta inmune adaptativa antitumoral es el linfocito T. Para que el linfocito T se active se requiere la ejecución de una serie de pasos específicos, ver Figura 2. De particular importancia es la participación de las señales coestimuladoras, la unión de moléculas accesorias presentes en las APCs a sus receptores presentes en el Linfocito T. Aunque las señales coestimuladoras fueron tradicionalmente vistas como eventos activadores del Linfocito T, descubrimientos recientes han destacado su dualidad: ellas pueden ser estimulantes (coestimulación) o inhibitorias (coinhibición). ^(Inman et al., 2007)

Entre estas señales coinhibitorias se encuentra la interacción del antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4), el cual se sobre expresa en linfocitos T activados, con CD80 y CD86, moléculas presentes en las APCs y la interacción del receptor de muerte programada 1 (PD-1), presente en los linfocitos T activados, con alguno de sus dos ligandos PD-L1 y PD-L2. ^(Abbas et al., 2008)

Las células tumorales expresan moléculas como PD-L1 y PD-L2 de manera que al interactuar con PD-1 se inhibe la activación del linfocito T. ^(Zou et al., 2008)

2. Antecedentes

2.1 EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE PD-1(CD 279)

PD-1 es un receptor transmembranal tipo 1 de 55-kDa miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, (Sharpe et al., 2002; Blank et al., 2005) su dominio intracelular contiene un motivo inhibitorio del inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM) y un motivo de cambio del inmunoreceptor basado en tirosina (ITSM) a través de los cuales modula señales coestimuladoras negativas en el linfocito T. (Chen., 2004; Blank et al., 2005) Por lo que la unión del TCR con un péptido antigénico presente en una molécula del MHC y de PD-1 con PD-L1 o PD-L2 resulta en la fosforilación de tirosinas, presentes en los motivos ITIM e ITSM, y en la activación de SHP-2, una fosfatasa de tirosina, que defosforila moléculas que participan en la señalización del TCR. (Sharpe et al., 2002; Blank et al., 2005) Figura 4.

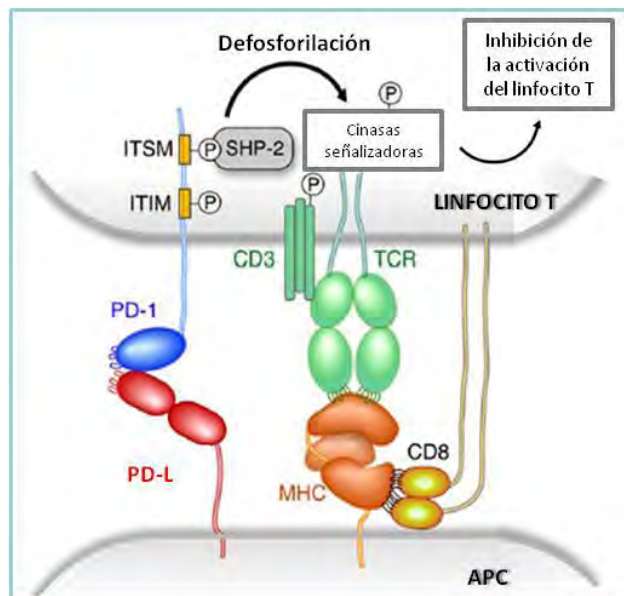


Figura 4. Estructura del receptor PD-1 y señalización mediada por su interacción con alguno de sus ligandos. Adaptado de Freeman et al., 2008.

PD-1 es expresado en linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, células NKT, células B y monocitos activados. (Sharpe et al., 2002) Diversos estudios han demostrado que los ratones deficientes en la molécula PD-1 son más susceptibles a padecer glomerulonefritis, artritis o cardiopatías, lo que sugiere que las señales transmitidas a través de PD-1 son de importancia para mantener la tolerancia periférica. (Chen., 2004; Blank et al., 2005)

Se han identificado dos ligandos para PD-1: PD-L1 (también conocido como B7-H1 o CD 274) y PD-L2 (B7-DC, CD273).

2.2 EXPRESIÓN DE PD-L1

PD-L1 es una proteína perteneciente a la familia B7, por lo que también se denomina como B7-H1; sin embargo, para enfatizar la interacción con su receptor comúnmente se emplea el término PD-L1.

El mRNA codificante para PD-L1 es expresado en muchos tejidos y órganos en humanos y ratones como corazón, placenta, músculo, hígado fetal, bazo, nódulos linfáticos y timo para ambas especies, así como en hígado, pulmón y riñón en ratones (Chen., 2004; Orozco et al., 2007), mientras que la proteína PD-L1 se expresa en las siguientes células una vez activadas: linfocitos T, linfocitos B, DCs, MØs y células NK. Además, PD-L1 se expresa en células del endotelio vascular, células epiteliales, hepatocitos, células del islote pancreático, células musculares y en sitios inmunoprivilegiados (como córnea, retina y placenta). (Sharpe et al., 2007; Zou et al., 2008)

La expresión de PD-L1 puede ser inducida o mantenida por muchas citocinas, de las cuales el IFN- γ tiene el mayor efecto ya que promueve la expresión de PD-L1 en la superficie de células epiteliales, células del endotelio vascular, DCs y monocitos; además, se ha observado que el tratamiento de células endoteliales con IFN- γ y TNF- α incrementan la expresión de PD-L1 (Rodig et al., 2003) y que el IFN- α y el IFN- β promueven la expresión de PD-L1 en monocitos y células dendríticas (Zou et al., 2008)

2.2 EXPRESIÓN DE PD-L2

El mRNA codificante para PD-L2 es expresado en corazón, placenta, pulmón, hígado, músculo, páncreas, bazo, ganglios linfáticos y en el timo de humanos y ratones, así como en riñón y cerebro de ratones, (Orozco et al., 2007) mientras que la proteína PD-L2 es induciblemente expresada en DCs y MØs, y se expresa constitutivamente en células del endotelio vascular. (Rodig et al., 2003; Sharpe et al., 2007) Esta limitada expresión de PD-L2 sugiere que esta molécula lleva a cabo su función principalmente en órganos linfoides. (Chen., 2004)

El factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y la IL-4 estimulan la expresión de PD-L2 en células dendríticas y macrófagos *in vitro* (Loke et al., 2003; Sharpe et al., 2007) por lo que se ha propuesto que el patrón de citocinas Th2 favorece su expresión. (Chen., 2004)

2.4 FUNCIÓN INMUNOLÓGICA DE PD-L1 Y PD-L2

A través del estudio de la interacción de PD-L1 y PD-L2 con el receptor PD-1, se ha encontrado que esta interacción transmite señales coinhibitorias en el linfocito T, inhibiendo su activación y reduciendo la producción de citocinas por linfocitos T estimulados previamente. (Blank et al., 2005)

En el caso de PD-L2, se ha reportado que, a concentraciones bajas de antígeno, la interacción de PD-L2 con PD-1 inhibe las señales transmitidas por la unión de CD80 o CD86 con CD28 y que, a concentraciones elevadas de antígeno, la interacción de PD-L2 con PD-1 reduce la producción de citocinas (IL-4, IL10 e IFN- γ) pero no inhibe la proliferación del linfocito T. (Latchman et al., 2001)

A diferencia de la interacción de PD-L2 con PD-1, el resultado de la interacción de PD-L1 con PD-1 ha sido más estudiada y su efecto en los linfocitos T se ha asociado a seis mecanismos distintos. (Zou et al., 2008) Ver Figura 5.

Inducción de apoptosis en el linfocito T

Este mecanismo se demostró mediante el cocultivo de líneas celulares tumorales PD-L1 positivas con linfocitos T PD-1 positivos específicos del tumor, ya que se observó una disminución en el porcentaje de linfocitos T apoptóticos debido al bloqueo de PD-L1 en las células tumorales. (Dong et al., 2002) Estudios subsecuentes han demostrado que la apoptosis mediada por PD-L1 es un proceso fisiológico empleado para mantener la homeostasis en los tejidos periféricos y que esta apoptosis puede ser dependiente o independiente de PD-1. (Dong et al., 2002; Zou et al., 2008)

Los detalles de los mecanismos moleculares de la apoptosis mediada por PD-L1 aún no son comprendidos, y pueden ocurrir indirectamente o a través de una vía no caracterizada. (Freeman et al., 2006)

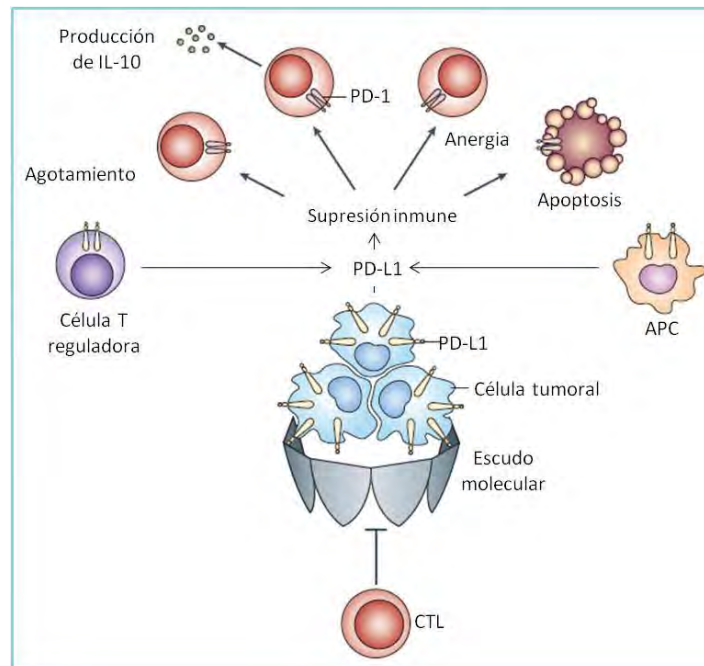


Figura 5. Mecanismos mediante los cuales la interacción de PD-1/PD-L1 inhibe la activación del linfocito T. Las células tumorales y las células presentadoras de antígeno expresan niveles elevados de PD-L1. Los mecanismos mediante los cuales PD-L1 inhibe la activación del linfocito T han sido determinados en varios modelos *in vivo* e *in vitro* y es probable que las células que expresan PD-L1 empleen más de un mecanismo para inhibir la activación del linfocito T. Adaptado de Zou et al., 2008.

Anergia

La anergia representa un mecanismo de tolerancia periférica que mantiene a los linfocitos T en un estado inactivo ^(Zheng et al., 2008) asociado con defectos en el ciclo celular y en la función efectora del linfocito T ^(Fathman et al., 2007). Debido a la expresión inducible de la proteína PD-L1 en tejidos periféricos y a la expresión de PD-1 en linfocitos T activados, inicialmente se asumió que la interacción de PD-1 presente en los linfocitos T efectores con PD-L1 en los órganos periféricos inducía un estado de anergia exclusivo para estos órganos. Sin embargo, estudios recientes indican que la expresión de PD-1 puede ser inducida en los linfocitos T activados que aún se encuentran en los órganos linfoides. Por lo que la interacción de PD-1 con PD-L1 regula el estado de anergia tanto en la fase efectora como en la fase de activación del linfocito T.

Agotamiento

El agotamiento en el linfocito T fue descrito durante un proceso de infección crónica causado por el virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCMV), en el que PD-1 se expresó en linfocitos T CD8+ y en el que PD-L1 fue detectado en tejidos infectados y en órganos linfoides. Los resultados indican que debido a la señal inhibitoria transmitida por la interacción de PD-1 con

PD-L1, se observaron linfocitos T CD8+ con una actividad efectora disfuncional (en la producción de citocinas y en la proliferación). (Barber et al., 2006; Freeman et al., 2006) Además, durante procesos de infección crónica ocasionados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus linfotrópico humano tipo I, y por el virus de la hepatitis B y C se han encontrado linfocitos T CD8+ antígeno específicos no funcionales y con elevada expresión de PD-1. (Sharpe et al., 2007) Entre los factores que contribuyen al agotamiento del linfocito T se encuentran la duración de la infección, la persistencia del antígeno expuesto, la disponibilidad de células T CD4+ y el nivel de expresión de PD-1 en los linfocitos T (Freeman et al., 2006; Blank et al., 2007)

Protección de la lisis mediada por los linfocitos T citotóxicos (CTLs)

Se ha observado que la elevada expresión de PD-L1 en líneas celulares tumorales les confiere resistencia contra la lisis mediada por los CTLs. La transfección de PD-L1 en la línea celular de mastocitoma P815 de ratón disminuyó la lisis de las células tumorales cuando se cocultivaron con linfocitos T citotóxicos y la lisis de las células tumorales fue restaurada cuando se adicionó el anticuerpo bloqueador anti-PD-L1. (Dong et al., 2002; Iwai et al., 2002; Hirano et al., 2005) Además, la expresión de PD-L1 disminuyó la lisis de las células de melanoma mediada por los CTLs. (Zou et al., 2008) Esta resistencia de las células tumorales a la lisis llevada a cabo por los CTLs se denominó “escudo molecular” (Hirano et al., 2005) y estudios posteriores demostraron que este mecanismo es debido únicamente a la elevada expresión de PD-L1 en las células tumorales y no a la disfunción de los linfocitos T, ya que al remplazar el dominio intracelular de PD-1 y PD-L1 con el gen de la proteína verde fluorescente se observó que sólo la alteración del dominio intracelular de PD-L1 en las células tumorales las hizo más susceptibles al efecto citotóxico mediado por los CTLs. (Azuma et al., 2008)

Producción de IL-10

La producción de IL-10 se ha reportado en linfocitos T estimulados con anticuerpo anti-CD3 y cultivados con la proteína PD-L1, (Dong et al., 2002) las células dendríticas asociadas al tumor que expresan PD-L1 también inducen la producción de IL-10 en los linfocitos T. Estudios subsecuentes han establecido una correlación entre la sobreexpresión de PD-L1 y los niveles elevados de IL-10 en pacientes infectados con VIH y con el virus de la hepatitis B. Sin embargo, aún falta determinar si el incremento en la producción de IL-10 tiene un papel importante en la supresión de la respuesta de los linfocitos T mediada por PD-L1 *in vivo*.

