



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Inmunofenotipificación y cuantificación de
linfocitos Th17 en derrame pleural de
pacientes con carcinoma pulmonar**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A

Rodolfo Servín Blanco



MÉXICO, D. F. 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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: José Sulivan López González
VOCAL: Enrique Ortega Soto
SECRETARIO: Heriberto Prado García
1er. SUPLENTE: Laura Cecilia Bonifaz Alfonzo
2º SUPLENTE: Sonia Mayra Pérez Tapia

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: Este trabajo de Tesis se realizó en el Laboratorio de Cáncer Pulmonar, Departamento de Enfermedades Crónico-Degenerativas del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”,SS. México D.F.

ASESOR DEL TEMA:

DR. HERIBERTO PRADO GARCÍA

SUSTENTANTE:

RODOLFO SERVÍN BLANCO

Agradecimiento

El sustentante Rodolfo Servín Blanco, desea agradecer a la Coordinación Nacional de Becas de Educación Superior el otorgamiento de la beca de titulación, para el desarrollo del presente trabajo.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México que me permitió estudiar en sus aulas desde el bachillerato en la preparatoria 9 y en especial a la Facultad de Química por guiar mi formación profesional a lo largo de los últimos años.

Al Dr. Sullivan López por permitirme estar en su grupo de investigación durante el tiempo que en el que se desarrolló el presente trabajo. Gracias por su apoyo, interés, consejos y comentarios que ayudaron a enriquecer esta tesis.

Al Dr. Heriberto Prado por el tiempo y esfuerzo que invirtió en el asesoramiento del presente trabajo.

Al Dr. Enrique Ortega por las observaciones realizadas que enriquecieron la tesis.

Dedicatoria

A Dios por darme vida hasta el día de hoy y por colocarme con todas aquellas personas que me han ayudado en todo este tiempo. Gracias Señor por manifestar amor a través de ellas.

A mis padres Rosa María y Rodolfo por que sin ellos no hubiese podido lograr nada, por el ejemplo de tenacidad, esfuerzo, lucha y paciencia que me brindan, porque a través de incontables horas de trabajo me han dado los medios para que pueda llegar a este momento. Los amo, muchas gracias por todo.

A mi hermano Diego que le brinda alegría a mi vida, porque siempre me ayuda a ser mejor y por su apoyo, cariño y confianza. Te amo hermano.

A mis amigos Carlos, Jorge, Juan con quienes pasé tantas cosas gratas a lo largo de muchos años con quienes sostuve pláticas tan extrañas que ahora ya tienen sentido. Porque siempre me han brindado su confianza y apoyo, gracias por su amistad.

A Vera porque... bueno en tus propias palabras "porque eres como un otro yo, pero otro yo que no es tan igual a mi" gracias princesa por compartir tantos momentos en la facultad y fuera de ella.

A los amigos que conocí durante la licenciatura: Jessica, Mariana, Sara, Marcela, Meche, Berenice, Ivonne, Luz, Liliana, Karen, Gabriela, Diana, David, Oscar, José, Luis, Javier, Gustavo, Roberto, Lamberto... con quienes viví muy buenas experiencias.

A mis amigos del laboratorio Ángeles, Erendira, Liliana, Verónica, Norma, Lorenzo, Ricardo, Servando con quienes conviví estrechamente durante la realización de esta tesis y pasé momentos muy divertidos como en el pictionary. Gracias por su amistad y por los comentarios durante los seminarios.

A mis amigos de la prepa: Angélica, Mario, Carlos, Pablo, Miguel, Iván porque son parte fundamental de mi desarrollo.

A Mulder y Scully⁵²⁹⁵⁸

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Cáncer.....	1
Cáncer pulmonar.....	2
Tipos histológicos de cáncer pulmonar.....	2
Biología molecular del cáncer de pulmón.....	2
Derrame pleural.....	5
Respuesta inmune.....	5
Respuesta inmune en cáncer.....	7
Inmunoedición.....	8
Mecanismos de evasión tumoral.....	11
La inflamación como agente promotor del cáncer.....	12
Linfocitos Th17.....	15
ANTECEDENTES	20
Linfocitos Th17 en autoinmunidad.....	20
Linfocitos Th17 en cáncer.....	21
Linfocitos T en cáncer pulmonar.....	24
IL-17 en cáncer pulmonar.....	25
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS PARTICULARES	27

MATERIALES Y MÉTODOS	28
Material biológico.....	29
Purificación de células mononucleares.....	29
Determinación del fenotipo de Linfocitos CD4+ en estado basal.....	30
Estimulación de CMN-LP para posterior detección de linfocitos TCD4+ productores de IL-17.....	31
Líneas tumorales.....	31
Estimulación de las líneas tumorales de carcinomas pulmonares.....	32
Tinción intracelular de IL-17 en líneas tumorales.....	32
Análisis de muestras por citometría de flujo.....	33
Análisis estadístico.....	34
RESULTADOS	35
Determinación del fenotipo de las células TCD4+ en estado basal.....	35
- <i>Análisis del receptor CCR6 en CMN-LP</i>	35
- <i>Porcentajes de CMN-LP que expresan el factor de transcripción RORgamma o que expresan el factor de transcripción FOXP3</i>	37
Estimulación de CMN-LP para posterior detección de linfocitos TCD4+ productores de IL-17.....	40
Tinción intracelular de IL-17 en líneas tumorales.....	44
DISCUSIÓN	46
Líneas tumorales de carcinoma pulmonar productoras de IL-17.....	52
CONCLUSIONES	54
REFERENCIAS	55

INTRODUCCIÓN

Cáncer

Todos los procesos celulares están altamente regulados, la división celular (mitosis) no es la excepción. Existen una gran cantidad de mecanismos destinados para asegurar que la célula hija tenga una copia fiel e íntegra de la información genética de la célula progenitora, evitando con ello errores en el genoma que pudieran afectar su funcionamiento.

Durante la replicación del DNA es factible que puedan ocurrir errores espontáneos, o bien, inducidos por agentes carcinógenos (físicos, químicos o biológicos). Las células han desarrollado mecanismos de reparación para revertir el daño en el DNA antes de transmitirlo a la célula hija, si los mecanismos celulares no son capaces de revertir el daño, la célula entrará en apoptosis. Cuando una célula no repara el daño en su genoma y además evade la apoptosis, acumulará errores genéticos (mutaciones) que serán transmitidos a las células hijas. El cáncer es el resultado de la acumulación de dichos errores; las mutaciones pueden ocurrir en varios genes, y sus efectos son diversos, por ejemplo la activación de protooncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores conlleva a la proliferación descontrolada y la formación de neoplasias.^{7, 8}

Durante el desarrollo del cáncer, las células involucradas adquieren seis propiedades fundamentales que caracterizan a las células transformadas. En conjunto, estas propiedades se nombran “marcas del cáncer” y son: 1) Autosuficiencia proliferativa, 2) Insensibilidad a las señales anti-proliferativas, 3) Evasión de la apoptosis, 4) Potencial replicativo ilimitado, 5) Angiogénesis sostenida y 6) Invasión de tejidos y metástasis.²²

Cáncer pulmonar

El cáncer de pulmón es la forma más común de todos los cánceres y la principal causa de muerte en el mundo. Tan solo en 2007 se le atribuyeron 1.4 millones de defunciones, colocándose como un severo problema de salud pública.⁵⁰ Las causas del carcinoma pulmonar son diversas; sin embargo, alrededor del 90% de todos los casos de esta enfermedad se relacionan con el hábito tabáquico.^{65, 66} La predisposición genética y los factores ambientales pueden ser la causa del porcentaje restante en aquellos pacientes con historiales de no fumador.^{26, 66}

Tipos histológicos de carcinoma pulmonar

Por sus características clinicopatológicas, el carcinoma de pulmón se divide principalmente en dos grupos: carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC por sus siglas en inglés) que representa alrededor del 85% de todos los casos y carcinoma pulmonar de células pequeñas (SCLC) con el restante 15% de los casos.^{21, 26} El NSCLC puede ser dividido en tres tipos histológicos: carcinoma epidermoide o de células escamosas, carcinoma pulmonar de células grandes y adenocarcinoma, este último es el tipo histológico más frecuente.²⁶ En relación con el hábito tabáquico, se ha reportado que fumar puede ser la causa de cualquier tipo histológico de cáncer pulmonar; sin embargo, la asociación más fuerte es con el carcinoma epidermoide; así mismo, el adenocarcinoma es el tipo histológico más frecuente en no fumadores.²⁶

Biología molecular del cáncer de pulmón

La principal causa por la que se puede desarrollar carcinoma pulmonar es el tabaquismo. El humo del cigarrillo contiene cerca de 45000 sustancias de las cuales se han identificado más de 60 como carcinógenos, dentro de éstas se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (como el benzo[a]pireno), aminas aromáticas y nitrosaminas (como 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona).^{25, 66} El proceso de carcinogénesis en el tejido pulmonar se desarrolla probablemente durante años e

incluso décadas. Durante este período, las células afectadas sufren numerosos cambios a nivel molecular, que finalmente conducen al desarrollo de un carcinoma pulmonar.²¹

Los avances en las técnicas de biología molecular han proporcionado mayores evidencias acerca de la patología del desarrollo del cáncer pulmonar. Existe evidencia clínica de que el cáncer de pulmón es el resultado de un proceso de varias etapas en las cuales se da la acumulación de veinte o más alteraciones genéticas y epigenéticas en el epitelio bronquial, que finalmente son las responsables de la patogénesis.^{8, 17}

Los eventos que conllevan al desarrollo de células malignas se llevan a cabo de manera secuencial, propiciando la acumulación de alteraciones; es en este proceso en el que se adquieren las llamadas marcas del cáncer, las cuales favorecen la proliferación de las células transformadas.

A continuación se mencionan datos referentes a las marcas del cáncer en relación con el carcinoma pulmonar.

a) Autosuficiencia proliferativa: particularmente se asocian dos receptores codificados por protooncogenes, el receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el receptor ERBB2. Ambos son receptores transmembranales con actividad de tirosin-quinasa. Cuando se unen a sus ligandos (factor de crecimiento epidérmico [EGF] y factor de crecimiento transformante-alfa [TGF- α], respectivamente) se inicia una cascada de señalización que promueve la proliferación epitelial. En el NSCLC el receptor EGFR se encuentra sobreexpresado y las células tumorales poseen la capacidad para secretar el ligando EGF lo que suministra los componentes necesarios para una vía de crecimiento autócrina. El receptor ERBB2 se encuentra sobreexpresado en el 30% de los casos de NSCLC, principalmente en el adenocarcinoma y se asocia a células tumorales con fenotipo multiresistente a fármacos quimioterapéuticos y con un elevado potencial metastásico. Otra vía presente para el crecimiento de las células de carcinoma pulmonar es la relacionada con el factor 1 de crecimiento semejante a insulina (IGF-1), debido a que dichas células producen esta hormona y tienen receptores para ella.¹⁷

En el 20% de los casos de NSCLC se encuentran mutados los genes de la familia *ras*, principalmente en adenocarcinomas. Las proteínas RAS codificadas por los

protooncogenes de dicha familia tienen actividad de GTPasa y transmiten señales inducida por factores de crecimiento, iniciando la transcripción de genes.¹⁷

b) Insensibilidad a las señales antiproliferativas: las alteraciones más comunes en genes supresores tumorales se relacionan con el gen *TP53* (eliminaciones, inserciones, mutaciones sin sentido). Este gen ayuda a mantener la integridad del genoma evita la división de una célula con daño en el DNA, inducido por radiaciones o carcinógenos. El gen *TP53* está inactivo en más del 75% de los casos de SCLC y en el 50% de NSCLC. Otros genes supresores inactivos en el cáncer pulmonar son el gen *Rb* (debido a mutaciones) y *P16* (inactivado por hipermetilación).¹⁷

c) Evasión de la apoptosis: el protooncogén *Bcl-2* codifica para una proteína con características antiapoptóticas (importante en la regulación de la vía intrínseca); dicho gen está sobreexpresado tanto en NSCLC como en SCLC.¹⁷

d) Potencial replicativo ilimitado: los telómeros son los extremos de los cromosomas, son regiones altamente repetitivas no codificantes cuya función principal es la estabilidad estructural de los cromosomas. En cada división de una célula normal, los telómeros se van acortando y cuando llegan a una longitud crítica, las células dejan de dividirse. La telomerasa es una enzima que adiciona nucleótidos en hexámeros TTAGGG a los telómeros, en una célula normal esta enzima esta inactiva; sin embargo, debido a que todos los tipos de cáncer de pulmón la expresan se piensa que la actividad de esta enzima es la responsable de brindar la inmortalidad a las células malignas.¹⁷

e) Angiogénesis sostenida: las células tumorales de carcinoma pulmonar promueven la angiogénesis, manifestándose como una abundante microvascularización del tumor, que se asocia con un pobre pronóstico de la enfermedad. Las células tumorales de NSCLC expresan el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) que promueve el crecimiento de vasos sanguíneos.¹⁷

f) Invasión de tejidos y metástasis: en el NSCLC, la expresión de moléculas como laminina e integrinas se encuentra reducida, lo que contribuye a la pérdida de adherencia de las células tumorales del carcinoma pulmonar, este fenómeno puede

propiciar que una célula tumoral invada tejido adyacente o bien que pueda llegar a vasos sanguíneos y diseminarse hacia otros órganos.¹⁷

Derrame pleural

La cavidad pleural es el espacio comprendido entre la pleura parietal y visceral, en el que se encuentra un líquido seroso cuya función es evitar la fricción durante el proceso de ventilación pulmonar. En condiciones normales, la producción de líquido pleural es de 0.1-0.2mL/Kg peso corporal, permaneciendo menos de 12mL en dicho espacio. El líquido pleural contiene de 1000 a 5000 células/mL, de las cuales alrededor del 80% son macrófagos y el restante corresponde a linfocitos.⁹

La acumulación excesiva de líquido en el espacio pleural es resultado del desequilibrio en los procesos de formación y reabsorción del mismo, dos de los mecanismos por los cuales se genera esta acumulación son: 1) aumento de la permeabilidad capilar como sucede en procesos inflamatorios y neoplásicos y 2) disminución del drenaje linfático debido a obstrucción por células tumorales.⁹

El origen etiológico de la formación del derrame pleural es diverso, pero principalmente es causado por cáncer pulmonar (principalmente adenocarcinoma), tuberculosis, insuficiencia cardíaca y neumonías.

Los derrames pleurales ocasionados por tuberculosis y cáncer pulmonar contienen un porcentaje mayor de linfocitos respecto a la sangre periférica. Los linfocitos TCD4+ son la estirpe predominante en dichos derrames.^{2, 57} Además de presentar linfocitos, dos terceras partes de los derrames pleurales de origen maligno pueden presentar células tumorales, es por ello que el derrame pleural se considera un sitio adecuado para el estudio de la respuesta inmune antitumoral y de los mecanismos de evasión tumorales.

57

Respuesta inmune

El sistema inmune es el conjunto de órganos linfoides, células y componentes humorales, que brindan protección al hospedero en contra de agentes potencialmente

patógenos. Una respuesta inmune disminuida puede resultar en susceptibilidad a infecciones, incapacidad para eliminar tumores o bien, en inmunodeficiencias; mientras que una respuesta excesiva conlleva al desarrollo de reacciones de hipersensibilidad o a enfermedades autoinmunes.⁵⁴

La respuesta inmune se divide en dos partes, de acuerdo con la prontitud y especificidad de la respuesta, y son: respuesta inmune innata y respuesta inmune adaptativa. La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa, y esta compuesta de 3 barreras: 1) Barreras anatómicas: divididas a su vez en factores mecánicos (la piel, las células ciliadas del tracto respiratorio), factores químicos con potencial antimicrobiano (ácidos grasos “cerumen”, lisozima, fosfolipasa) y factores biológicos (la flora normal de la piel y del tracto gastrointestinal. 2) Barreras humorales: sistema del complemento, y algunas citocinas que propician una reacción inflamatoria (como interferón (IFN) e IL(interleucina)-1). 3) Barreras celulares: parte de la respuesta inflamatoria consiste en el reclutamiento de células polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), células NK y macrófagos al sitio de inflamación.⁵⁴

La respuesta inmune adaptativa es una respuesta mediada por linfocitos T y B, no es inmediata y se caracteriza por ser antígeno específica. Existen dos poblaciones diferentes de linfocitos T, los linfocitos T CD8+ o linfocitos citotóxicos (CTL's) y los linfocitos T CD4+ o linfocitos cooperadores (Th). La población de linfocitos Th se diferencia en varias subpoblaciones efectoras de acuerdo con el microambiente de citocinas en el que esté inmerso el precursor Th0, si en el microambiente predomina la IL-12 e IFN- γ , el linfocito se diferencia hacia Th1 y éste será capaz de secretar IL-2 e IFN- γ , citocinas importantes en la activación de macrófagos y CTL's. En un microambiente donde predomina la IL-4 se favorecerá el perfil Th2, y los linfocitos con este perfil producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, citocinas que colaboran con el linfocito B para diferenciarse en células plasmáticas y producir anticuerpos.^{45,54} Recientemente se ha descrito una población de linfocitos productores de IL-17 con un fenotipo diferente al de los linfocitos Th1 o Th2, considerándose desde entonces como un nuevo linfocito efector, y denominándose Th17.⁴⁵

Respuesta inmune en cáncer

El sistema inmune desempeña un papel importante en la prevención de tumores, protege al organismo eliminando virus potencialmente oncogénicos, reestablece la homeostasis post-infección revirtiendo el ambiente inflamatorio que pudiera favorecer el desarrollo tumoral y eliminando específicamente las células transformadas nacientes.⁶⁸

Las células precancerosas o malignas son capaces de inducir una respuesta inmune.⁵³

Es claro que las células tumorales, debido a su inestabilidad genómica, generarán nuevos antígenos y aún estos se modificarán durante el desarrollo del tumor, favoreciendo así su inmunogenicidad.⁵² Con un sistema inmune competente, el resultado será la eliminación de las células transformadas o de las células malignas, en un proceso conocido como inmunovigilancia.⁶²

La idea de que existe una vigilancia inmunológica capaz de erradicar células transformadas fue propuesta hace casi un siglo; sin embargo, no fue sino hasta mediados del siglo XX cuando Burnet y Thomas formularon formalmente la teoría de la inmunovigilancia, la cual postula que en el organismo surgen constantemente células transformadas y que la función del sistema inmune es detectarlas, evitando así el posible desarrollo de un tumor o malignidad.^{31, 41}

Aunque esta idea no fue plenamente aceptada, principalmente porque en los primeros ensayos se observó que no existía un incremento en la incidencia de tumores espontáneos (ni en los químicamente inducidos) en ratones atímicos, comparados con el fenotipo silvestre, hay evidencia experimental (principalmente en modelos murinos) que apoyan esta teoría. El descubrimiento de las células NK como células citolíticas fue muy importante en esta teoría, pues aún en los ratones atímicos está presente esta población y mediante ensayos posteriores se demostró que desempeñan un rol muy importante (junto con otras células como NKT y los linfocitos con TCR $\gamma\delta$) en la inmunovigilancia.³¹

Actualmente la inmunovigilancia se considera parte de otra teoría más completa, la inmunooedición.

Inmunoedición

La participación del sistema inmune en la prevención del cáncer no siempre culmina con la erradicación de las células transformadas. La presión que ejerce el sistema inmune durante la eliminación de las células transformadas desempeña un papel preponderante, ya que puede editar el fenotipo inmunogénico durante el desarrollo tumoral. La teoría de la inmunoedición nos proporciona una visión más amplia de la participación del sistema inmune en el desarrollo tumoral, para ello contempla tres etapas: a) eliminación, b) equilibrio y c) escape.^{31, 68}

a) Eliminación: corresponde al concepto original de la inmunovigilancia. Este proceso incluye la respuesta inmune innata y adaptativa en contra de las células tumorales. Por la respuesta inmune innata participan las células efectoras NK, NKT y los linfocitos TCR $\gamma\delta$, que son activadas por citocinas inflamatorias relacionadas con macrófagos y células del estroma que circundan a las células tumorales. La secreción de estas citocinas recluta a más células del sistema inmune que producen otras citocinas proinflamatorias como IL-12 e IFN- γ .^{31, 78}

En el proceso de eliminación se contemplan 4 fases. *i)* Reconocimiento de las células tumorales por el sistema inmune innato. Cuando un tumor alcanza un tamaño de 2-3mm, requiere de nuevos vasos sanguíneos y ocurre un rearrreglo en el estroma para la progresión del tumor, esto induce señales de alarma y proinflamatorias que resultan en el reclutamiento de células NK, NKT, linfocitos TCR $\gamma\delta$, macrófagos y células dendríticas (DC's) al sitio del tumor. Las células transformadas son reconocidas por los macrófagos y células dendríticas; además, las células NKT y NK presentes en el infiltrado producen IFN- γ . *ii)* Maduración y migración de las células dendríticas y presentación de antígenos a los linfocitos T. Algunas quimiocinas producidas en el microambiente tumoral bloquean la formación de nuevos vasos sanguíneos, la proteína 10 inducible por interferón (IP-10) tiene efectos antiangiogénicos, esto conlleva a hipoxia de algunas células tumorales y su posterior muerte. Las células tumorales muertas son fagocitadas por las células dendríticas inmaduras, las cuales en un microambiente proinflamatorio, maduran y migran a los ganglios linfáticos. *iii)* Generación de linfocitos T antígeno-

tumoral específicos. Las células NK y macrófagos infiltrantes del tumor producen IL-12 e IFN- γ , las cuales favorecen la activación de los mecanismos citotóxicos como granzima/perforina, TRAIL y especies reactivas de oxígeno resultando en la muerte de más células tumorales. En los ganglios linfáticos, las DC's que migraron presentan los antígenos tumorales a los linfocitos T CD4+ naïve, los cuales se diferencian en linfocitos Th1 productores de IL-2 e IFN- γ que favorecen la proliferación y maduración de los linfocitos T CD8+ antígeno-tumoral específicos. iv) "homing" de los linfocitos T al sitio del tumor y eliminación de las células tumorales. Los linfocitos T CD4+ y CD8+ antígeno-tumoral específicos llegan al sitio del tumor y los CTL's eliminan a las células tumorales específicamente al reconocer los antígenos tumorales presentados en la molécula clase I del MHC, esto incrementa la secreción de IFN- γ , pero también favorece la supervivencia de las células tumorales con reducida inmunogenicidad.³¹

b) Equilibrio: en esta fase ocurre una continua selección de células tumorales, ya que las células más inmunogénicas son eliminadas por los mecanismos citolíticos ya mencionados; sin embargo, aquellas células con poca inmunogenicidad sobreviven y proliferan, como se recordará una célula transformada es inestable genéticamente, este hecho influye en gran medida en esta etapa, debido a que aquellas células poco inmunogénicas pueden generar variantes con fenotipos no-inmunogénicos (es en este punto en el que el tumor se torna muy heterogéneo), que son los que persisten aún en individuos inmunocompetentes. Se considera que esta etapa puede cursar a lo largo de varios años.^{29, 31, 78}

c) Escape: la respuesta inmune no logra eliminar todas las variantes surgidas durante el desarrollo tumoral, todas las células no-inmunogénicas o aquellas que en su desarrollo adquirieron mecanismos que les confirieron la capacidad de evadir o suprimir la respuesta inmune, proliferan resultando en el crecimiento del tumor y posteriormente al surgimiento de las manifestaciones clínicas debidas a este.^{31, 51}

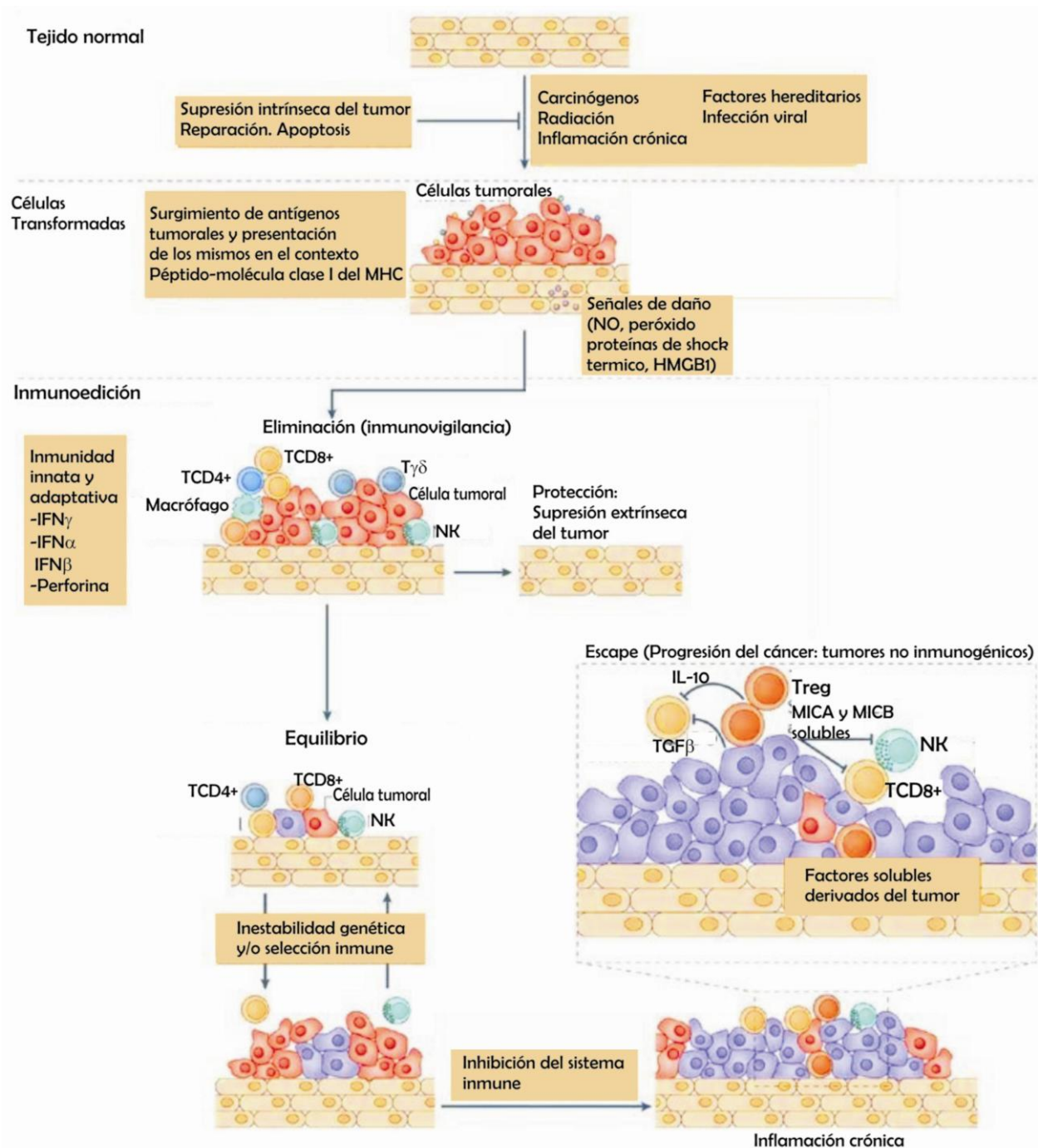


Figura 1: Inmunoección. El proceso de la inmunoección contempla tres etapas: i) Eliminación, ii) Equilibrio y iii) Escape. Se muestra el proceso de carcinogénesis y transformación maligna de algunas células de un tejido normal. A partir de ellas ocurre la primera etapa de la inmunoección, en donde puede ocurrir la eliminación completa de las células transformadas, o bien la supervivencia de aquellas con reducida inmunogenicidad. En la etapa de equilibrio surgen nuevas variantes de las células tumorales poco inmunogénicas. En la tercera etapa, subsisten las células tumorales que han adquirido mecanismos de evasión del sistema inmune, el tumor crece y se manifiesta clínicamente. Para una descripción detallada de esta teoría consultar el texto. ^(Modificada de 19)