Supresión mediada por células T reguladoras

Se ha sugerido que la expresión de PD-L1 está relacionada con el desarrollo y función de las células T_{Reg}. Se ha reportado que las células del endotelio vascular y células del epitelio gástrico que expresan PD-L1 inducen el desarrollo de células T_{Reg} en un sistema de cultivo *in vitro*. (Zou et al., 2008)

Sharma et al. (2007) reportaron que la capacidad de las células T_{Reg} para suprimir la activación del linfocito T fue eliminada al emplear el anticuerpo bloqueador anti PD-L1. (Sharma et al., 2007) Sin embargo, no se ha demostrado que PD-L1 o PD-1 sean requeridos para la actividad efectora de las células T_{Reg} *in vivo*. (Sharpe et al., 2002)

Resumiendo, este efecto inhibitorio en el linfocito T, resultado de la interacción de PD-L1 y PD-L2 con PD-1, es importante para mantener la tolerancia periférica, para evitar enfermedades autoinmunes y para prevenir el daño al tejido, mediado por la respuesta inmune en curso, durante un proceso infeccioso. (Sharpe et al., 2007) Sin embargo, no todos los ensayos apoyan el papel inhibitorio reportado para PD-L1 y PD-L2. Algunos reportes indican que estas moléculas pueden ser coestimuladoras para el linfocito T. Dong et al. (2002), estimularon linfocitos T con anticuerpo anti-CD3 y en presencia de anticuerpo anti-PD-L1 agonista inmovilizado, lo que resultó en la proliferación del linfocito T y en un incremento en la producción de IL-10, IFN- γ y de GM-CSF. De manera similar, cuando se estimularon linfocitos T con anticuerpo anti-CD3 y en presencia de anticuerpo anti-PD-L2 agonista inmovilizado la proliferación de los linfocitos T y la producción de IFN- γ se incrementó pero se observó un menor efecto en la producción de IL-2, IL-4 e IL-10. (Sharpe et al., 2002)

Una posible explicación de estos resultados tan discordantes puede ser la presencia de otro receptor para PD-L1 y PD-L2, de manera similar a la vía mediada por B7-CD28/CTLA4, con la capacidad de brindar señales estimuladoras (Sharpe et al., 2002) o bien por la posibilidad de que PD-1 medie señales positivas y negativas, resultado de las señales transmitidas por el ITSM, el cual es capaz de proveer ambas señales. (Sharpe et al., 2002; Blank et al., 2005)

2.5 EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS PD-L1 Y PD-L2 EN TUMORES Y EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL

2.5.1 Expresión de PD-L1 en tumores

Se ha identificado la expresión de la proteína PD-L1 en distintos tipos de cáncer y diversos estudios clínicos han mostrado que la expresión de PD-L1 tiene implicación inmunológica, clínica o patológica, (Tabla 2); (Blank et al., 2007) aunado a esto, en nuestro grupo de trabajo se ha determinado la expresión de PD-L1 en una proporción elevada de líneas celulares de cáncer pulmonar^(Sandoval-Vázquez., 2009), lo que sugiere que los tumores emplean esta molécula para favorecer su proliferación descontrolada.

2.5.2 Regulación de la expresión de PD-L1 en tumores

Dentro del microambiente tumoral hay una gran variedad de citocinas, de las cuales el IFN- γ tiene una función importante ya que incrementa la expresión de PD-L1 en líneas celulares tumorales provenientes de leucemia^(Tamura et al., 2005), glioma^(Wintterle et al., 2003), cáncer de colon, cáncer de piel y cáncer de duodeno^(Dong et al., 2002)

Tabla 2. Expresión de PD-L1 en tumores humanos y su asociación inmunológica, clínica o patológica.

Tipo de cáncer.	Casos PD-L1+/ Total de casos.	Asociación inmunológica, clínica o patológica.	Referencias
Cáncer de mama	24/56	El número de linfocitos T PD-L1+ correlaciona directamente con el tamaño del tumor.	(Zou et al., 2008)
Cáncer gástrico	45/105	Expresión de PD-L1 correlaciona con el incremento en el tamaño del tumor, metástasis y menor supervivencia.	(Sun et al., 2006; Zou et al., 2008)
Glioma	10/10	Expresión de PD-L1 en células tumorales inhibe la activación de los linfocitos T in vitro.	(Winterle et al., 2003)
Leucemia	17/30	La expresión de PD-L1 en las células tumorales no tiene efecto en la activación del linfocito T in vitro.	(Zou et al., 2008)
Cáncer pulmonar	86/87	No se encontró relación entre la expresión de PD-L1 y alguna variable clínico patológica o con la supervivencia post-operatoria. Las regiones tumorales PD-L1+ contienen una menor cantidad de TILs en NSCLC. Sin embargo, el porcentaje de TILs PD-1+ fue menor en las regiones tumorales PD-L1+.	(Konishi et al., 2004)
Mieloma múltiple	82/82	Células plasmáticas PD-L1+ inhiben la activación de las células T in vitro.	(Zou et al., 2008)
Cáncer esofágico	18/41	La expresión de PD-L1 se relaciona con un pobre pronóstico.	(Ohigashi et al., 2005)
Cáncer de ovario.	82/93	La expresión de PD-L1 en las células tumorales se asoció con una disminución en el número de linfocitos T en el tumor y con un pobre pronóstico.	(Hamanishi et al., 2007)
Cáncer pancreático	20/51	La expresión de PD-L1 en las células tumorales se relacionó con una disminución en el número de linfocitos T CD8+ en el tumor y con un pobre pronóstico.	(Nomi et al., 2007)
Carcinoma de células renales	130/196	La expresión de PD-L1 por las células tumorales está relacionada con un pobre pronóstico.	(Thompson et al., 2006)
Carcinoma urotelial	142/268	La expresión de PD-L1 en las células tumorales se asoció con un estadio avanzado, recurrencia y pobre supervivencia.	(Inman et al., 2007)

2.5.3 Funcionalidad de PD-L1 en tumores

Debido a la elevada expresión de PD-L1 en distintos tipos de tumores, se ha determinado la funcionalidad de PD-L1 (Tabla 3) mediante el bloqueo de la interacción entre PD-1 y PD-L1. Este bloqueo resultó en la inhibición del crecimiento del tumor, en el incremento de la secreción de citocinas y en favorecer la activación del linfocito T.

Tabla 3. Determinación de la funcionalidad de PD-L1 expresada en distintos tipos de tumores.

Tipo de cáncer	Estudio	Referencias
Cáncer pancreático	Se empleó un modelo de adenocarcinoma pancreático murino y se observó que el bloqueo de PD-L1 indujo un efecto antitumoral <i>in vivo</i> inhibiendo el crecimiento del tumor. La expresión de IFN- γ , Granzima B y Perforina fueron significativamente más altas en los tumores tratados con el anticuerpo anti-PD-L1.	(Nomi et al., 2007)
Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello	El bloqueo de PD-L1 con un anticuerpo neutralizante incrementó la actividad antitumoral de los linfocitos T transferidos en un modelo murino.	(Strome et al., 2003)
Cáncer gástrico y de mama	Se empleó un cocultivo de linfocitos T CD8+ y líneas celulares tumorales provenientes de carcinoma de mama y se observó que el bloqueo de PD-L1 disminuyó el porcentaje de linfocitos T CD8+ apoptóticos.	(Sun et al., 2006)
Glioma	Se emplearon cocultivos de células del glioma con linfocitos T CD4+ y CD8+ y se observó que al bloquear la proteína PD-L1 presente en las células del glioma se incrementó la producción de citocinas (IFN- γ , IL-2, IL-10) y los niveles de expresión de CD69.	(Wintterle et al., 2003)
Retinoblastoma	Efectuaron un cocultivo de linfocitos T CD3 positivos y la línea celular de retinoblastoma Y-79, y se observó que la proliferación de los linfocitos T CD3+ se incrementó al emplear el anticuerpo antagonista anti-PD-L1.	(Usui et al., 2006)
Melanoma	El bloqueo de PD-1 incrementa la proliferación y función de las células T específicas del tumor.	(Blank et al., 2007; Zou et al., 2008)

2.5.4 Expresión de PD-L2 en tumores

La contribución de la expresión de PD-L2 en células tumorales en evadir la inmunidad antitumoral es menos conocida que la de PD-L1; sin embargo, se ha determinado su expresión en algunos tipos de tumores (Tabla 4), lo que se sugiere que además de su función en órganos linfoides, PD-L2 participa en favorecer la supervivencia de las células tumorales.

Tabla 4. Expresión de PD-L2 en tumores humanos y su asociación inmunológica, clínica o patológica.

Tipo de cáncer.	Casos PD-L2+/ Total de casos.	Asociación inmunológica, clínica o patológica.	Referencias
Cáncer pulmonar	4/52	No se encontró relación entre la expresión de PD-L2 y alguna variable clínico patológica o con la supervivencia post-operatoria.	(Konishi et al., 2004)
Cáncer esofágico	18/41	La expresión de PD-L2 se relaciona con un pobre pronóstico y las regiones tumorales PD-L2+ contienen una menor cantidad de TILs	(Ohigashi et al., 2005)
Cáncer de ovario.	26/70	La expresión de PD-L2 en las células tumorales se asoció con un pobre pronóstico.	(Hamanishi et al., 2007)
Cáncer pancreático	14/51	No se encontró alguna correlación entre la expresión de PD-L2 y la supervivencia del paciente.	(Nomi et al., 2007)

3. Justificación

El cáncer pulmonar es el tipo de cáncer que tiene la tasa más alta de mortalidad y presenta una elevada incidencia. La proliferación descontrolada de las células tumorales es una manifestación de que estas células han evadido a la respuesta inmune. Dentro de las células que conforman al sistema inmune se encuentra el linfocito T, el cual es la principal célula encargada de eliminar a las células tumorales; sin embargo, recientemente se ha descrito que la expresión de moléculas como PD-L1 y PD-L2 en las células tumorales evita la activación del linfocito T afectando así la respuesta inmune en contra de ellas. Se ha determinado la expresión de PD-L1 y PD-L2 en distintos tipos de cáncer y la expresión de PD-L1 se ha relacionado con un pobre pronóstico, aunque en algunos tipos de cáncer la expresión de PD-L2 está relacionada con un pobre pronóstico aún no está completamente definida su relación. En el caso del cáncer pulmonar se desconoce si la expresión de PD-L1 y PD-L2 es regulada por alguna citocina y si la actividad funcional de PD-L1 modifica la respuesta del linfocito T. Por lo que en este estudio se determinará si el IFN- γ , una citocina presente en el microambiente tumoral, modifica la expresión de PD-L1 y de PD-L2. Además se evaluará la actividad funcional de PD-L1, expresado en las células tumorales de carcinoma pulmonar, en el linfocito TCD8+.

El conocer más acerca de los mecanismos que emplean las células tumorales para evadir a la respuesta inmune nos permitirá en un futuro mejorar e incluso crear nuevas estrategias terapéuticas que favorezcan o restablezcan la salud de los pacientes con cáncer.

4. Hipótesis

Si en las líneas celulares de carcinoma pulmonar el IFN- γ modifica la expresión de las moléculas PD-L1 y PD-L2 y si PD-L1 tiene actividad funcional, entonces, el IFN- γ incrementará la expresión de PD-L1 y PD-L2, a nivel de mRNA y proteína, y PD-L1 disminuirá la actividad del linfocito TCD8+.

5. Objetivos

Objetivo general

Determinar el efecto del IFN- γ en la expresión del mRNA y de las proteínas PD-L1 y PD-L2 en líneas celulares de carcinoma pulmonar así como la funcionalidad de la molécula PD-L1.

Objetivos particulares

- Estudiar la expresión del mRNA para PD-L1 y PD-L2 en líneas celulares de carcinoma pulmonar.
- Determinar el efecto del IFN- γ en la expresión del mRNA para PD-L1 y PD-L2.
- Determinar el efecto del IFN- γ en la expresión de las proteínas PD-L1 y PD-L2.
- Evaluar la actividad funcional de PD-L1 expresada en las líneas celulares de carcinoma pulmonar sobre el linfocito T CD8+.