Mecanismos de evasión tumoral

Las células tumorales que logran escapar del sistema inmune poseen una gran variedad de mecanismos, los cuales favorecen la progresión de tumor. Estos mecanismos de evasión han sido objeto de múltiples estudios, pues como se podrá inferir, son probables blancos para la inmunoterapia. Entre los mecanismos por los cuales las células tumorales evaden al sistema inmune están los relacionados con las moléculas clase I del MHC, y la vía de procesamiento de antígenos. Inicialmente, las mutaciones en las moléculas clase I del MHC propiciarían el escape de las células tumorales. La deficiencia en la presentación de antígenos o bien, la nula expresión de estas moléculas serían los mecanismos en tumores más avanzados. Mutaciones en el gen de la β 2-microglobulina, o bien mutaciones puntuales o eliminaciones en los genes del MHC I, son las responsables de la reducida o nula expresión de las moléculas clase I del MHC. Así mismo, en algunos cánceres se han observado mutaciones en el proteasoma y en moléculas TAP, resultando en defectos en la maquinaria de presentación antigénica.^{29, 62}

Además de estos mecanismos, los tumores pueden secretar citocinas inmunosupresoras; por ejemplo, los carcinomas pulmonares secretan TGF- β que inhibe la producción de IL-2 e IFN- γ necesarias en la activación y proliferación de los CTL's.^{4, 57} En otros cánceres se presenta la secreción de IL-10 que junto con el TGF- β evitan la activación adecuada de los linfocitos infiltrantes del tumor.³¹ Adicionales a esta citocinas inmunosupresoras, las células tumorales son capaces de secretar otros factores solubles, a saber, VEGF que previene la diferenciación y maduración de las células dendríticas además de ser un factor angiogénico; fosfatidil serina soluble que induce una respuesta antiinflamatoria favoreciendo la secreción de IL-10 y TGF- β por los macrófagos; Fas soluble que desempeña un papel para evadir la apoptosis inducida por FasL de la membrana de los CTL's; y finalmente FasL soluble que funge como mecanismo de contraataque tumoral ya que este factor soluble puede interactuar con Fas de la membrana de los CTL's induciendo su apoptosis.^{31, 58}

La Inflamación como agente promotor del cáncer

Se ha mencionado que el microambiente inflamatorio es necesario para eliminar las células transformadas nacientes; sin embargo, se ha considerado que la respuesta inflamatoria inducida por infecciones crónicas o persistentes se relaciona con la predisposición para desarrollar cáncer.^{20, 60, 61}

Aunque no se postula que la inflamación sea un mecanismo de evasión tumoral, si se le asigna un rol adicional, en este caso como agente iniciador y promotor.⁶¹

Las infecciones crónicas provocadas por virus de la hepatitis B y C, respuestas inmunes inapropiadas como puede ocurrir con *Helicobacter pylori* o bien condiciones asociadas con irritación crónica y una subsecuente inflamación, predisponen a desarrollar cáncer.

20

Los estados de inflamación crónica asociados con infecciones o irritaciones pueden conducir a microambientes en los que se favorecen lesiones genéticas y la iniciación de tumores. Uno de los mecanismos por los cuales el sistema inmune combate las infecciones es la producción de radicales libres e intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno; de forma importante, la presencia de estas moléculas puede incrementar el riesgo de mutaciones en el DNA.⁶¹

Después de una infección o bien cuando el tejido ha sido dañado, se activan los mecanismos para reestablecer la homeostasis y reparar el tejido. En este proceso los macrófagos, células epiteliales y fibroblastos tienen un papel activo. El microambiente resultante durante la reparación puede contener diversas moléculas como TGF- β , VEGF, prostaglandinas y metaloproteinasas de matriz que favorecen la progresión tumoral.⁶¹

Particularmente es interesante el hecho de que estados de irritación crónica pueden resultar en infecciones recurrentes, inflamación y finalmente cáncer. Esta cadena de eventos se ejemplifica en las siguientes líneas, dónde se trata al hábito tabáquico como factor de riesgo para desarrollar cáncer pulmonar.

Se sabe que el humo del cigarro compromete la integridad del epitelio ciliado del tracto respiratorio, incrementando su permeabilidad e impidiendo su correcto funcionamiento

como barrera anatómica que forma parte del sistema inmune innato. El humo del cigarro también tiene efectos sobre los macrófagos alveolares, DC's y las células NK alterando su capacidad fagocítica, su maduración y atenuando la capacidad citotóxica respectivamente; resultando en un incremento de la susceptibilidad para contraer infecciones (causadas por virus y bacterias) por vía aérea. Al mismo tiempo, el humo del cigarrillo activa las células epiteliales e incrementa el número de macrófagos alveolares; los cuales, en conjunto, producen mediadores proinflamatorios que favorecen el reclutamiento de más células, (principalmente neutrófilos) al pulmón. Las infecciones persistentes conducen a un estado inflamatorio crónico el cual puede dañar al tejido debido a las metaloproteinasas de matriz (MMP) secretadas por los neutrófilos y macrófagos, además de esto, se observa un incremento de los linfocitos T CD8+ efectoros (cuya especificidad antigénica se desconoce) y de la IL-17 (interleucina proinflamatoria secretada por una subpoblación de linfocitos T CD4+), que mantienen dicho estado inflamatorio. El daño constante a la mucosa respiratoria favorece la colonización bacteriana del epitelio. La continua formación de intermediarios reactivos de oxígeno, nitrógeno y radicales libres (como mecanismo para eliminar bacterias), junto con los carcinógenos presentes en el humo del cigarrillo pueden conducir al surgimiento de mutaciones de las células epiteliales que, con un sistema de inmunovigilancia mermado, pueden proliferar.^{25, 66}

Debe tomarse en cuenta que en el transcurso de las alteraciones al epitelio ciliado hasta el desarrollo de un carcinoma *in situ* pueden pasar muchos años, y que no todos los fumadores culminarán de dicha forma; se estima que sólo el 1-5% de los fumadores desarrolla algún tumor o malignidad.⁶⁶

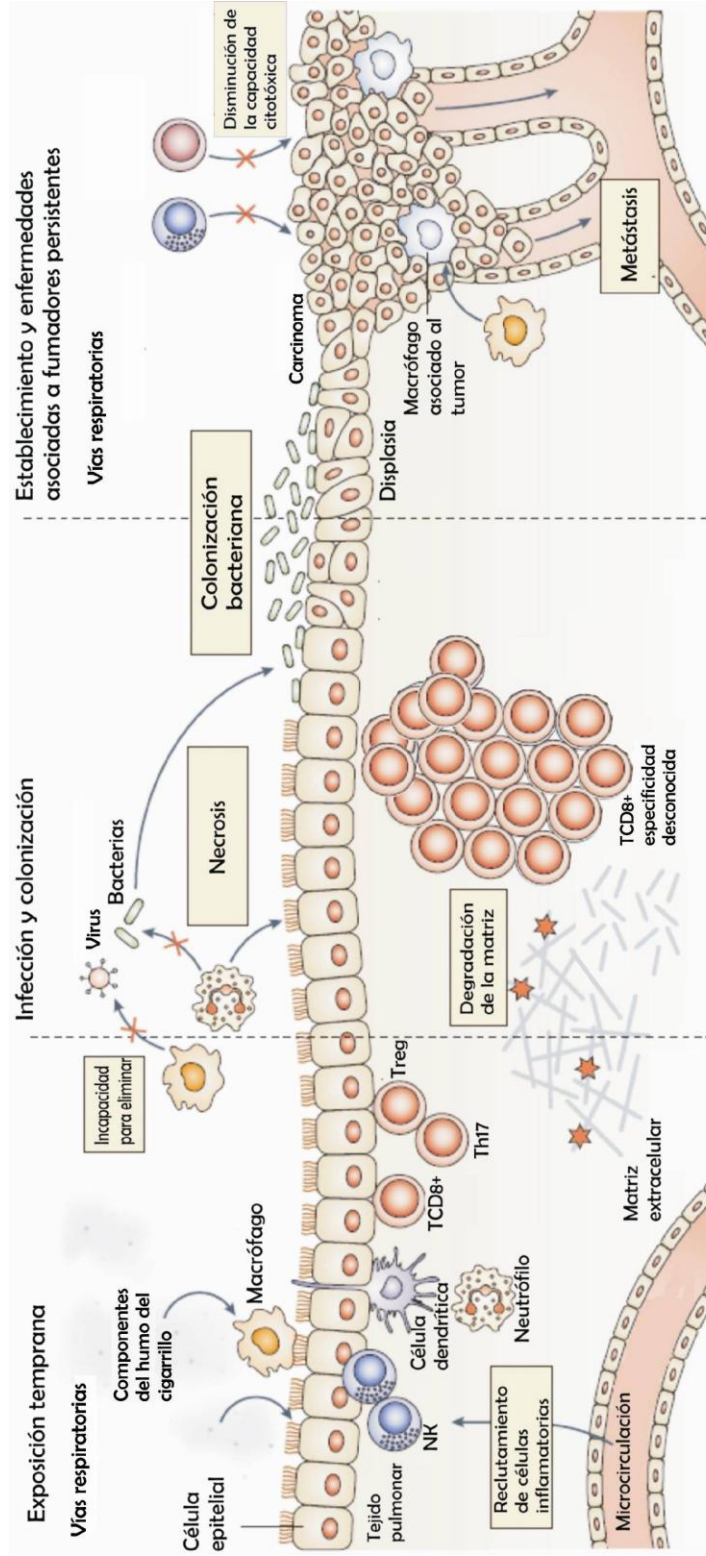


Figura 2: Alteraciones ocasionadas por el hábito tabáquico sobre el sistema inmune. El humo del cigarrillo afecta las células del epitelio pulmonar y a las células del sistema inmune innato y adaptativo, comprometiendo su habilidad para erradicar a los patógenos. Las infecciones persistentes conllevan a un estado de inflamación crónica en donde se favorece el surgimiento de displasias y la transformación maligna que conduce al desarrollo del cáncer. Ver texto para explicación detallada. (Modificada de 6f)

Linfocitos Th17

Por muchos años se consideró el paradigma de la diferenciación de los linfocitos T cooperadores (Th) mediante dos vías mutuamente excluyentes, que conduce a los linfocitos T naïve hacia el perfil Th1 o Th2. Hoy en día se conocen varias subpoblaciones, entre las que se encuentra una población de linfocitos cooperadores capaces de producir IL-17, este tipo efector se denomina Th17.^{1, 5, 14, 45,}

Para que se lleve a cabo la polarización del linfocito T hacia un perfil particular es necesaria la presencia de citocinas específicas que activarán un factor de transcripción maestro (“master”); el cual a su vez será el responsable de conferirle identidad al linfocito Th por medio de la secreción de citocinas. Los linfocitos Th1 requieren de IL-12 que promueve la activación del factor de transcripción T-bet y de esta manera sintetizan IFN- γ el cual caracteriza a esta subpoblación efectora. Por otra parte los linfocitos Th2 necesitan IL-4 y el factor de transcripción GATA-3 para secretar IL-4, IL-5 e IL-13.^{1, 28}

La diferenciación de un linfocito T naïve hacia un efector Th17 no ha sido totalmente aclarada, se han realizado diversos estudios *in vitro* con linfocitos humanos, y algunos otros con células provenientes de ratón, en los cuales se evidencian algunas diferencias. En los ensayos con células murinas se ha determinado que para polarizar los linfocitos naïve hacia Th17 se requiere de IL-6 en combinación con TGF- β ; mientras tanto, en linfocitos humanos se ha observado que el TGF- β no es necesario para la diferenciación, pero sí lo es la IL-6 e IL-1 β .^{14, 28, 63, 75}

La combinación de las citocinas mencionadas, ya sea para linfocitos humanos o de ratón, favorece la expresión de un par de factores de transcripción conocidos como ROR γ y ROR α , a los cuales se les considera los “master” de esta subpoblación.^{14, 28, 40} Hasta ahora no se ha descrito la vía de señalización mediante la cual se favorece la expresión de estos factores de transcripción; sin embargo, se ha logrado establecer que el activador de la transcripción y traductor de señales-3 (STAT-3) está implicado.^{10, 15, 23, 73}

Cuando en una célula T se expresan los factores RORgamma y RORalfa se inicia la transcripción de los genes que codifican para la IL-17 (o IL-17A), IL-17F, e IL-22, que junto con IL-21 son las citocinas que caracterizan esta población efectora.^{14, 28, 30, 42, 45, 55}

Se han realizado diversos ensayos relacionados con la fenotipificación de los linfocitos Th17 humanos, la mayoría de ellos en condiciones polarizantes (presencia de IL-6 e IL-1 β) y se ha reportado que en su membrana se expresan los receptores para IL-21 (IL-21R) e IL-23 (IL-23R), la expresión de estos receptores es favorecida por RORgamma. Se sabe que las IL-21 e IL-23 confieren estabilidad y promueven la proliferación de los linfocitos Th17 (IL-21 lo hace de manera autócrina).^{12, 15, 44} Además de estos receptores, se ha reportado que los linfocitos Th17 expresan el receptor 6 de quimiocina-CC (CCR6),^{1,35} y se ha sugerido que dicha molécula le confiere capacidad para regular su reclutamiento a la zona de inflamación (como ocurre en intestino y pulmón).^{15, 24, 40, 72}

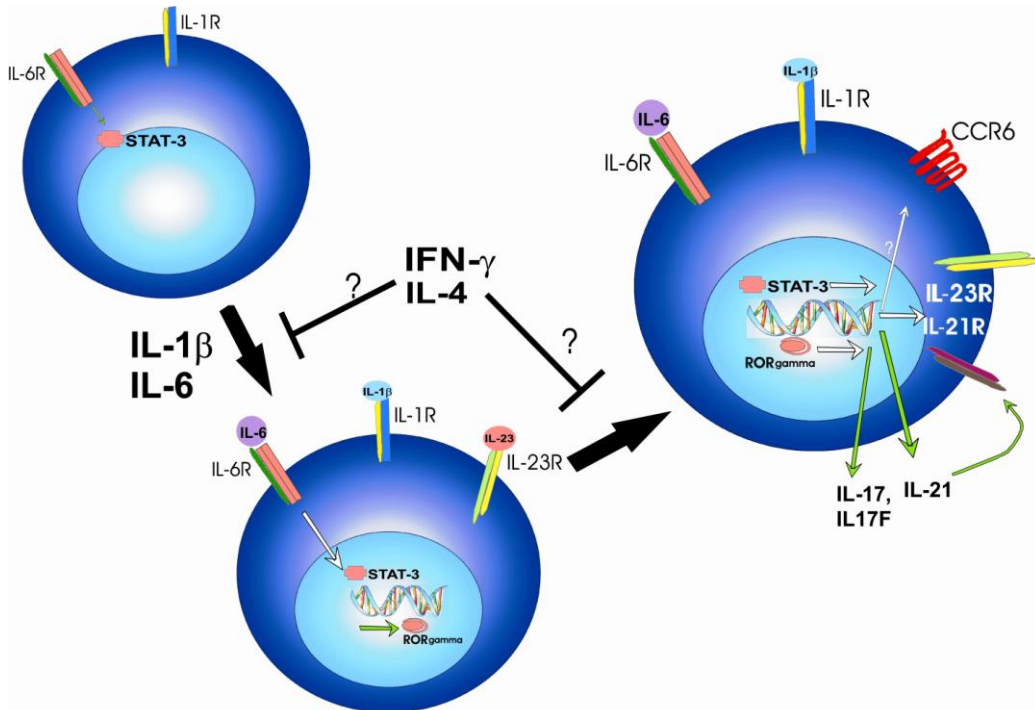


Figura 3: Diferenciación a linfocito Th17. En presencia de IL-6 e IL-1 β un linfocito T naíve se polariza hacia el perfil Th17. STAT3 es una molécula implicada en la diferenciación de esta subpoblación, al ser activado promueve la actividad del factor de transcripción RORgamma el cual a su vez será el responsable de favorecer la producción de las citocinas características de esta estirpe la IL-17, IL-17F; así mismo producirá IL-21 que en conjunto con la IL-23 le conferirán estabilidad al perfil Th17 favoreciendo su proliferación.

El estudio de la función de las células Th17, inicialmente reveló su participación en infecciones por patógenos extracelulares como *C. albicans*; sin embargo, estudios posteriores asocian a ésta subpoblación de linfocitos con el desarrollo de enfermedades autoinmunes y otras patologías asociadas con inflamación crónica (tuberculosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica). Recientemente se le ha relacionado con la progresión del cáncer, confiriéndoles un importante rol patológico.^{1, 15, 34, 23, 25, 73} Los estudios que han llevado a esas conclusiones se fundamentan en bloquear la participación de las citocinas secretadas por los linfocitos Th17 o bien aquellas necesarias para permitir la proliferación de esta población. Para entender los resultados que se obtienen en esos ensayos (que se presentan en la siguiente sección) es necesaria conocer la función de las citocinas involucradas en el perfil Th17, por ello se presenta una breve reseña de cada una de ellas.

IL-17 (IL-17A): La IL-17 se une a su receptor (IL-17RA) que es frecuentemente expresado en células endoteliales, epiteliales y fibroblastos. Recientemente se ha reportado que el receptor IL-17RA puede formar un heterodímero con IL-17RC lo que le confiere diferentes afinidades por la IL-17 o bien una activación mediante una vía distinta de señalización.^{15, 18, 45, 55} El efecto de esta citocina depende de la célula blanco en la que actúa, puede resultar en daño al tejido si se producen metaloproteinasas de matriz (MMP) secretadas por la activación de las células endoteliales y fibroblastos, daño al cartílago por las MMP secretadas por los condrocitos, inflamación por activación de los macrófagos que secretan IL-1, TNF α e IL-6.^{45, 55, 67}

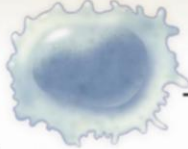





Célula blanco	Efecto y moléculas relacionadas	Efecto biológico	Condición patológica
 Macrófago	Interleucina-1 Interleucina-6 TNF α	Inflamación	Infección Rechazo al trasplante
 Célula epitelial	Interleucina-6 Metaloproteinasas	Activación del epitelio	Trombosis
 Fibroblasto	Interleucina-6 Factores de crecimiento Metaloproteinasas	Destrucción de la matriz extracelular	Esclerosis múltiple
 Osteoclasto	Osteoclastogénesis Metaloproteinasas	Erosión de huesos	Artritis reumatoide Enfermedad periodontal
 Condrocito	Metaloproteinasas	Daño al cartílago	
 Neutrófilo	Interleucina-6	Inflamación	Artritis reumatoide

Figura 4: Células blanco de la interleucina-17. La actividad y el efecto biológico de la IL-17 depende de la célula blanco a la cual activa. En la figura se muestran algunas de las células blanco de dicha interleucina y las patologías en dónde se ha observado su participación. (Modificada de 45)

IL-17F: Sus efectos han sido poco estudiados. En modelos murinos que sobreexpresan dicha citocina se observa que puede provocar inflamación de vías respiratorias y favorece el reclutamiento de neutrófilos, efectos muy similares a los obtenidos en ratones que sobreexpresan IL-17^a; sin embargo, se ha reportado que los efectos de IL-17F son menos potentes.¹⁴

IL-21: Esta interleucina es un importante regulador de la población Th17, se ha demostrado que su expresión es inducida por IL-6 pero es independiente de RORgamma. En modelos murinos se ha observado que la IL-21 bloquea la expresión de FOXP3 evitando que las células expuestas a IL-6 y TGFβ se polaricen hacia linfocitos T reguladores, una población de linfocitos con capacidad inmunosupresora, inducidos principalmente por el TGFβ y que expresan FOXP3 como master de la transcripción.^{3, 15, 39} Sin embargo, se ha reportado la existencia de una población de linfocitos productores de IL-17 FOXP3+.^{6, 71}

IL-22: Es un miembro de la familia de la IL-10, es importante en la regulación de la inflamación y la homeostasis del epitelio, induce la expresión de péptidos antimicrobianos en células epiteliales. Recientemente se ha reportado una población de linfocitos diferentes de Th1, Th2 y Th17 que secretan grandes cantidades de dicha citocina, y se ha propuesto como un nuevo subtipo: linfocitos Th22.^{16, 69}

IL-23: Es un miembro de la familia de IL-12. Esta citocina no es secretada por los linfocitos Th17 pero es importante en su regulación, induce la expresión de IL-17 y favorece su proliferación. Se ha demostrado su participación en la etapa inicial del desarrollo de encefalitis autoinmune experimental (EAE).^{13, 15}

ANTECEDENTES

Linfocitos Th17 en autoinmunidad

En términos generales, las enfermedades autoinmunes son ocasionadas cuando algunas células de ciertos tejidos son blanco de anticuerpos citolíticos o bien de una respuesta inflamatoria sostenida mediada por linfocitos T.⁵⁹ Originalmente se propuso que el estado inflamatorio que originaba la patología debía estar mediada por el perfil Th1 de los linfocitos que infiltraban la zona afectada.⁴⁸

En años recientes se han publicado una serie de investigaciones que asocian el estado inflamatorio crónico con la presencia de IL-17 y principalmente con los linfocitos T capaces de producirla, y que no corresponden al perfil clásico de la respuesta Th1.

Koenders en un modelo de artritis experimental, encuentra que la sobreexpresión de IL-17 provoca daño en las articulaciones, independientemente de la presencia o no de IL-1.³² Komiyama y cols.³³ reportan la inducción de encefalitis autoinmune experimental (EAE) en ratones tanto silvestres como IL-17^{-/-} y observan que en los ratones knock out existe una resistencia a desarrollar EAE, que se manifiesta por menor daño al tejido en comparación con los ratones silvestres. De forma complementaria, Langrish y cols.³⁸ reportan que la capacidad de inducción de EAE provocada en ratones IL-23^{-/-} es menor que en ratones silvestres, y con una serie de experimentos posteriores concluyen que la inducción de EAE por linfocitos Th17 es mayor a la observada con linfocitos Th1.⁴⁹

En cuanto a reportes en humanos destaca el estudio de Nistala⁴⁸, que señala un aumento significativo de linfocitos Th17 en el líquido sinovial comparado con los provenientes de sangre periférica de pacientes con artritis idiopática juvenil al. De forma similar se ha observado un incremento en la expresión de IL-17 en biopsias de piel de pacientes con psoriasis y en sangre periférica de pacientes con esclerosis múltiple.³⁴

El mecanismo por el cual se desarrolla el daño al tejido, revela que la IL-17 presente tiene diferentes células blanco (de acuerdo a la patología), como son neutrófilos, células endoteliales, fibroblastos, osteoblastos y condrocitos. Con estas células

activadas ocurre la producción de IL-6, TNF α y metaloproteinasas de matriz, que son las causantes del daño al tejido.⁴⁵

Linfocitos Th17 en cáncer

En los últimos años se han estudiado las implicaciones de la IL-17 y de los linfocitos Th17 en enfermedades autoinmunes, y por su nuevo papel protagónico se han comenzado a realizar estudios en relación al cáncer.

En primera instancia se ha observado que en ratones con sobreexpresión de IL-17 ocurre inflamación espontánea de las vías respiratorias e hiperplasia de la mucosa, manifestando el posible rol patológico de dicha interleucina.¹⁴ En contraparte, un estudio en el que inoculan células tumorales de cáncer de colon subcutáneamente y por vía intravenosa, tanto en ratones silvestres como en deficientes de IL-17, demuestra que hay un aumento descontrolado del crecimiento tumoral subdérmico y además una mayor cantidad de metástasis hacia pulmón en los ratones deficientes de IL-17.³⁶ Con ello surge la hipótesis de que la IL-17 endógena confiere un estado protector.

Por otra parte, Kryczek y cols.,³⁷ al inducir diferentes tipos de tumores en ratones y cuantificar la cantidad de linfocitos Th17 en diferentes tejidos, reportan que los ratones con cáncer incrementan significativamente el porcentaje de linfocitos Th17, en sangre, médula ósea y bazo, pero no así en ganglios linfáticos, al compararlos con los ratones sanos, además demuestran la presencia de dichos linfocitos en el infiltrado tumoral. Aunado a estos resultados, dicho grupo de investigación realiza los primeros ensayos sobre cuantificación de linfocitos productores de IL-17 en tumores humanos (cáncer de páncreas, riñón y ovario), destacando el hecho de encontrar de un 3 a 6% de células CD3+IL-17+ infiltrando el tejido tumoral, y un incremento significativo de dichas células en sangre periférica de pacientes con cáncer de ovario, respecto a los niveles presentes en donadores sanos.³⁷

Las primeras conclusiones debidas a los resultados anteriormente citados proponen que la IL-17 tiene mayoritariamente un rol protumoral. Con el paso del tiempo han surgido algunos reportes que sustentan ésta hipótesis.^{46, 70, 76, 77}

Zhang y cols.⁷⁷ estudiando cáncer gástrico reportan porcentajes incrementados de linfocitos Th17 en sangre periférica respecto a donadores sanos, dicho comportamiento lo observan también en ganglios linfáticos que drenan al tumor. Además, reportan una correlación directa entre el porcentaje de células Th17 y el estadio clínico del tumor. Miyahara y cols.⁴⁶ revelan que en cáncer de ovario no hay diferencias en los porcentajes de linfocitos Th17 en sangre periférica de pacientes y sujetos sanos; mientras que, Zhang y cols.⁷⁷ reportan en pacientes con carcinoma hepatocelular, un decremento en linfocitos Th17 en sangre periférica respecto a sujetos sanos. Sin embargo, ambos autores reportan porcentajes elevados de dichas células al estudiar los linfocitos infiltrantes del tumor, concluyendo que el microambiente intratumoral puede favorecer la presencia y participación de los linfocitos Th17, ya sea porque son atraídos quimiotácticamente, o bien porque el microambiente favorece su diferenciación. Sea cual fuere la causa, lo cierto es que existe la posibilidad de que dichas células mantengan un estado inflamatorio que promueva el crecimiento tumoral.