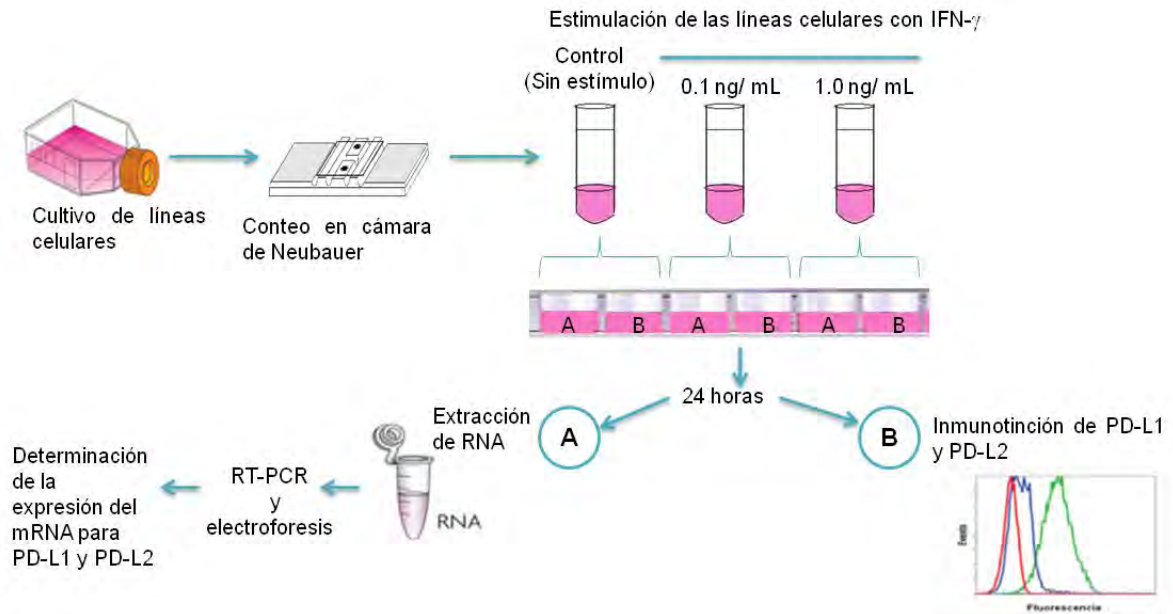
6. Estrategia experimental

6.1 Estimulación de las líneas celulares tumorales con IFN- γ

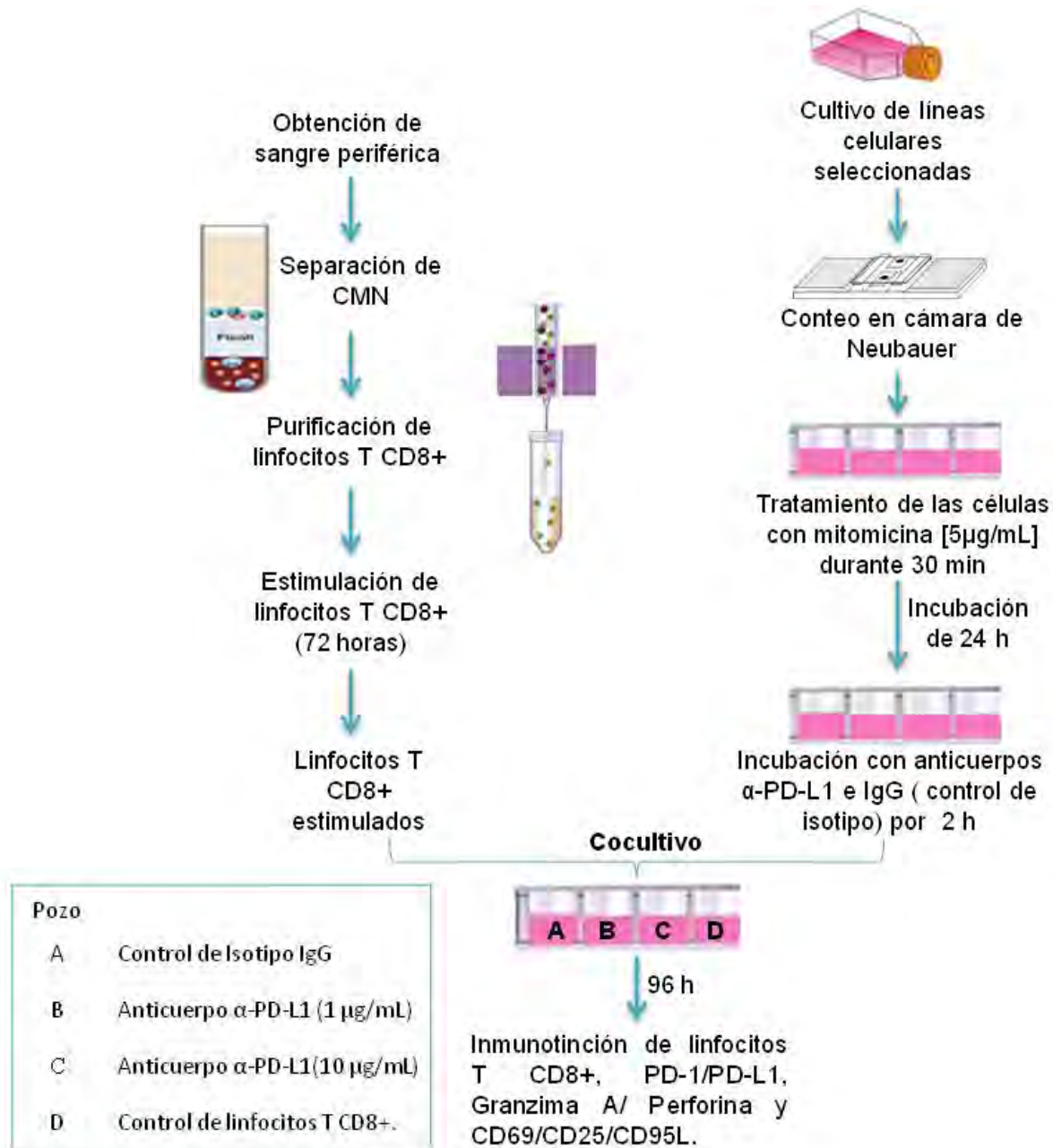
Elección de las líneas celulares a emplear



Estimulación de las líneas celulares seleccionadas con IFN- γ



6.2 Evaluación de la funcionalidad de PD-L1



7. Materiales y métodos

7.1 CULTIVO CELULAR

Se cultivaron 11 líneas celulares de carcinoma pulmonar, cinco de las cuales se adquirieron comercialmente de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA): A-427, A-549, SKLU-1, SKMES y Calu-1, mientras que las seis restantes se establecieron a partir del derrame pleural de pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar: 1.3.15, 1.3.11, 3A5A, OSJV-1, 3B1A y AJG-1. Además se empleó la línea celular de monocitos U-937.

Las células se mantuvieron en medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis Mo, USA) suplementado con Suero Fetal Bovino (HyClone, Utah, USA) al 10% y una mezcla de antibióticos constituida por 100 µg/mL estreptomina y 100 U/mL de penicilina; se incubaron en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a una temperatura de 37°C. Todas las líneas celulares tumorales empleadas mostraron características adherentes, por lo que se separaron de la caja de cultivo celular empleando una solución de Tripsina-Verseno (Invitro, D.F.) y agitación mecánica cuando las células llegaron a confluencia. Posteriormente, se tomó una alícuota para cuantificar las células y determinar su viabilidad empleando tinción con azul tripano y conteo en cámara de Neubauer.

7.2 ANTICUERPOS

Durante el desarrollo experimental se emplearon los siguientes anticuerpos: anti-PD-L1 (PE) clona MIH1, anti-PD-L2 (PE) clona MIH18, anti-CD3 clona UCHT1, anti-CD28 clona CD28.2, anti-PD-1(FITC) clona MIH4, anti-CD95L (PE) clona NOK-1; como controles de isotipo se emplearon los anticuerpos mouse IgG1κ (PE) clona P3 y mouse IgG1κ (FITC) clona P3 adquiridos de eBioscience, San Diego, CA, USA; anti-CD3 (FITC) clona UCHT-1, anti-CD4 (PE) clona Q4120 y anti-CD8 (QR) clona UCHT-4 adquiridos de Sigma Chemical, St. Louis Mo, USA; anti-CD69 (FITC) clona FN50, anti-CD25 (Cychrome) clona M-A251, anti-Granzima A (FITC) clona MOPC-21 y anti-Perforina (PE) clona 27-35, adquiridos de BD PharMingen, San Diego, USA; anti-PD-L1 clona 29E.2A3 adquirido de BioLegend, San Diego, CA, USA; mouse IgG1 clona 11711.11 adquirido de R&D Systems, Minneapolis, USA.

7.3 ESTIMULACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES CON IFN- γ

Las células tumorales se ajustaron a una concentración de 1×10^5 células/mL y se estimularon con IFN- γ (PeproTech, USA) empleando las concentraciones de 0.1 ng/mL y 1.0 ng/mL, se incubaron por 24 horas en placas de 24 pozos manteniendo un volumen final de 1.0 mL por pozo. Después del tiempo de incubación, las células se recuperaron para determinar la expresión del mRNA para PD-L1 y PD-L2, así como la expresión de las proteínas PD-L1 y PD-L2 mediante RT-PCR y citometría de flujo, respectivamente.

7.4 EXTRACCIÓN DE RNA, RETROTRANSCRIPCIÓN (RT) Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

7.4.1 Extracción de RNA

Para recuperar a las células tratadas con IFN- γ o a las células sin tratamiento, se retiró el sobrenadante de cada uno de los pozos, se adicionaron 500 μ L de TRIzol Reagent (Invitrogen, CA, USA) y se resuspendió hasta que la monocapa celular de cada condición se lisara. Cada una de las muestras se almacenó a -78°C hasta su uso. La extracción del RNA se realizó por el método de fenol-cloroformo, de la siguiente manera:

Se descongelaron las muestras a temperatura ambiente y a cada una se le adicionó 100 μ L de cloroformo, se agitó vigorosamente y se centrifugaron a 12 000 rpm durante 15 min a 4°C .

Después de centrifugar, las muestras se separaron en dos fases, la fase orgánica (inferior) y la fase acuosa (superior); cuidadosamente se recuperó la fase acuosa y se adicionó 250 μ L de isopropanol, con la finalidad de precipitar el RNA. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min y después se centrifugaron a 12 000 rpm durante 10 min a 4°C .

Se eliminó el sobrenadante y el pellet obtenido se lavó con 500 μ L de etanol al 75% (v/v), se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 min a 4°C y, después de eliminar el sobrenadante, el pellet se dejó secar a temperatura ambiente.

El RNA obtenido se disolvió en 50 μ L de agua tratada con dietil pirocarbonato ($\text{H}_2\text{O}/\text{DEPC}$) a 60°C durante 10 min. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

El RNA se cuantificó por espectrofotometría (espectrofotómetro, Unicam UV 300, Thermo Spectronic), para lo cual se determinó la absorbancia a dos longitudes de onda: 280 nm (para

proteínas) y 260nm (para ácidos nucleicos), obteniéndose la concentración total de nucleótidos y su pureza.

7.4.2 RT-PCR

A partir del RNA total se realizó la síntesis de DNA complementario (cDNA) mediante RT, de la siguiente manera:

- Unión del primer (Oligo dT) al RNA: Se adicionó 1 μ g de RNA, 1 μ L de Oligo dT y H₂O/ DEPC, se incubó a 70°C durante 10 min.
- Extensión del primer mediante la incorporación de nucleótidos complementarios: Transcurridos los 10 min de incubación, se agregó 8.3 μ L de la siguiente mezcla de reacción: Buffer RT 5X, DTT 2 mM, desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) 25 mM, 25 U de inhibidor de RNasa y 200 U de reverso transcriptasa. La síntesis de cDNA consistió de un ciclo a 22°C durante 10 minutos y la extensión a 37°C durante 60 min.

Se empleó 1 μ L del cDNA obtenido para efectuar el PCR con la finalidad de amplificar los fragmentos de las secuencias codificantes para PD-L1, PD-L2 y β -actina, empleando 0.5 μ L de cada uno de los siguientes oligonucleótidos sentido/antisentido:

PD-L1 5' –ACGCATTTACTGTCACGGTTCC 3' / 5' GACTTCGGCCTTGGGGTAGC-3'

PD-L2 5' –GAAGGCCTCGTTCCACATACC 3' / 5' TAGGGCTATCACTGTGGCTATG-3'

β - actina 5'-GGGTCAGAAGGATTCCTATG 3' / 5' GGTCTCAAACATGATCTGGG -3'

Los productos amplificados tienen los siguientes pesos: PD-L1 446 pb, PD-L2 481 pb y β -actina 214 pb. El amortiguador de reacción del PCR (24 μ L) constó de amortiguador PCR 10 X, MgCl₂ 50 mM, dNTPs 0.2 mM, 1.0 μ L del cDNA obtenido en la RT y 1.25 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen, CA, USA).

El PCR consistió de los siguientes eventos:

- Un ciclo inicial a 94°C durante cinco min.
- Desnaturalización del cDNA a 94°C durante un min.
- Alineamiento de los primers: Para PD-L1 y β -actina se empleó una temperatura de 60°C y para PD-L2 se empleó una temperatura de 62.5 °C durante 1.5 min.
- Extensión: a 72°C durante 1 min.