46, 78

Dichas conclusiones se basan en que algunas líneas de cáncer de ovario y carcinoma pulmonar son capaces de secretar IL-1 β o IL-6 necesarias en la polarización a Th17.^{4, 46} Además, en ensayos de co-cultivo de células tumorales (de cáncer de ovario) con células presentadoras de antígeno (activadas con LPS) y linfocitos T, el porcentaje de linfocitos Th17 se incrementa respecto al inicial. En estos estudios se ha reportado que en un co-cultivo donde están presentes las tres especies de células. Dicho incremento es atribuido a un microambiente favorable para que las células T se diferencien en linfocitos Th17.⁴⁶

En contra de dichos resultados Sandel y cols.⁶⁵ reportan que en cáncer de próstata, se encuentra un incremento significativo de linfocitos Th17 infiltrantes del tumor, respecto a los porcentajes presentes en la sangre periférica de los pacientes; sin embargo, dichos autores reportan una relación inversa con el grado de avance del tumor, por lo que sugieren que los linfocitos Th17 desempeñan un efecto antitumoral o bien que la participación de dichos células es independiente de las citocinas producidas localmente.

Por otra parte, Yang y cols.^{74,75} estudiando biopsias de pacientes con linfoma no-Hodgkin reportan porcentajes significativamente menores de células Th17 al compararlos con los de sangre periférica de donadores sanos. Dicho grupo de investigadores propone que las células tumorales bloquean la diferenciación hacia linfocitos Th17, favoreciendo la participación de células Treg, lo que contribuye a una deficiente respuesta inmune en el linfoma no-Hodgkin. Estos resultados son opuestos a los observados en cáncer de ovario, gástrico, de próstata y de carcinoma hepatocelular. De todas estas evidencias, se desprende una nueva visión acerca de los linfocitos Th17 y de la interleucina-17 entorno al desarrollo tumoral. Se propone que dicha citocina tiene efectos protumorales así como antitumorales:

Funciones protumorales: La IL-17 activa células endoteliales y fibroblastos induciendo la producción de IL-6, VEGF y TGF β , lo cual propicia un microambiente que favorece la angiogénesis y el crecimiento tumoral. Además se induce la expresión de MMP que pueden favorecer la metástasis.^{47, 73}

Funciones antitumorales: los linfocitos Th17 pueden potenciar las funciones efectoras tanto de los CTL's como de las NK y neutrófilos. También estimulan la secreción de IL-12 por parte de los macrófagos que resulta en la activación de CTL's. Finalmente, pueden regular la maduración de las células dendríticas resultando en una eficiente presentación de antígenos.^{27, 47}

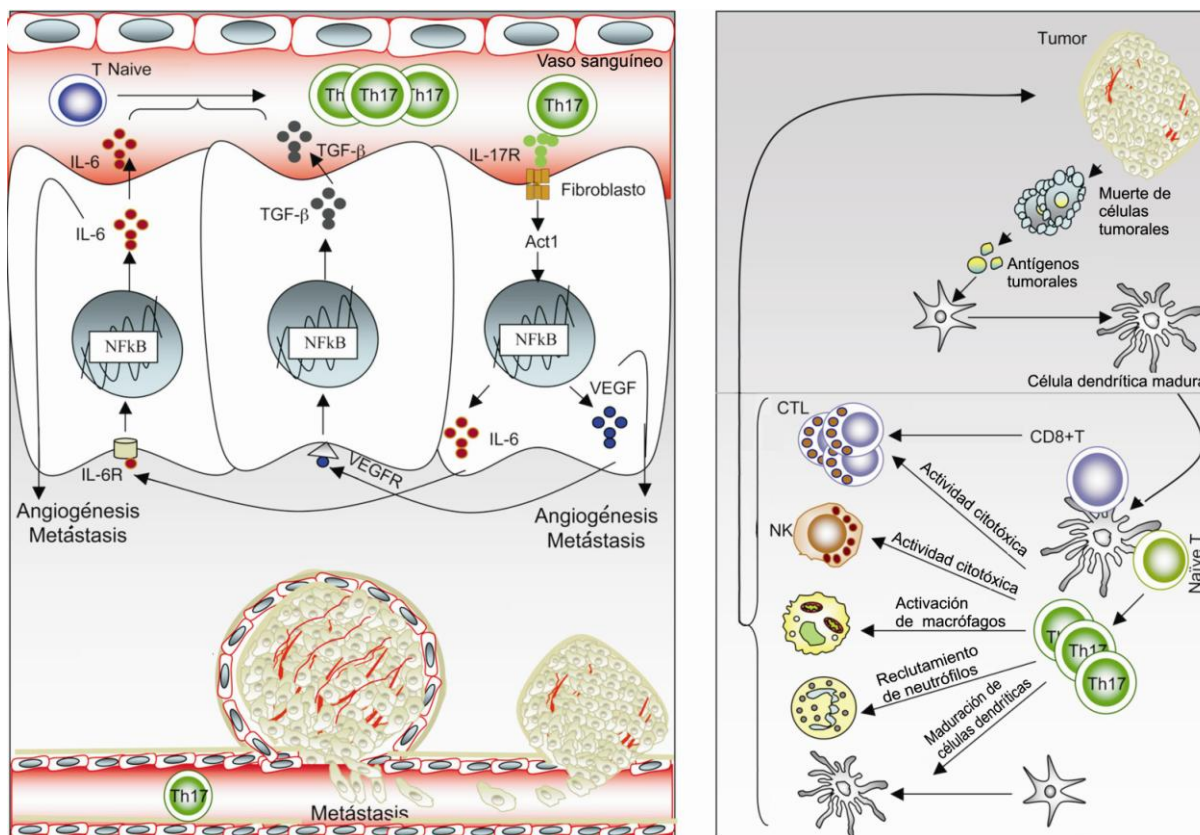


Figura 5: Efecto dual de los linfocitos Th17. Se muestran los posibles efectos de la población de linfocitos Th17 sobre el desarrollo tumoral. La producción de VEGF, TGF β y metaloproteinasas ejemplifican los efectos protumorales que favorecen la angiogénesis y la metástasis. Dentro de los efectos antitumorales se observa la activación de macrófagos y la maduración de células dendríticas que favorecen una eficiente presentación de antígenos y con ello la activación de la respuesta inmune. (Modificada de 47)

Linfocitos T en Cáncer Pulmonar

Cómo se ha mencionado, el estudio de los linfocitos infiltrantes del tumor ha sido extenso. La idea de que un infiltrado mayoritariamente de linfocitos correlaciona con un pronóstico favorable en pacientes con varios tipos de cáncer es aceptada.⁶⁵ En este contexto y particularmente con relación al cáncer de pulmón, se han realizado ensayos enfocados al estudio de los linfocitos presentes en derrames pleurales, pues como ya se mencionó, es un buen modelo para estudiar la respuesta inmune en relación al cáncer.⁵⁷

Se ha reportado que en derrames pleurales de pacientes con carcinoma pulmonar se incrementa el porcentaje de linfocitos T CD4+ y decremента el de T CD8+, respecto a la sangre periférica de los mismos pacientes. Por otra parte, el perfil de citocinas de los linfocitos T CD4+ es predominantemente Th1 ya que el 45% (intervalo 26-69%) de los linfocitos T CD4+ secretan IFN γ , y que un reducido porcentaje de linfocitos T CD4+ (menor al 1%) secretan IL-4.⁵⁷ Se desconoce el del porcentaje restante de linfocitos T CD4+; sin embargo, es probable que sean Th17 ya que el cáncer pulmonar se asocia al habito tabáquico, lo que proporciona un estado de inflamación crónico. Esta hipótesis se apoya en que se ha demostrado que la adición de sobrenadante del cultivo de líneas tumorales de carcinomas pulmonares a células presentadoras de antígeno, estimula en estas últimas la secreción de IL-6, además de que se ha reportado que las líneas de carcinoma pulmonar secretan TGF- β y dos de ellas liberan además, IL-1 β e IL-6.

IL-17 en Cáncer Pulmonar

Hasta ahora, solo hay un reporte en NSCLC en el que determinan, mediante inmunohistoquímica las células productoras de IL-17. Reporta que en el cincuenta por ciento de los casos el porcentaje de leucocitos productores de IL-17 es superior al 5%, dicho estudio no es concluyente ya que se desconoce las estirpes responsables de la secreción de IL-17 (se menciona que la tinción para detectar IL-17 se presenta tanto en células con morfología linfoide como granulocítica) y si las células productoras de dicha citocina desempeñan un papel biológico en el desarrollo del tumor.¹¹ Por lo que es necesario realizar estudios que evalúen si los linfocitos Th17 tienen una participación pro o antitumoral en NSCLC.

HIPÓTESIS

Si en el derrame pleural maligno la interacción entre las células tumorales y las células inmunes originan un microambiente propicio para la diferenciación de los linfocitos TCD4+IL-17+, entonces dicho derrame presentará porcentajes elevados de linfocitos TCD4+IL17+ respecto a derrames de patologías no malignas.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el porcentaje de Linfocitos TCD4+ productores de IL-17 en derrame pleural de pacientes con carcinoma pulmonar, así como el porcentaje de linfocitos TCD4+ que expresan marcadores para la subpoblación de linfocitos Th17 (CCR6, RORgamma).

OBJETIVOS PARTICULARES

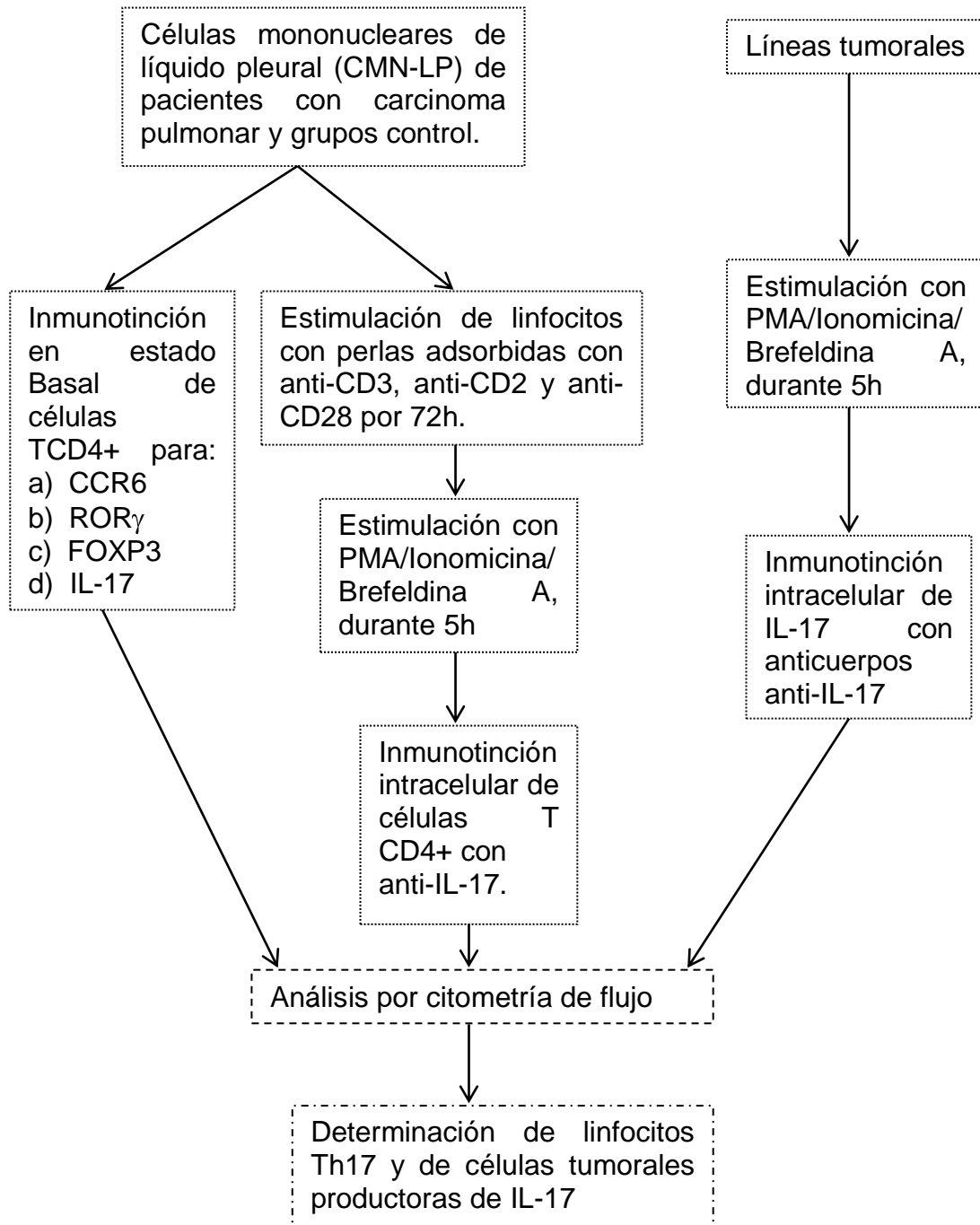
- Determinar la presencia de linfocitos TCD4+IL-17+ en derrames malignos y no malignos (crónicos y no crónicos).
- Determinar el porcentaje de linfocitos TCD4+IL-17+ en estado basal y post-estimulación tanto en células mononucleares de derrames de origen maligno como aquellos ocasionados por patologías crónicas y no crónicas.
- Determinar el porcentaje de linfocitos TCD4+ que presentan el marcador CCR6.
- Determinar el porcentaje de linfocitos TCD4+ que presentan el factor de transcripción RORgamma.
- Correlacionar el porcentaje de linfocitos TCD4+IL-17+ con el porcentaje de linfocitos TCD4+RORgamma+.
- Determinar si las líneas tumorales de carcinoma pulmonar producen IL-17.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estrategia experimental

Inmunofenotipificación y cuantificación de linfocitos TCD4+ productores de IL-17.

Determinación de la producción de IL-17 por líneas tumorales.



Material biológico

Se utilizaron un total de 24 derrames pleurales de pacientes con diagnóstico de cáncer pulmonar con una media de edad de 68 años y un rango de edad entre 51-92 años; 19 correspondieron a adenocarcinoma pulmonar, cuatro a mesotelioma y una a carcinoma pulmonar de células pequeñas.

Como grupo control se incluyeron 10 pacientes con derrame pleural causado por tuberculosis (TB) que se clasificaron como crónicos con una media de edad de 49 años (rango 28-82 años) y derrames pleurales de origen no crónico que incluyeron dos neumonías, dos insuficiencias cardíacas, un empiema, un hemotórax y un neumotórax con una edad promedio de 46 años (rango 25-62).

Los derrames pleurales fueron obtenidos por toracocentesis aséptica realizada por personal médico del INER. El líquido fue colectado en matraces con heparina, posteriormente fue centrifugado obteniéndose un botón celular, el cual contenía tanto células mononucleares (CMN-LP) como tumorales (CT-LP). Estas dos poblaciones celulares fueron separadas por medio de gradientes discontinuos de Lymphoprep (Axis-Shield, Oslo, Noruega) y congeladas para su estudio posterior.

Purificación de células mononucleares

Las CMN-LP fueron descongeladas, lavadas con medio RPMI-1640 y resuspendidas medio RPMI-1640. Esta suspensión celular fue nuevamente colocada en gradientes discontinuos de Ficoll-Hypaque, y centrifugados a 1500rpm durante 30 min, finalmente se recolectaron las fracciones de células mononucleares (linfocitos principalmente).

Determinación del fenotipo de linfocitos CD4+ en estado basal.

Para determinar la población de linfocitos T cooperadores (CD4+) que expresan CCR6, IL-17, RORgamma y/o FOXP3, se emplearon las siguientes combinaciones de anticuerpos monoclonales (mAbs): anti-CD4-Quantum-Red (clona Q4120, Sigma, St Louis, MO), anti-CD4-FITC (clona ,Sigma, St Louis, MO), anti-CD4-PE-Cy5 (clona OKT4, Biolegend, San Diego CA), anti-CCR6-Alexa488 (clona TG7/CCR6, Biolegend, San Diego CA), anti-RORgamma-PE (clona AFKJS-9, eBioscience, San Diego, CA), anti-FOXP3 Alexa488 (clona 150D, Biolegend, San Diego CA) y anti-IL-17-PE (clona BL168, Biolegend, San Diego, CA).

A 1×10^5 linfocitos en solución salina amortiguadora de fosfatos conteniendo 1% de albúmina sérica bovina (BSA) y 0.1% de NaN_3 en adelante denominada PBS/BSA. Posteriormente se adicionaron los anticuerpos anti-CCR6 Alexa488 y anti-CD4 PECy5, Quantum-Red o FITC para antígenos de membrana, según la combinación de antígenos establecida para la tinción intracelular, a la concentración óptima de trabajo incubándose en oscuridad a temperatura ambiente (TA) durante 30 min. Al concluir la incubación, se realizó un lavado con PBS/BSA y las células se fijaron en solución de Lisis (BD PharMingen, San Diego, CA) a TA durante 10 min.

Después de realizada la tinción de membrana, se realizó la tinción de antígenos intracelulares, por lo que las células se incubaron a TA por 10 min con la disolución de permeabilización (BD PharMingen, San Diego, CA). A las células permeabilizadas se adicionó el anticuerpo anti-IL17 PE, anti-RORgamma PE o anti-FOXP3 Alexa488 a la concentración óptima de trabajo incubándose en oscuridad a temperatura ambiente (TA) durante 30 min. Finalmente las células fueron fijadas con 1% de paraformaldehído.

Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo, adquiriendo 10000 eventos provenientes de la región de linfocitos CD4+ (determinada como se indica más adelante) por muestra.

Estimulación de CMN-LP para posterior detección de linfocitos TCD4+ productores de IL-17

5x10⁵ células fueron estimuladas con perlas adsorbidas con anticuerpos monoclonales anti-CD3, anti-CD2 y anti-CD28 (10µg/mL c/u, Miltenyi Biotec, Auburn CA), en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibióticos (20000UI/mL de penicilina G sódica y 20mg/mL de estreptomicina). La mezcla se incubó en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y a 37°C durante 72 h. Cada 24h se realizó cambio de medio de cultivo metabolizado por medio RPMI 1640 fresco.

Al cabo de las 72 h, se realizó un estímulo adicional con una mezcla de PMA (forbol-miristiato-acetato) (25ng/mL), ionomicina (1µg/mL) y brefeldina A (10µg/mL) durante 5 h en las mismas condiciones de incubación. A continuación se realizó la inmunotinción, con los anticuerpos anti-CD4 PECy5 y anti-IL17 PE. Se utilizaron 2x10⁵ células y se realizó la tinción de membrana e intracelular como se describió anteriormente.

Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo, adquiriendo 20000 eventos provenientes de la región de linfocitos CD4+ (determinada como se indica en la sección de análisis) por muestra.

Líneas tumorales

Se emplearon 6 líneas celulares de carcinoma pulmonar tres de ellas A-427, A-549 y Calu-1 adquiridas de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Las tres líneas restantes fueron establecidas en el Laboratorio de Cáncer Pulmonar del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER) a partir de derrames pleurales de pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar, estas líneas fueron designadas 1.3.11, 3A5A y OSJV-1.

Estimulación de líneas tumorales de carcinomas pulmonares

Las líneas tumorales empleadas fueron cultivadas en cajas T-25 (Nunc, Dinamarca) con 5mL de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con antibióticos. Las células fueron incubadas en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y a 37°C hasta alcanzar un 85-90% de su confluencia, tras lo cual las células fueron desprendidas por tratamiento con tripsina y agitación mecánica. La viabilidad, determinada por azul de tripano, fue superior a 87% en todos los casos. A continuación, se adicionaron 2x10⁵ células en cada pozo de una placa de 24 pozos; a esas células se adicionó una mezcla conteniendo PMA (25, 50 y 100ng/mL)-ionomicina (1μg/mL)-Brefeldina A (10μg/mL), durante 5 h.

Tinción intracelular de IL-17 en líneas tumorales

Posterior a la estimulación, las células tumorales fueron desprendidas por medio de tripsina y agitación mecánica, y tratadas con una disolución de fijación durante 10 min, y después de lavar, las células se incubaron por 10 minutos con la disolución para permeabilizar (como se indicó anteriormente). Las células tratadas fueron incubadas con el anticuerpo anti-IL-17 a TA durante 30 min. Finalmente, las células fueron fijadas con 1% de paraformaldehído.

Las células tumorales fueron analizadas por citometría de flujo, adquiriendo 20000 eventos.

Análisis de muestras por citometría de flujo

Todas las muestras fueron adquiridas y analizadas en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, San José, Ca) utilizando el programa CellQuest.

Para el análisis de las poblaciones de linfocitos, primero se realizó una gráfica de tamaño vs granularidad, de ella se delimitó una región (R1) correspondiente a los linfocitos. A partir de R1 se trazó una gráfica de CD4 vs. granularidad y se seleccionó la región (R2) correspondiente a los linfocitos CD4+. Finalmente considerando R1 y R2 se realizaron las gráficas para las determinaciones, en el caso de las células en estado basal (sin estimular) se realizaron las gráficas CCR6 vs IL-17 y ROR γ vs FOXP3 y para las células estimuladas se realizó la gráfica CD4 vs. IL-17 (ver figura 6).

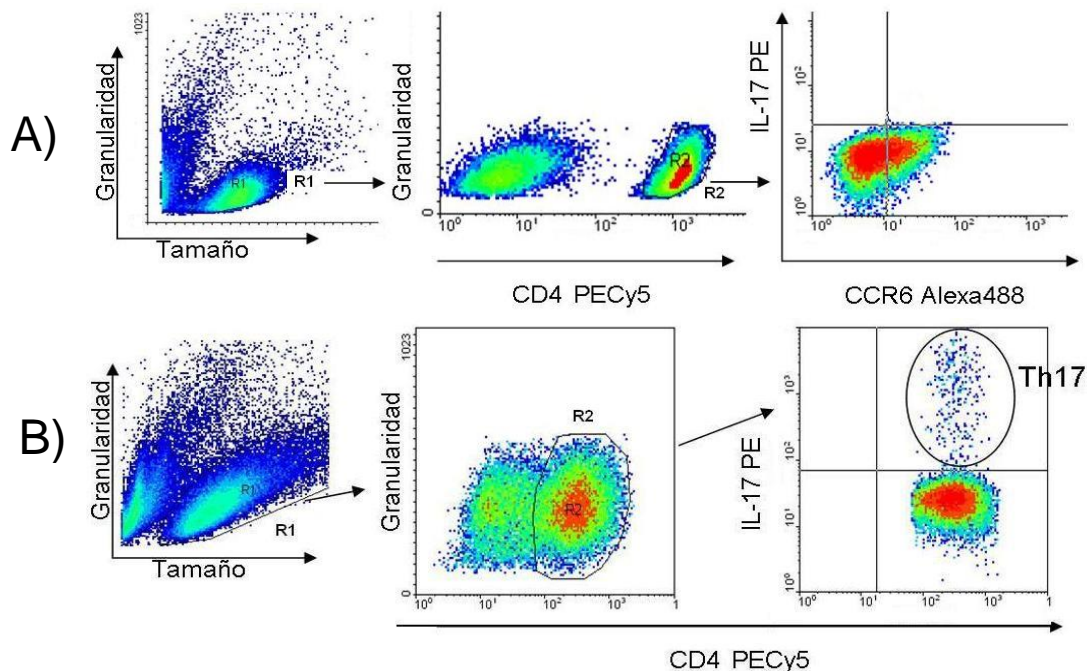


Figura 6: Análisis representativo de la población de linfocitos. En la grafica tamaño vs. granularidad se delimitó la zona de linfocitos (R1), de ella se seleccionaron los linfocitos TCD4+ (R2). A partir de R1 y R2 se realizó una gráfica de **A)** CCR6 vs. IL-17 de dónde se determinaron las poblaciones en estado basal (un análisis similar fue realizado para ROR γ y FOXP3), y **B)** CD4 vs. IL-17, para la determinación de la población de linfocitos productores de IL-17 en células estimuladas.

Para el análisis del porcentaje de células tumorales que producen IL-17 se hizo un análisis similar. Se construyó una gráfica de tamaño vs. granularidad de la que se delimito una región (R1) correspondiente a las células tumorales. Con respecto a R1 se

realizó un histograma para determinar el porcentaje de células tumorales productoras de IL-17 vs granularidad determinando el porcentaje de células tumorales IL-17 (ver figura 7).

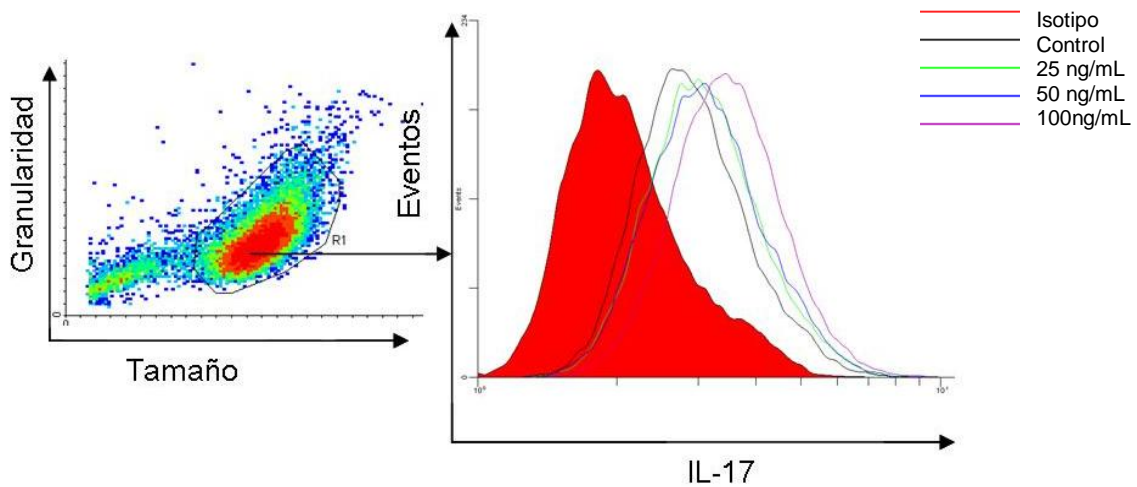


Figura 7. Análisis representativo de las líneas tumorales. De la gráfica tamaño vs. granularidad se marcó la región de células tumorales (R1), a partir de esta región se construyó una gráfica IL-17 vs. granularidad para determinar el porcentaje de células productoras de IL-17 y un histograma en dónde se muestra el comportamiento a diferentes dosis de PMA.

Análisis estadístico

Para elegir las pruebas estadísticas adecuadas se, determinó la distribución de las poblaciones estudiadas, la distribución de la población de linfocitos Th17 en los pacientes con cáncer no mostró una distribución gaussiana, mientras que las restantes sí.

Se realizaron las comparaciones entre las poblaciones de linfocitos Th17 de pacientes con carcinoma pulmonar y con enfermedades crónicas (tuberculosis) y no crónicas, mediante la prueba U de Mann-Whitney

Se compararon las poblaciones de linfocitos TCD4+CCR6+, TCD4+ROR γ +, TCD4+FOXP3+ entre pacientes con carcinoma pulmonar, tuberculosis y enfermedades no crónicas, utilizando la prueba estadística ANOVA. Para todas las comparaciones de considero una $P < 0.05$ como nivel de significancia estadística.