Los últimos tres pasos anteriormente mencionados constituyen un ciclo. Este proceso se repitió por un total de 30 ciclos con una extensión final a 72°C durante 10 min.

7.4.3 Electroforesis

Se llevó a cabo la electroforesis del producto amplificado empleando una alícuota de 10 μL de cada muestra y un gel de agarosa al 1.2% con bromuro de etidio. Las bandas obtenidas en la electroforesis del DNA fueron detectadas bajo luz UV y analizadas por densitometría en el fotodocumentador Chemi Doc XRS (BioRad, Hercules, CA, USA).

7.5 SEPARACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES (CMN) Y PURIFICACIÓN DE LINFOCITOS T CD8+

Se obtuvo sangre periférica de sujetos sanos y se efectuó la separación de las CMN mediante centrifugación sobre gradientes de Ficoll-Hypaque. Las CMN obtenidas se mantuvieron en congelación para su uso posterior.

La purificación de los linfocitos T CD8+ a partir de las CMN se realizó mediante selección negativa empleando perlas magnéticas (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA). De manera general, se realizó lo siguiente para llevar a cabo esta metodología:

- Las CMN se resuspendieron en PBS libre de Ca^{2+} , Mg^{2+} y con EDTA 20 mM para obtener una concentración de 1×10^7 células/mL, se adicionó un cóctel de anticuerpos monoclonales conjugados a biotina (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) dirigidos contra células CD4+, CD11b+, CD16+, CD19+, CD36+ y CD56+ y se incubó durante 10 min en hielo.
- Posteriormente se adicionó PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} y anticuerpos anti-biotina conjugados a perlas magnéticas y se incubó durante 15 min en hielo.
- Se realizó un lavado con PBS, se resuspendió en PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} , y la suspensión celular se colocó en una columna de separación colocada en un campo magnético.
- Los linfocitos T CD8+ que constituían la fracción negativa fueron eluidos de la columna y se lavaron con PBS.

Se determinó la pureza de los linfocitos T CD8+ purificados empleando una inmunotinción con los anticuerpos anti-CD3 (FITC), anti-CD4 (PE) y anti-CD8 (QR), la pureza siempre fue mayor al 95%.

7.6 ESTIMULACIÓN DE LINFOCITOS T CD8+

Para llevar a cabo la estimulación de los linfocitos T CD8+ se emplearon los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. El anticuerpo anti-CD3 se colocó en un pozo de una placa de 48 pozos a una concentración de 10 µg/mL, se incubó en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C durante 90 min. Después de este tiempo, la placa se lavó con PBS frío, se colocaron 500µL de la suspensión celular, el anticuerpo anti-CD28 se agregó a una concentración final de 5 µg/mL y la placa se incubó durante 72 horas.

7.7 TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS TUMORALES CON MITOMICINA C

Se preparó una suspensión de células tumorales (SKMES-1 o 1.3.11) a una concentración de 7.5×10^5 células/mL y se adicionó mitomicina C (Sigma-ALdrich, St. Louis Mo, USA) a una concentración de 5 µg/mL. Se incubó durante 30 min en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C. Terminado el tiempo de incubación, se efectuaron dos lavados con medio RPMI sin suplementar y las células se ajustaron a la concentración de 1.5×10^5 células por pozo en 5 pozos de una placa de 48 pozos. La placa se incubó durante 24 horas y una vez transcurrido el tiempo de incubación, se adicionó anticuerpo anti-PD-L1 a una concentración de 1 y 10 µg/mL a dos pozos distintos y a un tercer pozo se le adicionó un control de isotipo IgG a una concentración de 10 µg/mL. La placa se incubó dos horas y se lavó el exceso de anticuerpo para posteriormente iniciar el cocultivo.

7.8 COCULTIVO

Los linfocitos T CD8+ purificados y estimulados (2×10^5 células/pozo) se cocultivaron con las líneas celulares de carcinoma pulmonar 1.3.11 y SKMES-1. Los cultivos se incubaron en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C y una vez iniciado el cocultivo este tiempo fue designado como tiempo 0 h, Ver Figura 6. Transcurridas 24 horas de incubación del cocultivo, se trataron nuevas células tumorales con mitomicina C para renovar el cocultivo. A las 48 horas

de incubación, se recolectaron los linfocitos T CD8+ de cada uno de los tratamientos, se centrifugaron y el botón celular obtenido se resuspendió en 500µL de medio RPMI 1640 suplementado. Cada suspensión celular se adicionó a los pozos correspondientes, la placa se incubó 48 horas más para posteriormente recolectar los linfocitos T CD8+ provenientes de cada tratamiento y efectuar las inmunotinciones correspondientes.

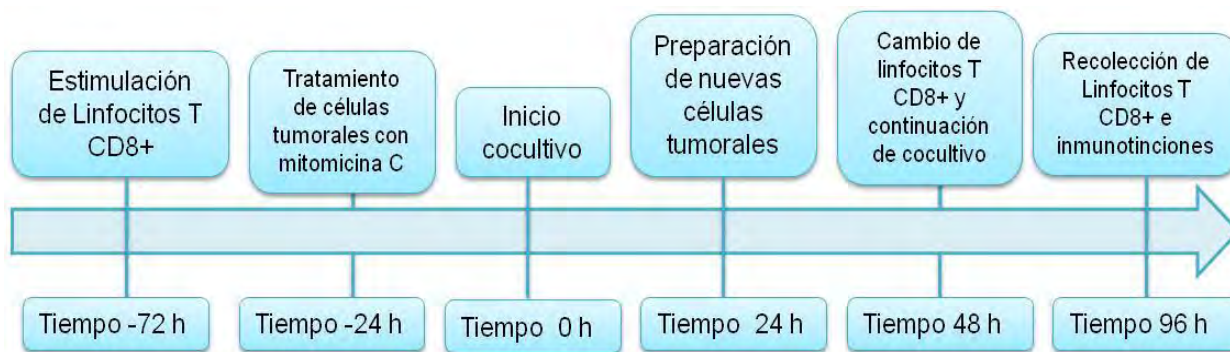


Figura 6. Representación de la metodología empleada para la realización del cocultivo.

7.9 CITOMETRÍA DE FLUJO

7.9.1 Determinación de la expresión de PD-L1 y PD-L2 en las líneas celulares de carcinoma pulmonar

Posterior a la estimulación de las células tumorales con IFN- γ , se desprendieron las células adheridas a los pozos empleando una solución de EDTA-MOPS, de cada cultivo se tomó una alícuota de 1×10^5 células viables, las cuales se resuspendieron en 100µL de amortiguador de PBS adicionado con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% y azida de sodio (Na_3N) al 0.1%. La suspensión celular se dividió en dos alícuotas para posteriormente adicionar 2µL de anticuerpo anti PD-L1 PE o 2µL de anti PD-L2 PE. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos en oscuridad. Después del tiempo de incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron. El paquete celular se resuspendió en 300µL de disolución fijadora de paraformaldehído para su posterior análisis por citometría de flujo.

7.9.2 Inmunotinción de linfocitos T CD8+ provenientes del cocultivo

Posterior al tiempo de incubación (96h) se recolectaron los linfocitos T CD8+ de cada uno de los tratamientos, se centrifugaron y se resuspendieron en 400µL de amortiguador de PBS adicionado con BSA al 1% y Na_3N al 0.1%, de esta suspensión celular obtenida para cada uno de los tratamientos se tomaron alícuotas para efectuar las siguientes tinciones:

7.9.2.1 Tinción para CD69/CD25/CD95L y PD-1/PD-L1

A cada uno de los tubos provenientes de los diferentes tratamientos se les adicionó una mezcla de los anticuerpos anti-CD69 (FITC), anti-CD25 (Cychrome) y anti-CD95L (PE) o una mezcla de los anticuerpos anti-PD-L1 (PE), anti-PD-1(FITC) y anti-CD8 (QR); se incubó a temperatura ambiente durante 30 min en oscuridad. Después de lavar, las células se fijaron con paraformaldehído al 1%.

7.9.2.2 Tinción para Granzima A/Perforina

Para el análisis de la expresión de Granzima A y Perforina intracelular, la suspensión celular de cada condición se incubó con disolución de lisis (BD Biosciences, San Diego) a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación, las células se lavaron y el botón celular se resuspendió en disolución para permeabilizar (BD Biosciences, San Diego), se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Después de lavar, las células permeabilizadas se incubaron con anticuerpos en contra de Granzima A (FITC) y Perforina (PE) durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Las células se lavaron para retirar el exceso de anticuerpo y se fijaron con paraformaldehído al 1%.

En cualquier caso, la inmunofluorescencia de la población fue analizada por citometría de flujo empleando el citómetro FACScalibur y adquiriendo 10,000 eventos por muestra. El procesamiento de los resultados obtenidos se realizó empleando el programa WinMDI 2.8.

8. Resultados

8.1 Las líneas celulares de carcinoma pulmonar expresaron el mRNA para PD-L1 y PD-L2

Se analizó la expresión del mRNA para PD-L1 y PD-L2 en 11 líneas celulares de carcinoma pulmonar mediante RT-PCR y electroforesis. Todas las líneas celulares empleadas expresaron el mRNA para PD-L1 (Figura 7A). Además, las líneas celulares 1.3.15, 1.3.11, SKLU-1, 3A5A, OSJV-1, 3B1A, Calu-1, SKMES y AJG-1 expresaron el mRNA para PD-L2, mientras que las líneas celulares A-427 y A-549 no lo expresaron (Figura 7B).

Para llevar a cabo la estimulación de las líneas celulares de carcinoma pulmonar con IFN- γ se eligieron líneas celulares que expresaran únicamente el mRNA para PD-L1 (A-549 y A-427) y líneas celulares que expresaran tanto el mRNA para PD-L1 como el mRNA para PD-L2 (1.3.11, Calu-1, SKMES, SKLU-1 y OSJV-1).



Figura 7. Expresión del mRNA para PD-L1 y PD-L2 en 11 líneas celulares de carcinoma pulmonar. El cDNA obtenido mediante RT fue amplificado usando primers específicos para PD-L1(A), PD-L2 (B) y β-actina como control de expresión endógeno (parte inferior de A y B). MP, marcadores de peso molecular.

8.2 El IFN- γ modificó la expresión de las moléculas PD-L1 y PD-L2

8.2.1 El IFN- γ incrementó la expresión del mRNA para PD-L1 y PD-L2 en líneas celulares de carcinoma pulmonar

Se llevó a cabo la estimulación de las líneas celulares de carcinoma pulmonar A-427, A-549, 1.3.11, SKMES-1, SKLU-1, OSJV-1 y Calu-1 con IFN- γ empleando las concentraciones de 0.1 y 1.0 ng/mL y se evaluó el efecto de esta citocina en la expresión del mRNA para PD-L1 y PD-L2. Para lo cual se determinó la expresión relativa del mRNA para PD-L1 y del mRNA para PD-L2 mediante la determinación de la intensidad de banda del producto para PD-L1 o para PD-L2 con respecto a la intensidad de banda del producto para β -actina.

En la Figura 8 se muestra un ejemplo representativo del análisis de la expresión del mRNA para PD-L1 y del mRNA para PD-L2 obtenida para cada condición en la línea celular OSJV-1.

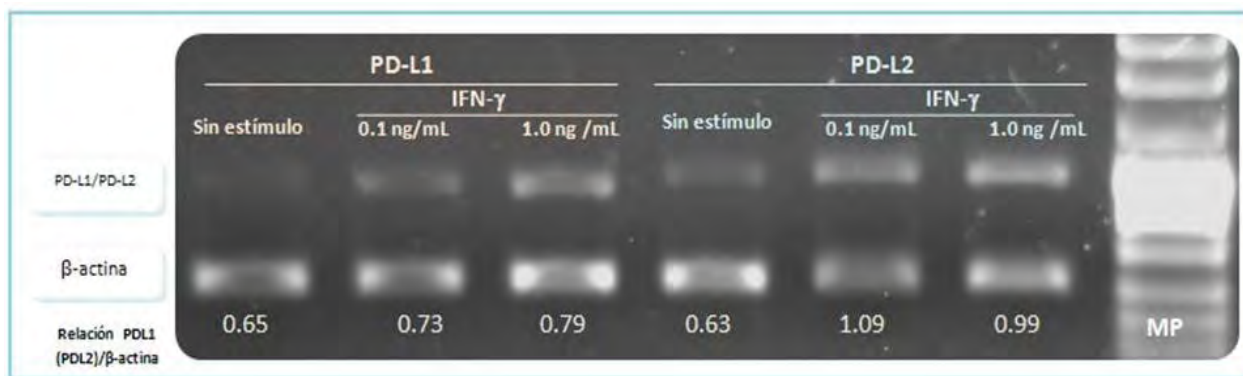


Figura 8. Expresión del mRNA para PD-L1 y PD-L2 en la línea celular OSJV-1 sin estimular y estimulada con IFN- γ a las concentraciones de 0.1 ng/mL y 1.0 ng/mL. Después de tratar a la línea celular OSJV-1 con IFN- γ , se llevó a cabo la extracción del RNA total, RT-PCR y electroforesis para detectar la expresión del mRNA para PD-L1, PD-L2 y de β -actina. Debajo de cada banda se muestra la relación PDL1 o PDL2 / β -actina obtenida para cada condición mediante densitometría. MP, marcadores de peso molecular.