RESULTADOS

Determinación del fenotipo de las células TCD4+ en estado basal

- Análisis del receptor CCR6 en CMN-LP

Una de las moléculas utilizadas en la fenotipificación de las células Th17 es el receptor CCR6; sin embargo, se sabe que CCR6 no es un marcador específico para los linfocitos Th17, ya que también se presenta en la membrana de las células TCD4+ con perfil Th1.⁴⁰

Se determinó el porcentaje de células TCD4+CCR6+ provenientes de los derrames pleurales de pacientes y controles. En la Figura 8 se muestra un análisis representativo correspondiente a la determinación de dicha molécula.

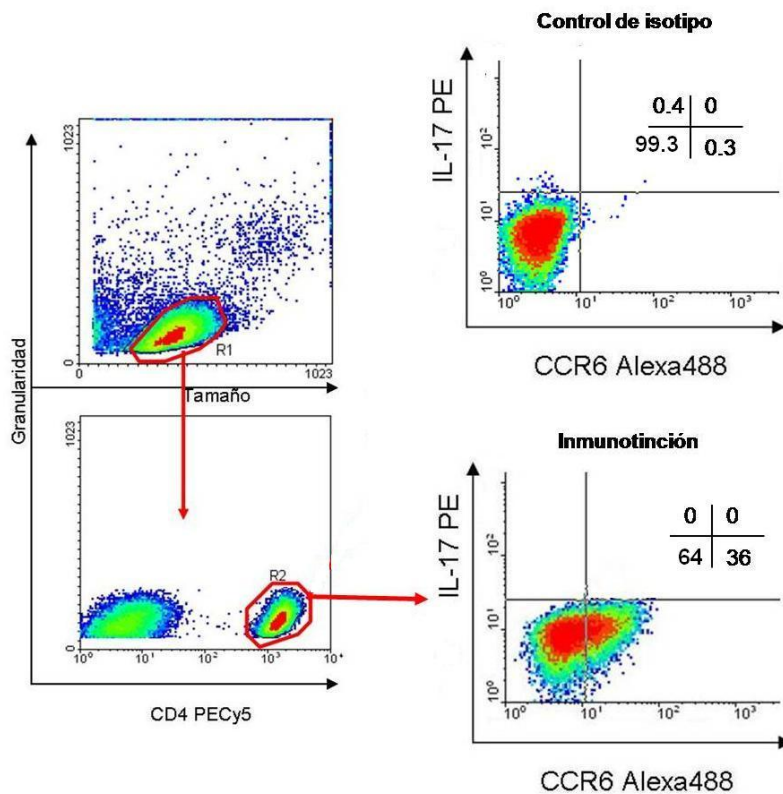


Figura 8: Análisis representativo de la población de linfocitos T CD4+CCR6+ provenientes de CMN de los derrames pleurales en estado basal (sin estimular). R1 corresponde a la población de linfocitos, R2 a los linfocitos TCD4+. A partir de R1 y R2 se realizó un dot plot para determinar los linfocitos TCD4+CCR6+IL-17+

En los diferentes grupos de estudio se detectaron células TCD4+ con el receptor CCR6 como se muestra en el dot plot representativo de la Figura 8. Sin embargo, en ningún grupo de estudio se detectó la población de linfocitos TCD4+CCR6+ productores de IL-17 en condiciones basales, por lo que únicamente se reportan los porcentajes de células TCD4+CCR6+. En la Figura 9 se presenta la media de los porcentajes de las células TCD4+CCR6+ tanto de pacientes con carcinoma pulmonar como los de patologías no malignas crónicas (Tuberculosis "TB") y no crónicas. Se observó que la media para el grupo de derrames pleurales de origen tuberculoso fue ligeramente mayor que la de los derrames malignos y los no crónicos; sin embargo, no se obtuvieron diferencias estadísticas significativas entre los diferentes grupos. Dichos resultados sugieren que la presencia de células tumorales en el derrame pleural no altera la presencia o el reclutamiento de células T CD4+CCR6+ en los derrames de origen maligno.

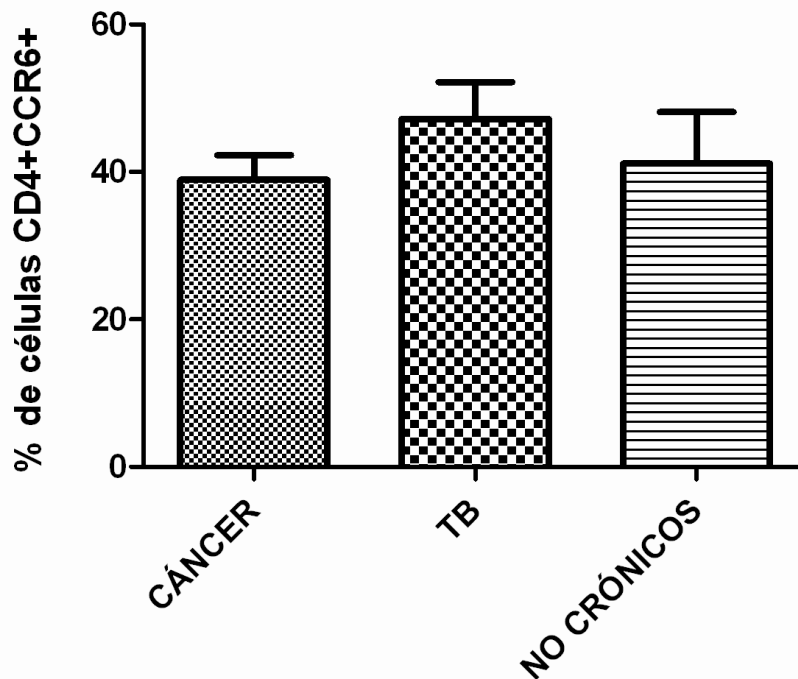


Figura 9: Porcentajes de linfocitos T CD4+CCR6+ provenientes de derrames pleurales de pacientes con cáncer pulmonar (n=22), tuberculosis (TB) (n=8) y otras patologías no crónicas (n=7). Se indica la media y la barra representa el error estándar.

-Porcentajes de CMN-LP que expresan el factor de transcripción RORgamma o que expresan el factor de transcripción FOXP3

Se ha reportado que el factor de transcripción RORgamma es crucial en la diferenciación de la subpoblación Th17.^{14, 28, 40} Para el presente trabajo se analizó la población de linfocitos TCD4+ que expresan dicho factor de transcripción. Así mismo se analizó el factor de transcripción FOXP3, puesto que algunos autores hacen mención de que existe una regulación mutuamente excluyente entre linfocitos Th17 y Treg.^{30,42,75} La Figura 10 muestra el análisis representativo de dónde se determinaron los porcentajes de linfocitos TCD4+RORgamma+ y TCD4+FOXP3+.

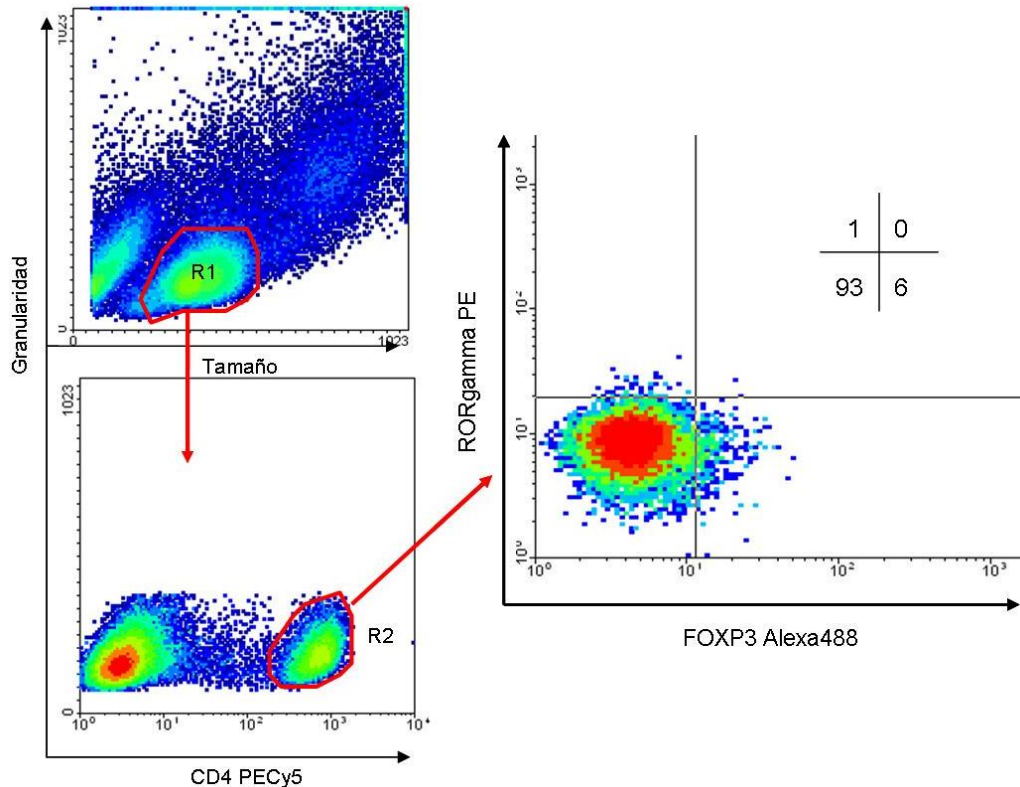


Figura 10: Análisis representativo de las poblaciones de linfocitos TCD4+RORgamma+ y TCD4+FOXP3+ en condiciones basales (sin estímulo). A partir de la población de linfocitos (R1) se seleccionó la región de linfocitos TCD4+ (R2). Considerando R1 y R2 se realizó el gráfico de densidad, donde se obtuvieron los porcentajes para cada fenotipo.

La población de linfocitos TCD4+ provenientes de cada grupo experimental presenta porcentajes tanto de células TCD4+RORgamma+ como de TCD4+FOXP3+ que podrían

corresponder a linfocitos Th17 y Treg, respectivamente. No se encontraron linfocitos doble positivos para los factores de transcripción RORgamma y FOXP3. El porcentaje de la población de linfocitos TCD4+FOXP3+ fue mayor que el porcentaje de TCD4+RORgamma+, sugiriendo una mayor participación de dichas células en la respuesta inmune en el derrame pleural. Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de linfocitos TCD4+RORgamma+ de los pacientes con cáncer y patologías crónicas (tb) y no crónicas. Pero sí las hubo entre los derrames de pacientes con tuberculosis y los de patologías no crónicas como lo muestra la Figura 11. Respecto a los linfocitos T con fenotipo CD4+FOXP3+ se observó el mayor porcentaje en los derrames de origen maligno y el menor porcentaje en los derrames pleurales de patologías no crónicas; sin embargo, no hubo diferencias significativas entre ninguno de los grupos (ver Figura 12).

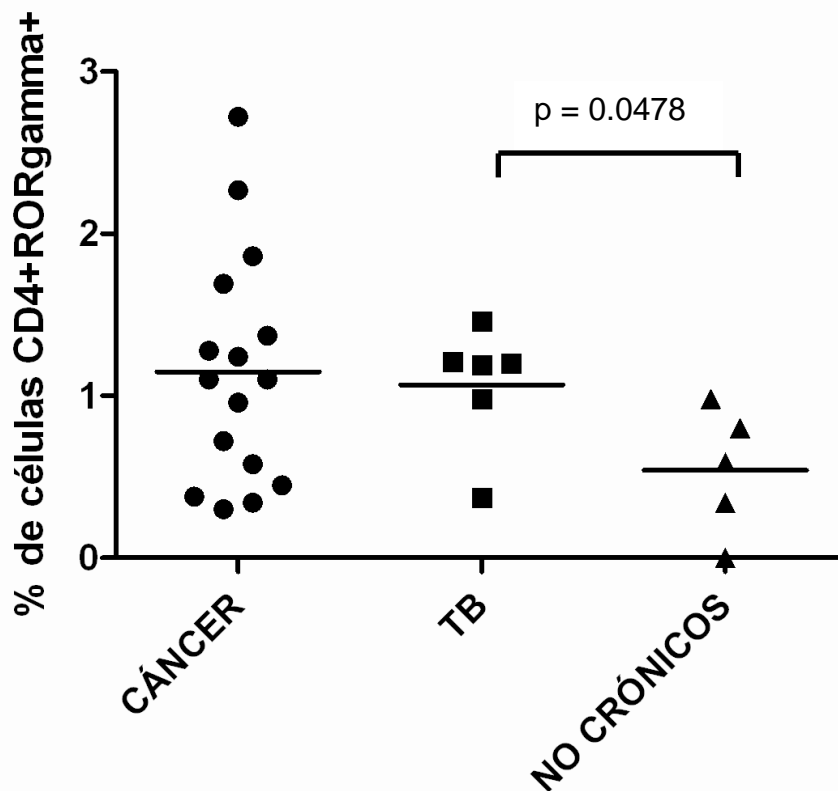


Figura 11: Porcentajes de linfocitos TCD4+RORgamma+ (en condiciones basales) provenientes de derrames pleurales de pacientes con carcinoma pulmonar (n=16), tuberculosis (n=6) y otras patologías no crónicas (n=5). La línea negra representa la media.