La expresión relativa del mRNA para PD-L1 y PD-L2 se determinó en las siete líneas celulares de carcinoma pulmonar en estudio (Tabla 5) y, en general, se encontró que la expresión del mRNA para PD-L1 y PD-L2 se incrementó en respuesta al estímulo con IFN- γ .

Por una parte, se observó un incremento en la expresión del mRNA para PD-L1 debido al tratamiento con IFN- γ en las líneas celulares A-427, A-549, SKMES-1, SKLU-1 y OSJV-1, este incremento en la expresión del mRNA para PD-L1 se observó cuando se utilizó la concentración de 1.0 ng/mL de IFN- γ , excepto en la línea celular SKLU-1 ya que en esta línea celular se observó un mayor incremento en la expresión del mRNA para PD-L1 empleando la concentración de IFN- γ de 0.1 ng/mL. En contraste, se encontró que en las líneas celulares

1.3.11 y Calu-1 la expresión del mRNA para PD-L1 disminuyó ligeramente en respuesta al tratamiento con IFN- γ .

En cuanto al efecto del IFN- γ en la expresión del mRNA para PD-L2, se encontró que en las líneas celulares 1.3.11, OSJV-1, SKMES-1 y SKLU-1 se incrementó la expresión del mRNA para PD-L2, esta expresión fue mayor en las primeras dos líneas cuando se trataron a la concentración de 0.1 ng/mL, mientras que en las líneas celulares SKMES-1 y SKLU-1 la expresión del mRNA para PD-L2 fue mayor a la concentración de 1.0 ng/mL. En cambio, la línea celular Calu-1 disminuyó la expresión del mRNA para PD-L2 cuando fue tratada con IFN- γ (Tabla 5).

Tabla 5. Expresión relativa del mRNA para PD-L1 y PD-L2 en líneas celulares de carcinoma pulmonar sin estimular y estimuladas con IFN- γ .

Línea celular	PD-L1			PD-L2		
	Sin estímulo	IFN- γ (ng/mL)		Sin estímulo	IFN- γ (ng/mL)	
		0.1	1.0		0.1	1.0
A-427	0.52	0.54	0.63	ND	ND	ND
A-549	0.79	0.79	0.94	ND	ND	ND
SKMES-1	0.64	0.65	0.91	0.61	0.64	0.70
SKLU-1	0.78	1.08	0.86	0.72	0.92	1.27
OSJV-1	0.65	0.73	0.79	0.63	1.09	0.99
1.3.11	4.71	4.13	4.49	0.27	1.12	0.83
Calu-1	1.44	1.27	1.37	1.60	1.30	1.25

ND, no detectada

8.2.2 El IFN- γ incrementó la expresión de las proteínas PD-L1 y PD-L2 en líneas celulares de carcinoma pulmonar

Los resultados obtenidos en cuanto a la expresión relativa del mRNA para PD-L1 y PD-L2 fueron confirmados mediante el análisis de la expresión de las proteínas correspondientes, empleando citometría de flujo.

Para realizar el análisis de la expresión de PD-L1 y PD-L2 en las líneas celulares estimuladas con las concentraciones empleadas de IFN- γ , se realizó un gráfico de dispersión de la granularidad en función del tamaño celular, a partir del cual se seleccionó una región de análisis (R1) en donde la población celular era homogénea. A partir de esta región se realizaron dos histogramas del número de eventos en función de la fluorescencia de PD-L1 (Figura 9A) o de PD-L2 (Figura 9B), a partir de los cuales se obtuvo el porcentaje de células PD-L1 y PD-L2

positivas, así como la intensidad media de fluorescencia relativa (RMFI) para PD-L1 y para PD-L2, ver Tabla 6.

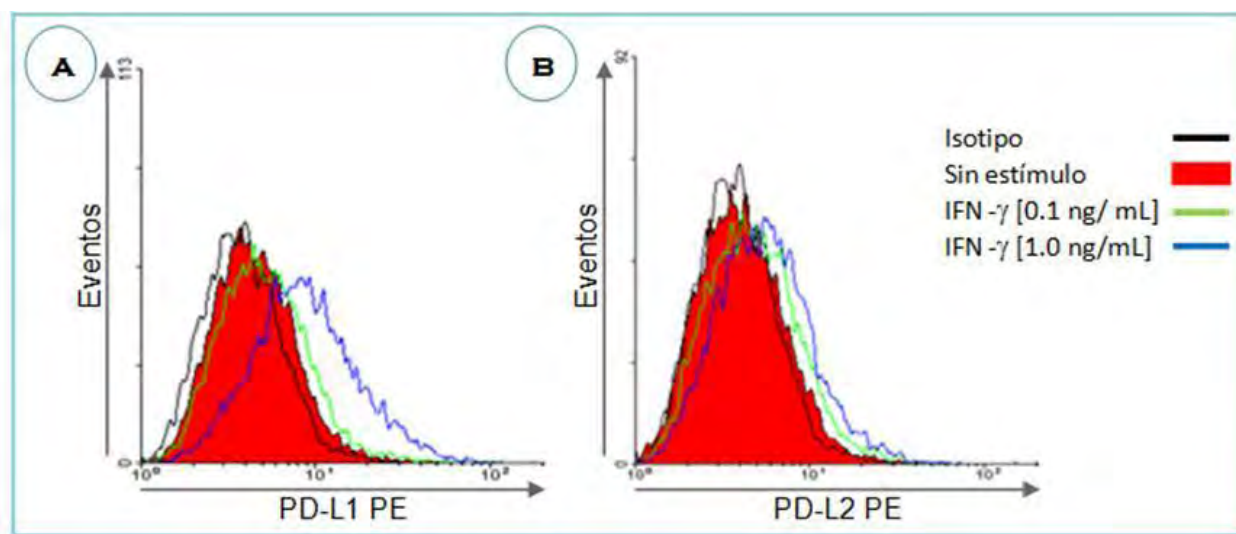


Figura 9. Efecto del IFN- γ en la expresión de las proteínas PD-L1 y PD-L2 en la línea celular OSJV-1. Las células tumorales se estimularon con IFN- γ durante 24 h y posteriormente se tiñeron con los anticuerpos anti-PD-L1 y anti-PD-L2 para su posterior análisis. **A.** Histograma del número de eventos en función de la fluorescencia para PD-L1. **B.** Histograma del número de eventos en función de la fluorescencia para PD-L2, en ambos casos se observó un incremento en la expresión de las proteínas PD-L1 y PD-L2 debido al tratamiento con IFN- γ .

En presencia de IFN- γ , la expresión de la proteína PD-L1 se incrementó en las líneas celulares A-427, A-549, SKMES-1, OSJV-1, Calu-1 y 1.3.11 de manera proporcional a la concentración de IFN- γ empleada. Mientras que en la línea celular SKLU-1, se incrementó la expresión de PD-L1 sólo al ser estimulada con la concentración de 1.0 ng/mL de IFN- γ , ver Tabla 6.

La expresión de PD-L2 se incrementó en las líneas celulares SKLU-1, OSJV-1 y Calu-1 al ser tratadas con IFN- γ , además esta citocina indujo la expresión de PD-L2 en la línea celular SKMES-1 y las tres líneas celulares restantes (A-427, A-549 y 1.3.11) no expresaron la proteína PD-L2.

Tabla 6. Expresión de PD-L1 y PD-L2 en líneas celulares de carcinoma pulmonar sin estimular y estimuladas con IFN- γ .

Línea celular	Porcentaje de células PD-L1 o PD-L2 positivas. (Intensidad media de fluorescencia relativa, RMFI)					
	PD-L1			PD-L2		
	Sin estímulo	IFN- γ (ng/mL)		Sin estímulo	IFN- γ (ng/mL)	
		0.1	1.0		0.1	1.0
A-427	33 (1.5)	49 (2.2)	56 (2.5)	ND	ND	ND
A-549	13 (1.2)	35 (2.0)	43 (4.3)	ND	ND	ND
SKMES-1	92 (7.7)	95 (15.1)	95 (27.2)	ND	44 (1.8)	53 (57.0)
SKLU-1	23 (1.3)	18 (1.2)	36 (1.5)	9 (1.1)	4 (1.0)	19 (1.2)
OSJV-1	11 (1.2)	17 (1.3)	35 (2.2)	4 (1.0)	15 (1.2)	24 (1.4)
1.3.11	83 (12.7)	84 (16.4)	84 (19.7)	ND	ND	ND
Calu-1	92 (11.7)	96 (13.8)	96 (16.2)	10 (1.1)	31 (1.6)	34 (1.8)

ND, no detectada

8.3 Determinación de la funcionalidad de PD-L1.

El bloqueo en la interacción PD-1/PD-L1 incrementó el porcentaje de linfocitos T CD8+Granzima A+ Perforina+, y disminuyó el porcentaje de linfocitos T CD8+ positivos para PD-L1.

Para determinar la funcionalidad de la molécula PD-L1 se seleccionaron las líneas celulares 1.3.11 y SKMES-1, ya que un elevado porcentaje de la población expresaba dicha molécula, ver Tabla 6. Se realizaron cocultivos, en ausencia o presencia del anticuerpo bloqueador anti-PD-L1, con linfocitos T CD8+ previamente estimulados, que expresaban PD-1, ver Figura 10A.

Además, se determinó el efecto de la mitomicina C en la expresión de PD-L1 en las líneas celulares SKMES-1 y 1.3.11, y como se muestra en la Figura 10B el tratamiento de las líneas celulares con mitomicina C no modificó la expresión de PD-L1.

Una vez terminado el tiempo de cultivo de las células tumorales con los linfocitos T CD8+ (96h), se evaluó en los linfocitos T CD8+ provenientes de cada condición la expresión de PD-1/PD-L1, de granzima A/perforina y de CD69/CD25/CD95L.

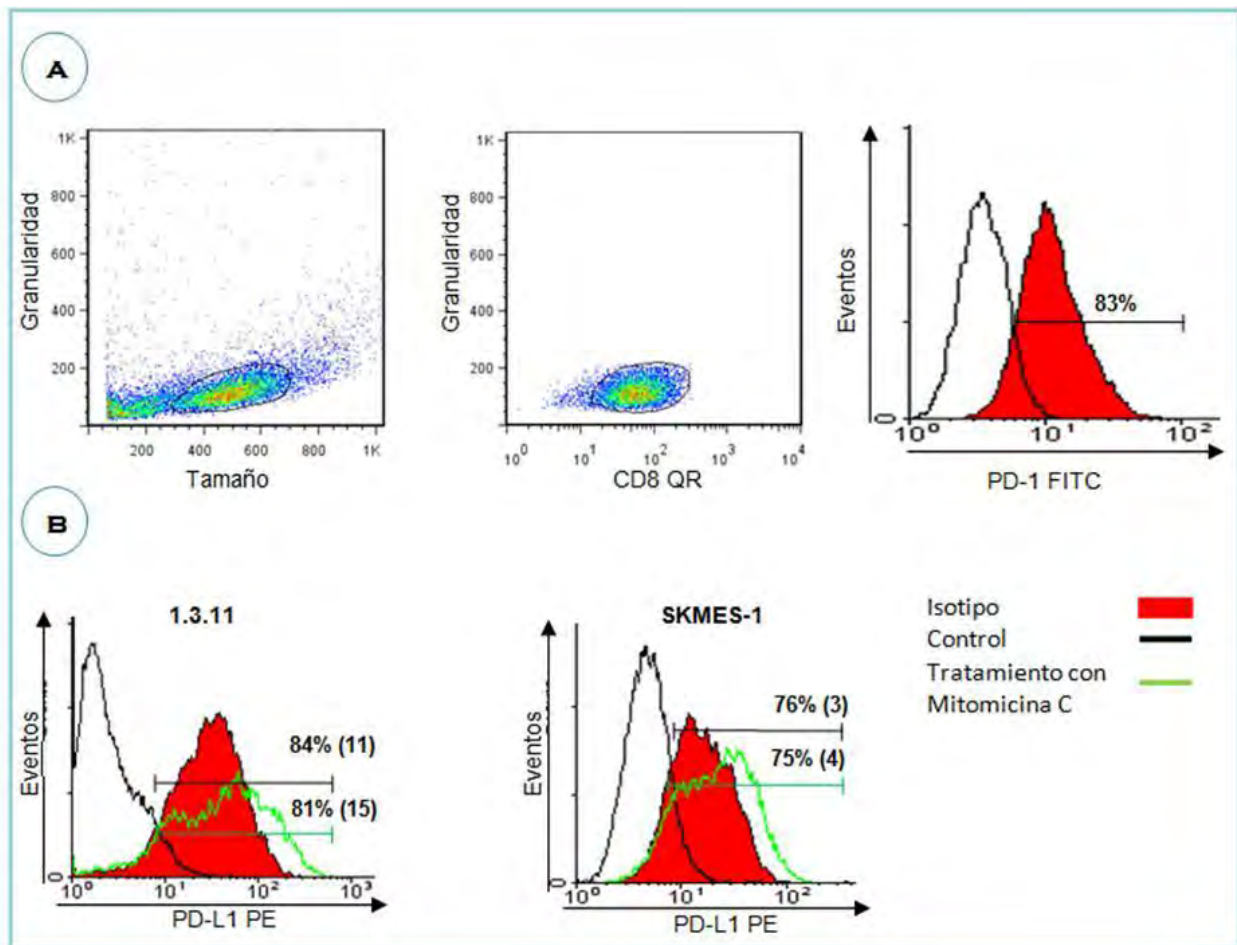


Figura 10. A. Figura representativa de la expresión de PD-1 en los linfocitos T CD8+ previamente estimulados con anticuerpo anti-CD3 y anti-CD28. Después de estimular a los linfocitos T CD8+ durante 72 h, se analizó el porcentaje de linfocitos T CD8+ PD-1+, para posteriormente iniciar su cultivo con la línea celular 1.3.11 o SKMES-1. **B.** Efecto de la Mitomicina C en la expresión de PD-L1 en las células tumorales. Las líneas celulares 1.3.11 y SKMES-1 se trataron con Mitomicina C (5 μ g/mL), durante 30 min, y se analizó la expresión de PD-L1 mediante citometría de flujo. En la figura se muestra el porcentaje de células PD-L1+ y entre paréntesis la RMFI.

Distintos reportes han sugerido que la inducción de apoptosis en el linfocito T es uno de los efectos funcionales de PD-L1. (Dong, 2002) (Sun, 2006) Sin embargo, en los cocultivos efectuados en este trabajo no se observó apoptosis de los linfocitos T CD8+, ver Figura 11.

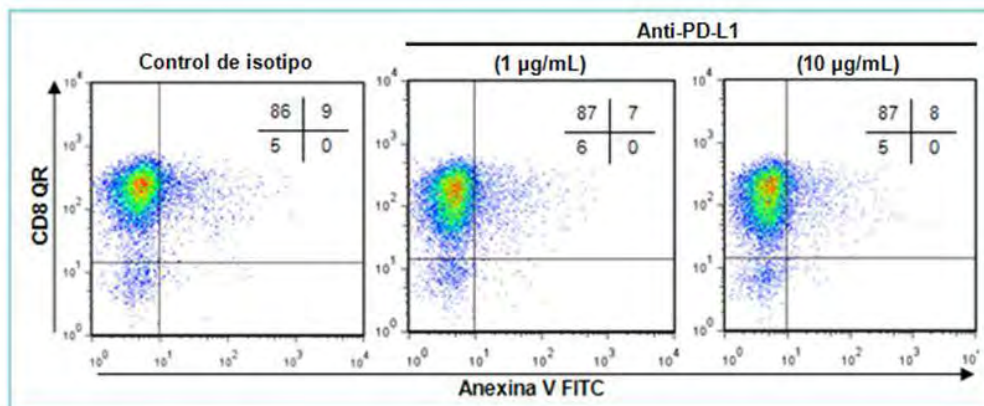


Figura 11. Evaluación de la apoptosis en linfocitos T CD8⁺, provenientes de un sujeto sano, después de su cocultivo con la línea celular SKMES-1 por 96 h.

Para determinar si la expresión de PD-L1 en las líneas celulares de carcinoma pulmonar modificaba la expresión de PD-1 o de PD-L1 en el linfocito T CD8⁺, se realizó un gráfico de dispersión de la marca de PD-L1 PE en función de PD-1 FITC, ver Figura 12.

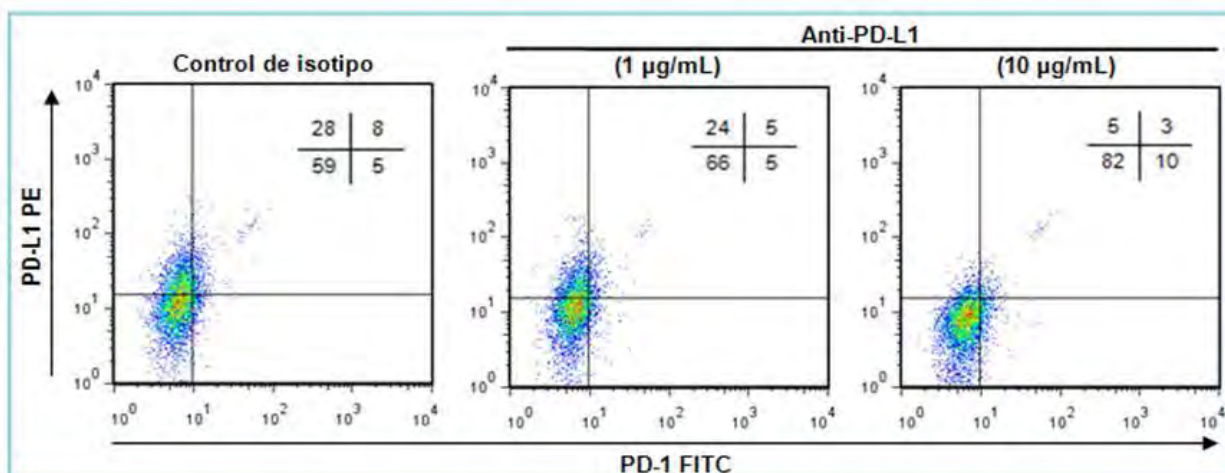


Figura 12. Análisis representativo de la expresión de PD-L1 y de PD-1 en los linfocitos T CD8⁺ provenientes del cocultivo empleando a la línea celular 1.3.11.

En los cocultivos en los cuales se bloqueó la expresión de PD-L1 en la célula tumoral se observó una disminución en el porcentaje de linfocitos T CD8⁺PD-L1⁺; en el caso de la línea celular SKMES-1 esta disminución se observó en dos de los tres cocultivos efectuados, mientras que en los tres cocultivos en los que se empleó la línea celular 1.3.11 se observó dicha disminución, ver Figura 13. Por otra parte, no se observaron diferencias en la expresión de PD-1 en los linfocitos T CD8⁺ provenientes de cada una de las condiciones de cultivo empleadas.

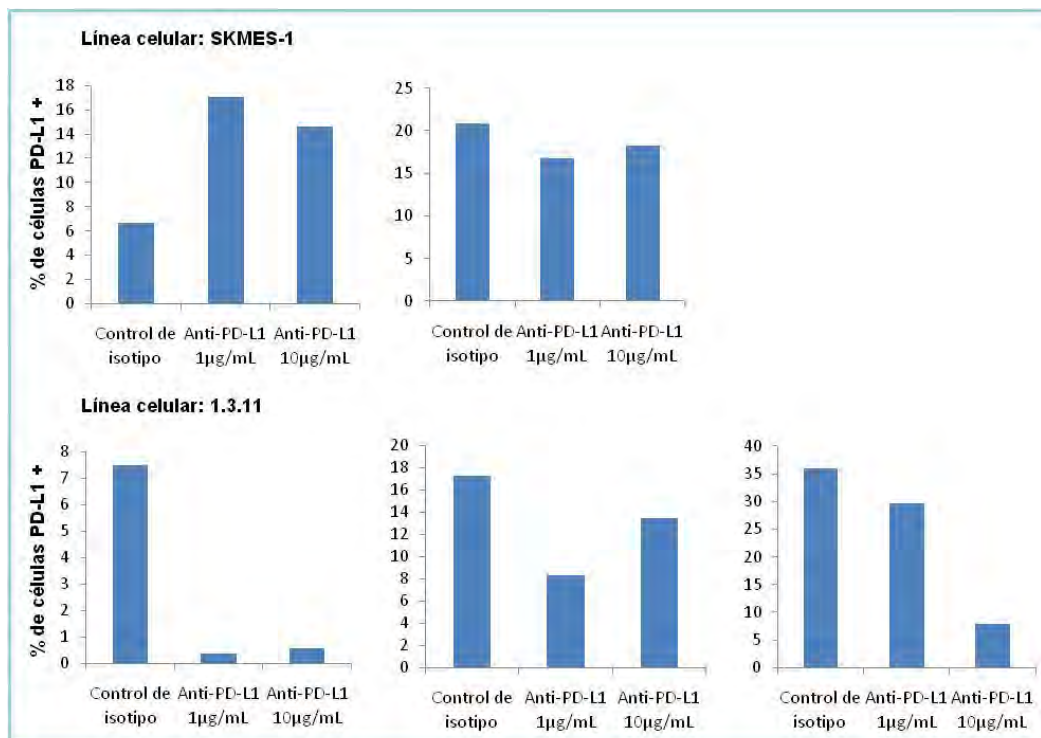


Figura 13. Modulación de la expresión de PD-1 y PD-L1 en linfocitos T CD8+ debido a la actividad funcional de PD-L1. La expresión de PD-1 y PD-L1 en los linfocitos T se evaluó 96 horas después del cocultivo de linfocitos T CD8+ obtenidos de sangre periférica de distintos donadores con la línea celular SKMES-1 (panel superior) o con la línea celular 1.3.11 (panel inferior).

Dado que los linfocitos T CD8+ tienen una importante actividad citolítica en contra de las células tumorales, se determinó si la expresión de PD-L1 en las células tumorales modificaba el porcentaje de linfocitos T CD8+ que expresaran granzima A y/o perforina. Para realizar el análisis de la expresión de granzima A y perforina, se efectuaron gráficos de dispersión de la marca de perforina PE en función de granzima A FITC, en la Figura 14 se muestra un ejemplo representativo en el que se observa que el bloqueo de PD-L1 incrementó el porcentaje de linfocitos T CD8+ granzima A +.

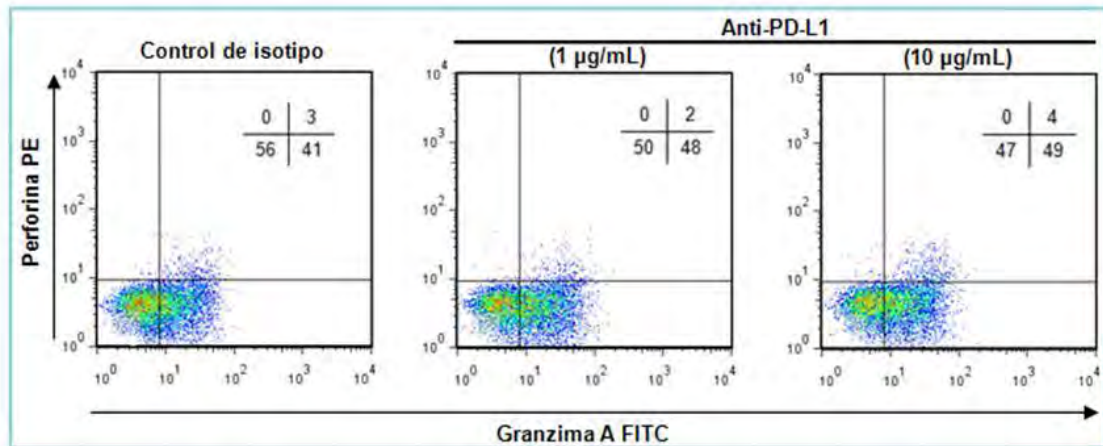


Figura 14. Análisis de la expresión de perforina PE y granzima A representativo del cocultivo de la línea celular SKMES-1 con linfocitos T CD8+.

En la Figura 15 se muestran los resultados obtenidos de los cocultivos con las líneas celulares 1.3.11 y SKMES-1, en donde se observa un incremento en el porcentaje de linfocitos T CD8+ granzima A+ (Figura 15A) y en el porcentaje de linfocitos T CD8+ perforina+ (Figura 15B) al utilizar el anticuerpo bloqueador anti-PD-L1.

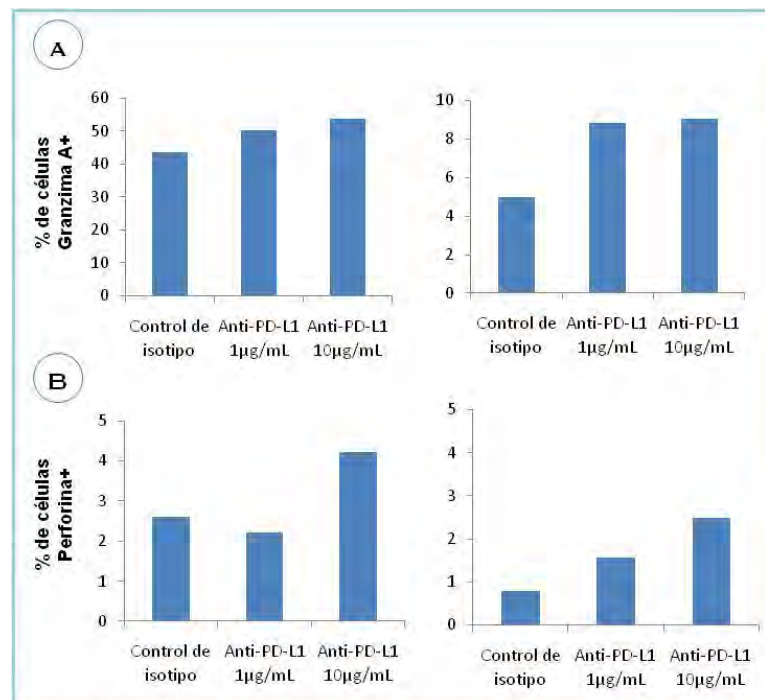


Figura 15. Efecto funcional de PD-L1 sobre la expresión de granzima A y perforina en los linfocitos T CD8+. **A.** Porcentaje de linfocitos T CD8+ granzima A+ y **B.** Porcentaje de linfocitos T CD8+ perforina+ obtenidos a partir del cocultivo de la línea celular SKMES-1 (panel izquierdo) o de la línea celular 1.3.11 (panel derecho) con linfocitos T CD8+ obtenidos de SP de distintos donadores. Estos datos son representativos de seis experimentos independientes.

Por otra parte, se evaluó si la expresión de PD-L1 en las células tumorales tenía algún efecto en la activación del linfocito T, para lo cual se determinó la expresión de CD69 y de CD25 en los linfocitos T CD8⁺ provenientes de los cocultivos; además, se analizó la expresión de CD95L en los linfocitos T CD8⁺.

Estos resultados muestran que la expresión de PD-L1 en las células tumorales no tuvo algún efecto en la expresión de los marcadores CD69 y CD25, ni en la expresión de CD95L en los linfocitos T CD8⁺ provenientes de los cocultivos, ver Figura 16.

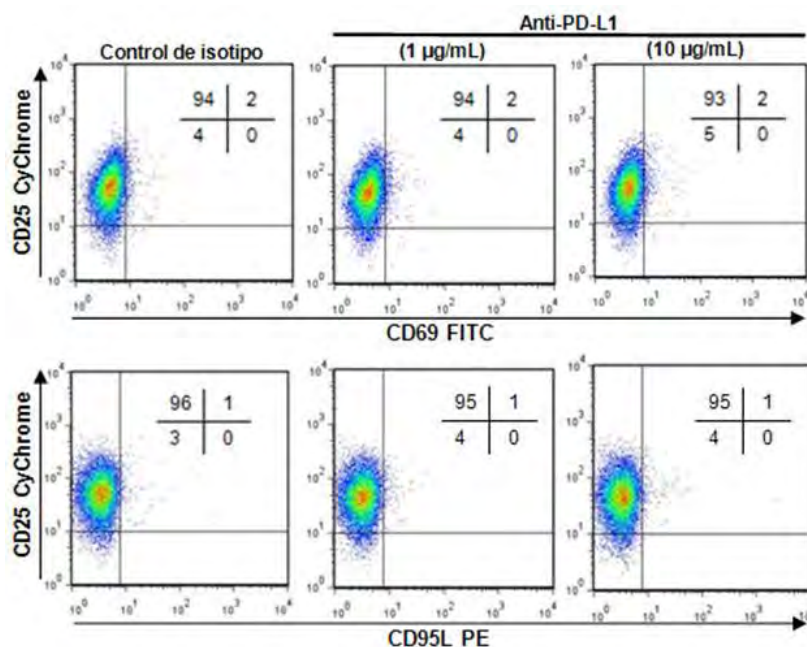


Figura 16. Análisis representativo del porcentaje de linfocitos T CD8⁺ que expresan CD25, CD69 o CD95L. Después del cocultivo de la línea celular SKMES-1 con linfocitos T CD8⁺, estos se recuperaron y se determinó el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ CD25⁺, T CD8⁺ CD69⁺ o el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ CD95L⁺ mediante citometría de flujo.

9. Discusión

Entre las distintas alteraciones genéticas que presentan las células tumorales, se encuentran aquellas asociadas a la evasión de la respuesta inmune. Anteriormente, se mencionaron diversos mecanismos empleados por las células tumorales para evadir a la respuesta inmune antitumoral, entre los cuales se encuentran la expresión de las proteínas PD-L1 y PD-L2. La identificación de moléculas en las células tumorales, que les permitan inhibir o modificar la respuesta inmune antitumoral, ha dado lugar a considerar que su manipulación permita incrementar la actividad de la inmunidad mediada por los linfocitos T.

Consistente con estudios anteriores en los cuales se reporta un incremento en la expresión de PD-L1 en líneas celulares de leucemia ^(Tamura et al., 2005), glioma ^(Wintterle et al., 2003) y retinoblastoma ^(Usui et al., 2006) debido a la estimulación con IFN- γ ; en el presente estudio se demostró que esta citocina incrementó la expresión del mRNA para PD-L1 en 5 de 7 líneas celulares y aumentó la expresión de la proteína PD-L1 en todas las líneas celulares de carcinoma pulmonar empleadas. Se observó que las líneas celulares en las que no se incrementó la expresión del mRNA para PD-L1 en respuesta al IFN- γ (1.3.11, Calu-1), la expresión relativa de dicho mRNA era elevada en condiciones sin estímulo, comparada con las demás líneas celulares empleadas; por lo que sugerimos que la estimulación de estas líneas celulares con IFN- γ incrementó el proceso de traducción, lo que se reflejó en un aumento en la expresión de la proteína PD-L1.

Por otra parte, poco se sabe acerca de las citocinas que regulan la expresión de PD-L2 en las células tumorales, pero en células endoteliales la expresión de PD-L2 se incrementa debido al tratamiento con IFN- γ y con la combinación de IFN- γ y TNF- α ^(Rodig et al., 2003). Adicionalmente, Loke et al. (2003) reportaron que la expresión de PD-L2 se incrementa en macrófagos estimulados con IL-4. En el presente estudio se observó que el IFN- γ incrementó la expresión del mRNA para PD-L2 y de la proteína PD-L2 en 4 de 7 líneas celulares de carcinoma pulmonar empleadas; no obstante, los niveles de expresión de PD-L2 fueron menores en comparación con los niveles de expresión de PD-L1. El hecho de que no todas las líneas celulares tuvieran un incremento en la expresión de PD-L2 en respuesta al estímulo con IFN- γ podría deberse a que se requiere de esta y otras citocinas para incrementar la expresión de PD-L2; o bien, la expresión de PD-L2 podría verse incrementada en presencia de un patrón de citocinas tipo Th2 como ha sido previamente reportado ^(Loke et al., 2003); adicionalmente, la expresión de PD-L2 podría

ser perjudicial para la célula tumoral, puesto que algunos estudios sugieren que, de manera contraria a la actividad inhibitoria de PD-L1, PD-L2 favorece el rechazo al tumor ya que incrementa la actividad efectora de los CTLs *in vivo* (Nomi et al., 2004). De esta forma, sería de gran interés determinar en un estudio posterior, la actividad funcional de PD-L2 y evaluar si la IL-4 incrementa la expresión de PD-L2 en las células tumorales.

El IFN- γ tiene un importante papel fisiológico en promover la respuesta inmune innata y adaptativa con la finalidad de eliminar a las células tumorales, entre los mecanismos mediante los cuales esta citocina favorece la eliminación del tumor se encuentran su capacidad para inhibir la proliferación celular, para promover la apoptosis y para inhibir la angiogénesis (Ikeda et al., 2002). Ya que en carcinoma pulmonar, los linfocitos T CD4+ y CD8+ provenientes de derrames pleurales y estimulados con PMA producen principalmente IFN- γ (Prado-García, 2005), nuestros resultados sugieren que contrario al papel antitumoral del IFN- γ en promover la respuesta inmune celular, ésta citocina incrementa la expresión de PD-L1 y PD-L2 en las líneas celulares de carcinoma pulmonar favoreciendo la supresión de la respuesta inmune y la permanencia del tumor.

Nuestros resultados muestran que la expresión de PD-L1 y de PD-L2 en las células tumorales es un evento regulado, y el entendimiento de los mecanismos que regulan su expresión puede facilitar el diseño de mejores terapias empleando la combinación del bloqueo de la expresión de PD-L1 en las células tumorales con otros regímenes terapéuticos.

En cuanto a la actividad funcional de PD-L1, Dong et al. (2002) reportaron que la expresión de PD-L1 en la línea celular de melanoma B7-H1/624 mel incrementó la apoptosis de linfocitos T CD8+ antígeno específicos, y asociaron este resultado al incremento en la expresión de CD95L en el linfocito T. Sin embargo, bajo las condiciones experimentales empleadas en este estudio, no detectamos un efecto apoptótico en los linfocitos T CD8+ cocultivados con las líneas celulares 1.3.11 y SKMES-1. Diferencias entre los sistemas experimentales del grupo de Dong y el nuestro podrían explicar estas discrepancias; a este respecto Dong et al. emplearon clones de linfocitos T antígeno específicas, mientras que nuestra estrategia experimental tenía por objetivo demostrar el efecto funcional de PD-L1 en las líneas celulares de carcinoma pulmonar sobre linfocitos T CD8+ alogénicos. No obstante, nuestro resultado concuerda con lo reportado

por Wintterle et al. (2003) quienes no observan efecto apoptótico en el linfocito T mediado por PD-L1 presente en las células de glioma. Adicionalmente, en el presente estudio se analizó el porcentaje de linfocitos T CD8+CD95L+, debido a que linfocitos T estimulados con anti-CD3 e incubados con la proteína PD-L1 incrementaron la expresión de CD95 y CD95L ^(Dong et al., 2002), sin embargo, en nuestro estudio no se encontraron diferencias en el porcentaje de linfocitos T CD8+CD95L+ provenientes del cocultivo con respecto a los provenientes del tratamiento con el anticuerpo bloqueador anti-PD-L1.

Por otra parte, Wintterle et al. (2003) reportaron una disminución en la expresión del marcador de activación CD69 en el linfocito T debido a la molécula PD-L1 presente en las células de glioma; en nuestro caso, no se observaron diferencias en el porcentaje de linfocitos T CD8+CD69+, ni en el porcentaje de linfocitos T CD8+CD25+ provenientes del cocultivo respecto a los provenientes del tratamiento con el anticuerpo bloqueador anti-PD-L1, de manera que nuestros resultados sugieren que la expresión de PD-L1 en las células tumorales de carcinoma pulmonar no tiene efecto en la activación del linfocito T CD8+.

Interesantemente se observó un incremento en el porcentaje de linfocitos T CD8+PD-L1+ debido a la interacción de PD-L1 presente en las células tumorales con PD-1 en el linfocito T CD8+, lo cual sugiere que la interacción de PD-1 con PD-L1 en el linfocito T CD8+ sea un mecanismo que disminuya la actividad efectora del linfocito T CD8+, puesto que este incremento en la expresión de PD-L1 en el linfocito T CD8+ favorece la interacción de PD-L1 con su receptor PD-1 expresado en otro linfocito T CD8+. Sin embargo, son necesarios más estudios empleando otras líneas celulares de carcinoma pulmonar u otros carcinomas para corroborar si el incremento en el porcentaje de linfocitos T CD8+PD-L1+ es un efecto del PD-L1 expresado en las células tumorales en general y no un fenómeno particular de las líneas celulares empleadas.

Además, nuestros resultados sugieren que la expresión de PD-L1 en las líneas celulares de carcinoma pulmonar las protege del ataque de los linfocitos T citotóxicos. Iwai et al. (2002) reportaron que la unión de PD-1, presente en los linfocitos T citotóxicos, con PD-L1 en la línea celular P815/ PD-L1+ resultó en la inhibición de la actividad citotóxica de los CTLs, mientras que en cáncer pancreático, el bloqueo de la interacción de PD-L1 con PD-1 resultó en un

incrementó en la expresión de granzima B y perforina ^(Nomi et al., 2007). Consistentes con estos últimos resultados, se demostró que la interacción PD-1/ PD-L1 disminuyó el porcentaje de linfocitos T CD8+granzima A+ y el porcentaje de linfocitos T CD8+perforina+. La granzima A y la perforina son dos constituyentes de los gránulos presentes en los CTLs y la vía dependiente de gránulos es una de las formas que conducen a la muerte de la célula tumoral. ^(Fan et al., 2005; Prado-García 2004) De manera que los resultados obtenidos indican que la expresión de PD-L1 en las células tumorales disminuye la actividad efectora de los linfocitos T CD8+, lo cual concuerda con el estudio de Prado-García et al.(2005) que reportan que en el derrame pleural de los pacientes con adenocarcinoma se encontró una alta proporción de linfocitos T CD8+ con fenotipo de memoria y una reducción significativa de células con fenotipo efector; además, en el líquido pleural y sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma pulmonar el porcentaje de linfocitos T CD8+ granzima A+ y el porcentaje de linfocitos T CD8+ perforina+ es menor que en sujetos sanos.

En resumen, el IFN- γ incrementó la expresión de PD-L1 y de PD-L2 en las líneas celulares de carcinoma pulmonar. Además, el cocultivo de líneas celulares con niveles elevados de PD-L1 y linfocitos T CD8+ PD-1+ indujo disminución en el porcentaje de linfocitos T CD8+ perforina+ granzima A+ y un incremento en el porcentaje de linfocitos T CD8+ PD-L1+, por lo que la expresión de PD-L1 en las líneas celulares de carcinoma pulmonar disminuyó la actividad efectora del linfocito T CD8+. Puesto que una respuesta inmune antitumoral efectiva requiere de la actividad citolítica de los linfocitos T citotóxicos (Figura 3), estos resultados sugieren que el bloqueo de la interacción de PD-L1 con su receptor presente en el linfocito T CD8+ es una nueva promesa en el desarrollo de estrategias terapéuticas para el tratamiento del cáncer pulmonar.

10. Conclusiones

- PD-L1 se expresó, a nivel de mRNA y proteína, en todas las líneas celulares de carcinoma pulmonar empleadas, y el IFN- γ incrementó la expresión del mRNA (5/7) y la proteína PD-L1 (7/7) en dichas líneas celulares.
- PD-L2 se expresó a nivel mRNA en la mayoría (9/11) de las líneas celulares de carcinoma pulmonar empleadas; sin embargo, los niveles de expresión de la proteína fueron menores respecto a los de PD-L1. El tratamiento de las líneas celulares de carcinoma pulmonar con IFN- γ incrementó la expresión del mRNA y de la proteína PD-L2 en 4 de las 7 líneas celulares empleadas.
- Las líneas celulares PD-L1+ no modificaron la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD25 en los linfocitos T CD8+; asimismo, estas células tumorales no incrementaron el porcentaje de células CD95L+ ni indujeron apoptosis en los linfocitos T CD8+.
- Las líneas celulares PD-L1+ disminuyeron el porcentaje de linfocitos T CD8+ granzima A+ perforina+ e incrementaron el porcentaje de linfocitos T CD8+ PD-L1+.

11. Referencias

1. Abbas, AK., Lichtman, AH., Pillai, S. Inmunología celular y molecular. Ed. Elsevier. 6ta edición. España, 2008 pp.3-17, 189-209.
2. Acuto, O., Michel, F. CD28-Mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signaling. *Nat Rev Immunol* **3**: 939-951 (2003).
3. Alberts, B., Johnson, A. Biología molecular de la célula. Ed. Ediciones Omega. 4ta edición. Barcelona, 2007 pp.983-1010.
4. Alegre, ML., Frauwirth, KA., Thompson, CG. T cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* **1**: 220-228 (2001).
5. Andreola, G., Rivoltini, L., Castelli, C., Huber, V., Perego, P., Deho, PJ. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med* **195**:1303-1316 (2002).
6. Azuma, T., Yao, S., Zhu, G., Flies, AS., Files, SJ., Chen, L. B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. *Blood* **111**: 3635-3643 (2008).
7. Barber, DL., Wherry, EJ., Masopust, D., Zhu, B., Allison, JP., Sharpe, AH. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**: 682-687 (2006).
8. Barrett, JC. Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environ Health Perspect* **100**:9-20 (1993).
9. Blank, C., Gajewski, TF., Mackensen, A. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* **54**: 307-314(2005).
10. Blank, C., Mackensen, A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunol Immunother* **56**, 739-745 (2007).
11. Brown, JM., Attardi, LD. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer* **5**: 231-237 (2005).
12. Castano, AP., Mroz, P., Hamblin, MR. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer* **6**: 535-545 (2006).
13. Chen, L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol* **4**: 336-347 (2004).
14. Croce, CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* **358**: 502-511 (2008).

15. Dong, H., Strome, SE., Salomao, DR., Tamura, H., et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. **8**: 793-800 (2002).
16. Dranoff, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **4**: 11-22 (2004).
17. Dunn, GP. , Bruce, AT., Ikeda, H., Old, LJ., Schreiber, RD. Cancer immunoediting: from immune-surveillance to tumor escape. *Nat Immunol* **3**: 991-998(2002).
18. Dunn, GP. , Koebel, CM., Schreiber, RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* **6**: 836-847(2006).
19. Fan, Z., Zhang, Q. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Cell Mol Immunol* **2**: 259-264 (2005).
20. Fathman, CG., Lineberry, NB. Molecular mechanisms of CD4+ T-cell anergy. *Nat Rev Immunol* **7**: 599-609 (2007).
21. Fragoso, LR., Leon, FR., Esparza, JA. La proteólisis en la invasión y metástasis de la célula tumoral. *Cancerología* **46**: 33-46 (2000).
22. Freeman, GJ. Structures of PD-1 with its ligands: Sideway and dancing cheek to cheek. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 10275-10276 (2008).
23. Freeman, GJ., Wherry, EJ., Ahmed, R., Sharpe, AH. Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1 – PD-1 ligand blockade. *J Exp Med*. **10**: 2223-2227 (2006).
24. Gabrilovich, DI., Nagaraj, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* **9**: 162-174 (2009).
25. García, IS. The Crossroads of oncogenesis and metastasis. *N Engl J Med* **360**: 297-299 (2009).
26. Garvin, JE., Koretzky, GA., Jordan, MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol*. **27**: 591-619 (2009).
27. Gillies, JR., Robey, I; Gatenby, RA. Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers. *J Nucl Med* **49**: 24-42 (2008).
28. Gout, S., Huot, J. Role of cancer microenvironment in metastasis: focus on colon cancer. *Cancer Microenviron* **1**: 69-83 (2008).
29. Hamanishi, J., Mandai, M., Iwasaki, M., Okasaki, T., Tanaka, Y., Yamaguchi, K. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are

- prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. **104**: 3360-3365 (2007).
30. Hanahan, D., Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70(2000).
31. Harley, CB. Telomerase and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* **8**: 167-179 (2008).
32. Hengartner, MO. The biochemistry of apoptosis. *Nat* **407**: 770-776 (2000).
33. Herbst, RS. Heymach, JV. , Lippman, SM. Molecular origins of cancer. Lung Cancer. *N Engl J Med* **359**: 1367-1380 (2008).
34. Hirano, F., Kaneko, K., Tamura, H., Dong, H., Wang, S., Ichikawa, M. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res* **65**: 1089-1096 (2005).
35. Hong, W.K. (2004) Tumores del pulmón. El manual Merck. Décima edición. Harcourt. España. Sección 6; Cap. 81.
36. Ikeda, H., Old, LJ, Schreiber, RD. The roles of IFN γ in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev* **13**: 95-109 (2002).
37. Inman, BA., Frigola, X., Dong, H., Kwon, ED. Costimulation, coinhibition and cancer. *Curr Cancer Drug Targets* **7**: 15-30 (2007).
38. Inman, BA., Sebo, TJ., Frigola, X., Dong, H., Bergstralh, EJ., Frank, I. PD-L1 (B7-H1) expression by urothelial carcinoma of the bladder and BCG-induced granulomata: associations with localized stage progression. *Cancer* **109**: 1499-1505 (2007).
39. Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y, Okasaki, T., Honjo, T Minato, N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **17**: 12293-12297(2002).
40. Khong, HT., Restifo, NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* **3**: 999-1005 (2002).
41. Kindt. J. Thomas. Inmunología de Kuby. Ed. Mc. Graw Hill. 6ta edición. México, 2007 pp.525-542.
42. Konishi, J., Yamazaki, K., Azuma, M., Kinoshita, I., Akita, HD., Nishimura, M. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin Cancer Res* **10**: 5094-5100 (2004).
43. Kono, H., Rock, K. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* **8**: 279-289 (2008).

-
44. Latchman, Y., Wood, CR., Chernova, T., Chaudhary, D., et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* **2**: 261-268 (2001).
 45. Lieberman, J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: New weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* **3**: 361-370 (2003).
 46. Loke, P., Allison, JP. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 5336-5341 (2003).
 47. Maher, S., Toomey, D., Condrón, C., Hayes, DB. Activation-induced cell death: The controversial role of Fas and Fas ligand in immune privilege and tumour counterattack. *Immunol Cell Biol* **80**: 131-137 (2002).
 48. Mehlen, P., Puisieux, A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* **6**: 449-458 (2006).
 49. Minna, JD., Roth, JA., Gazdar, AF. Focus on lung cancer. *Cancer Cell* **1**: 49-52(2002).
 50. Murphy, K., Travers, P., Walport, M. Janeway's Immunobiology. Ed. Garland Science. Séptima edición. USA, 2008 pp. 343-356.
 51. Nevins, JR. The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum Mol Genet* **10**: 699-703 (2001).
 52. Nomi, T., Sho, M., Akahori, T., Hamada, K., Kubo, A., Kanehiro, H. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/ programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* **13**: 2151-2157 (2007).
 53. Ohigashi, Y., Sho, M., Yamada, Y., Tsurui, Y., Hamada, K., Ikeda, N. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res* **11**: 2947-2953 (2005).
 54. Orozco, NM., Dong, C. Inhibitory costimulation and anti-tumor immunity. *Semin Cancer Biol* **17**: 288-298 (2007).
 55. Pollard, JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev. Cancer* **4**: 71-78 (2004).
 56. Ponder, B. Cancer genetics. *Nat* **411**: 336-341 (2001).
 57. Prado, GH., Ávila, MF., López GJ. Linfocitos T citotóxicos en cáncer y autoinmunidad. *Rev Invest Clin* **56**: 629-639 (2004).
 58. Prado-García H., Aguilar-Cazares D., Flores-Vergara H., Mandoki JJ., Lopez-Gonzalez JS. Effector, memory and naïve CD8+ T cells in peripheral blood and pleural effusion from lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer* **30**: 1-11 (2005).

-
59. Proctor, RN. Tobacco and the global lung cancer epidemic. *Nat Rev Cancer* **1**: 82-86 (2001).
 60. Rabinovich GA., Gabrilovich. D., Sotomayor E M. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* **25**: 267-296 (2007).
 61. Raulet, DH. , Guerra,N. Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors. *Nat Rev Immunol* **9**: 568-580 (2009).
 62. Restifo, NP. Not so Fas: Re-evaluating the mechanisms of immune privilege and tumor escape. *Nat Med* **6**: 493-495 (2000).
 63. Rodig, N., Ryan, T., Allen, JA., Pang, H., et al. Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8+ T cell activation and cytolysis. *Eur J Immunol* **33**: 3117-3126 (2003).
 64. Rosenberg, SO. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Curr Opin Genet Dev* **18**: 11-18 (2008).
 65. Ryungsa, K., Manabu, E., Kazuaki, T. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* **121**: 1-14 (2007).
 66. Sandoval- Vázquez, NC. (2009) Determinación de la expresión de los ligandos PD-L1 y PD-L2 en células tumorales y el receptor PD-1 en linfocitos T CD4+ y CD8+ provenientes de pacientes con adenocarcinoma pulmonar. Tesis Licenciatura (Químico Farmacéutico Biólogo)-UNAM, Facultad de Química.
 67. Schuller. M. Mechanisms of smoking-related lung and pancreatic adenocarcinoma development. *Nat Rev Cancer* **2**: 455-463(2002).
 68. Sharma, MD., Baban, B., Chandler, P., Hou, DY., Singh N., Yagita H. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2, 3-dioxygenase. *J Clin Invest* **9**: 2570-2582 (2007).
 69. Sharpe, AH. , Wherry, EJ. , Ahmed, R., Freeman, GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol* **8**: 239-245 (2007).
 70. Sharpe, AH., Freeman, GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* **2**: 116-126 (2002).
 71. Smyth, MJ., Hayakawa, Y., Takeda, K., Yagita,H. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* **2**: 850-861 (2002).

-
72. Stämpfli, M., Anderson, P. How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. *Nat Rev Immunol* **9**: 377-384 (2009).
 73. Steeg, PS. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat Rev Cancer* **3**: 55-63 (2003).
 74. Stewart, T.J. , Abrams, SI. How tumours escape mass destruction. *Oncogene* **27**: 5894-5903 (2008).
 75. Strome, SE., Dong, H., Tamura, H., Voss, SG., Flies, DB., Tamada, K. B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. *Cancer Res* **63**: 6501-6505 (2003).
 76. Sun, J., Xu, K., Wu,C., Wang, Y., Hu, Y, Zhu,Y. PD-L1 expression analysis in gastric carcinoma tissue and blocking of tumor-associated PD-L1 signaling by two functional monoclonal antibodies. *Tissue Antigens* **69**: 19-27 (2006).
 77. Sun, S., Schiller, H., Gazdar, F. Lung cancer in never smokers-a different disease. *Nat Rev Cancer* **7**: 778-790 (2007).
 78. Tamura, H., Dan, K., Tamada, K., Nakamura, K., et al. Expression of functional B7-H2 and B7.2 costimulatory molecules and their prognostic implications in *de novo* acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* **16**: 5708-5717 (2005).
 79. Tesniere, A., Panaretakis, T., Keep, O., Apetoh, L., et al. Molecular characteristics of immunogenic cancer cell. *Cell Death Differ* **15**: 3-12 (2008).
 80. Thompson, HR., Kuntz, SM., Leibovich, BC., Dong. H., Lohse, CM., Webster, WS. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res* **66**: 3381-3385 (2006).
 81. Usui, Y., Okunuki, Y., Hattori, T., Takeuchi, M., Kezuka,T., Goto, H. Expression of costimulatory molecules on human retinoblastoma cells Y-79: functional expression of CD40 and B7H1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**: 4607-4613 (2006).
 82. Vignali, DA., Collison, LW., Workman, CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* **8**: 523-532 (2008).
 83. Weinberg, RA. How cancer arises. *Sci Am* **275**: 62-70 (1996).
 84. Weinberg, RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**: 323-330 (1995).

85. Wintterle, S., Schreiner, B., Mitsdoerffer, M., Schneider, D., et al. Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: a potential mechanism of immune paralysis. *Cancer Res* **63**: 7462-7467 (2003).
86. Zheng, Y., Zha, Y., Gajewski, TF. Molecular regulation of T-cell anergy. *EMBO Rep* **9**: 50-55 (2008).
87. Zitvogel, L., Tesniere, A., Kroemer, G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* **6**: 715-727 (2006).
88. Zou, W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **6**: 295-307 (2006).
89. Zou, W., Chen, Lieping. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* **8**: 467-477 (2008).