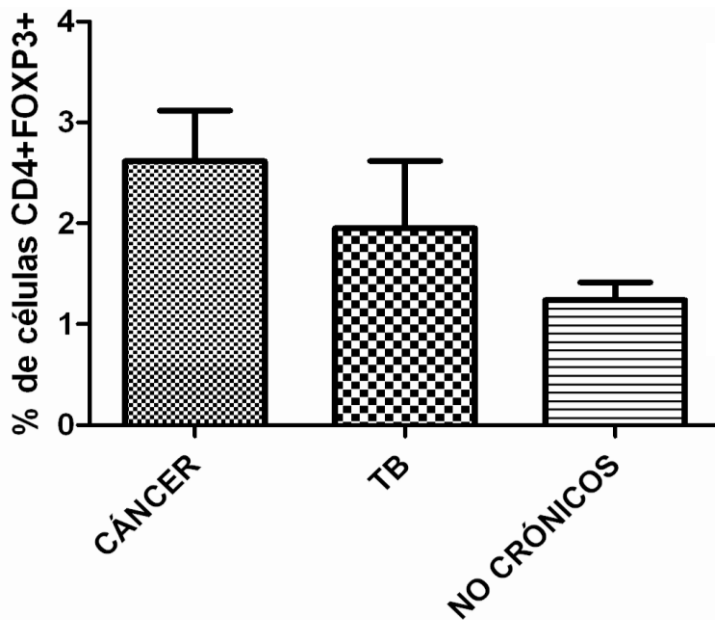


Figura 12: Porcentajes de linfocitos TCD4+FOXP3+ (en linfocitos sin estimular) provenientes de derrames pleurales de pacientes con carcinoma pulmonar (n=10), tuberculosis (n=3) y otras patologías no crónicas (n=5). La barra representa el error estándar.

Se determinó si existía una correlación entre los porcentajes de células TCD4+FOXP3+ y TCD4+RORgamma+ en los derrames de origen maligno. En la Figura 13 se muestra que la correlación entre las poblaciones mencionadas es inversa (valor de r); sin embargo, no es estadísticamente significativa.

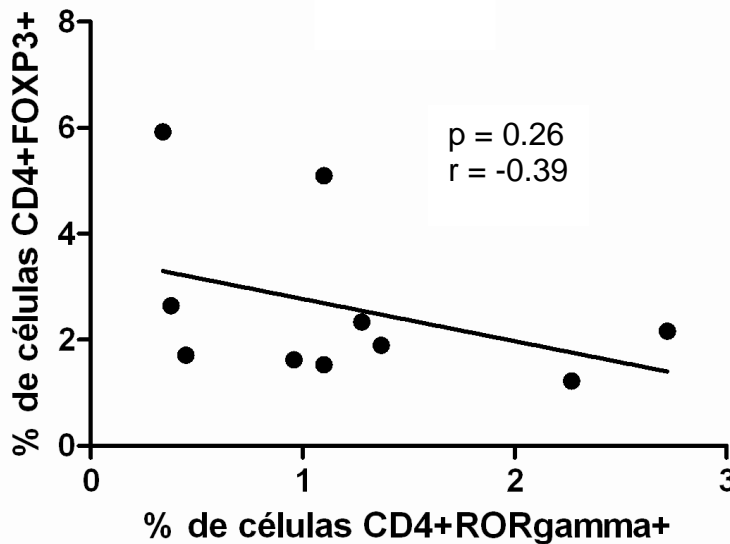


Figura 13: Correlación inversa entre las poblaciones de linfocitos TCD4+FOXP3 y TCD4+RORgamma+ en los derrames pleurales de origen maligno. Se muestran los valores de p y r que indican que la correlación inversa no es significativa

Estimulación de CMN-LP para posterior detección de linfocitos TCD4+ productores de IL-17

Ya que en las células TCD4+ en estado basal no fue posible detectar en ninguna muestra de los tres grupos de estudio (con excepción de un empiema) la producción de IL-17. Se decidió proporcionar un estímulo a los linfocitos para favorecer la producción de citocinas y de esta manera detectar a aquellos linfocitos TCD4+ capaces de producir IL-17.

Para ello se probaron cuatro estímulos en presencia de brefeldina A, i) PMA/Ionomicina durante 5h, ii) Anticuerpos agonistas anti-CD3, anti-CD28 por 72h, iii) Perlas adsorbidas con anti-CD2, anti-CD3 y anti-CD28 por 72h y v) Perlas adsorbidas con anti-CD2, anti-CD3 y anti-CD28 durante 72h + PMA/Ionomicina por 5h. Los dos primeros estímulos son reportados comúnmente en varios ensayos, el tercer y cuarto estímulo fue elegido como una variación del reportado por Yang y cols.⁷⁵ en la determinación de linfocitos Th17 en biopsias de linfomas no-Hodgkin.

En la Figura 14 se muestran las gráficas representativas de la detección de células TCD4+IL-17+ para cada estímulo. Las CMN-LP utilizadas en los diferentes estímulos provienen del mismo paciente.

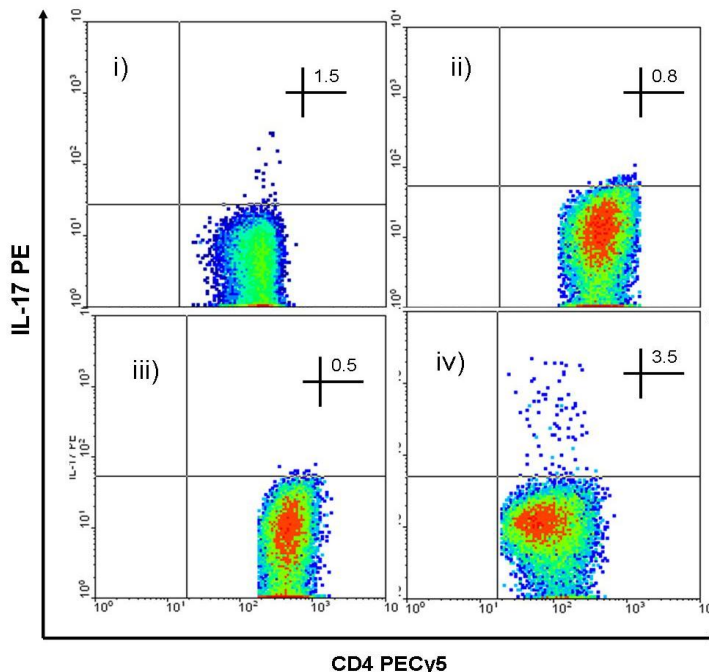


Figura 14: Porcentajes de linfocitos TCD4+IL17+ determinados bajo diferentes estímulos
i) PMA/Ionomicina (5h)
ii) Anticuerpos agonistas anti-CD3 adsorbido, anti-CD28 soluble (72h),
iii) Perlas adsorbidas con anti-CD2, anti-CD3 y anti-CD28 (72h) y
iv) Perlas adsorbidas con anti-CD2, anti-CD3 y anti-CD28 (72h) + PMA/Ionomicina (5h).

Los resultados muestran que el porcentaje de células TCD4+IL-17+ en los pacientes con cáncer pulmonar es menor que para los otros dos grupos; sin embargo, dicha diferencia no alcanza la significancia estadística.

De acuerdo con un reporte reciente, la producción de IL-17 se ha atribuido también a una población de linfocitos Treg,⁶ por ello se realizó un ensayo para determinar si en los derrames de origen maligno estaba presente dicha población. En la Figura 16 se muestra una dot plot representativo donde se observan claramente las poblaciones CD4+IL-17+ y CD4+FOXP3+, pero no aquella con coexpresión de IL-17 y FOXP3. El ensayo reveló que la población responsable de la producción de IL-17 no coexpresa el factor de transcripción FOXP3.

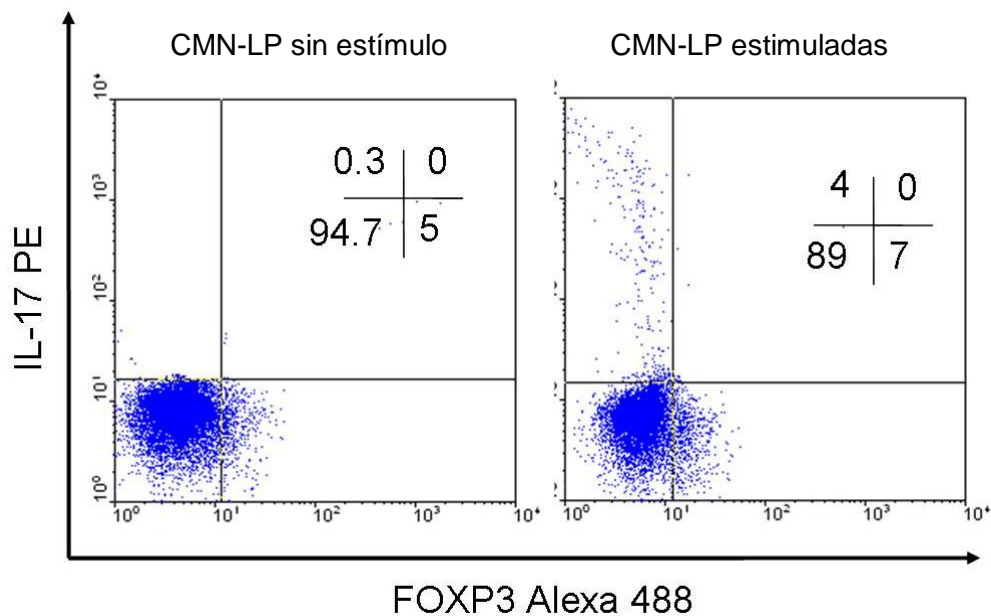


Figura 16: Análisis representativo de linfocitos TCD4+FOXP3+ (Treg) provenientes de un derrame pleural maligno en donde se observa que dicha población no produce IL-17. La población celular graficada proviene de la región de linfocitos CD4+ determinada como se muestra en la figura 3. La gráfica de la izquierda corresponde a las células sin estímulo y la de la derecha a las estimuladas con PMA (50ng/mL)/Ionomicina durante 5h en presencia de brefeldina.

Además de determinar que las células CD4+FOXP3+ no producen IL-17, este ensayo nos mostró que el porcentaje de linfocitos TCD4+FOXP3+ se incrementó después del estímulo (ver Tabla 1) reflejando que hay una inducción del factor de transcripción FOXP3 después de 5 horas de estímulo con PMA(50ng/mL)/Ionomicina en presencia de brefeldina, sugiriendo que el estímulo favorece la traducción del mRNA que codifica para FOXP3.

Tabla1: Porcentaje de linfocitos TCD4+FOXP3+ provenientes de CMN-LP de origen maligno.

Sin estimulo	Con estímulo
2.2	4.2
5.0	7.3
5.1	6.8

De acuerdo con diversos reportes, las células T que expresan RORgamma pueden producir IL-17;^{14,28,40} en este sentido, se espera que exista una correlación entre los porcentajes de linfocitos T CD4+IL-17+ y CD4+RORgamma+. De los derrames de origen maligno se realizó el análisis de correlación correspondiente a dichas poblaciones y el resultado se presenta en la Figura 17. En dicha figura se observa una tendencia que muestra que puede existir una correlación directa entre las dos poblaciones celulares citadas.

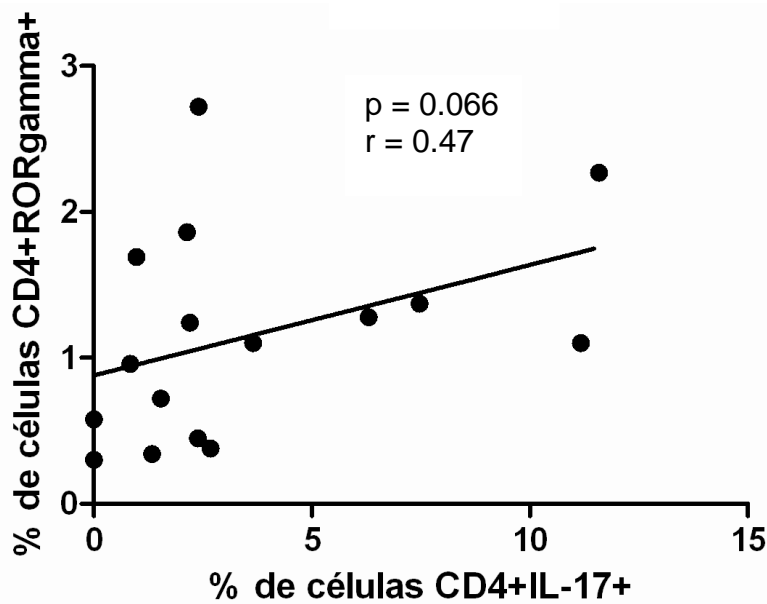


Figura 17: Correlación directa entre las poblaciones de linfocitos TCD4+IL-17+ y TCD4+RORgamma+ en los derrames pleurales de origen maligno. Se muestran los valores de p y r que muestran una tendencia

Tinción intracelular de IL-17 en líneas tumorales

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican una tendencia a presentar un menor porcentaje de linfocitos TCD4+IL-17+ en los derrames malignos con respecto a los derrames pleurales de patologías no crónicas y tuberculosis. Además, hay un reporte¹¹ sobre biopsias de NSCLC en donde los resultados respecto a las células productoras de IL-17 en el infiltrado tumoral no son concluyentes, por ello planteó la posibilidad de que las células tumorales pudieran favorecer directamente el ambiente proinflamatorio mediante la producción de IL-17. Para evaluar dicha posibilidad se realizó un ensayo en 6 líneas tumorales de carcinoma pulmonar, las cuales se estimularon con PMA/Ionomicina/brefeldina. De las 6 líneas analizadas se determinó que en la línea tumoral A-427 29% de la población produce IL-17, además se observó una respuesta concentración-dependiente al estímulo, las restantes líneas tumorales no expresaron IL-17 (Ver Figura 18).

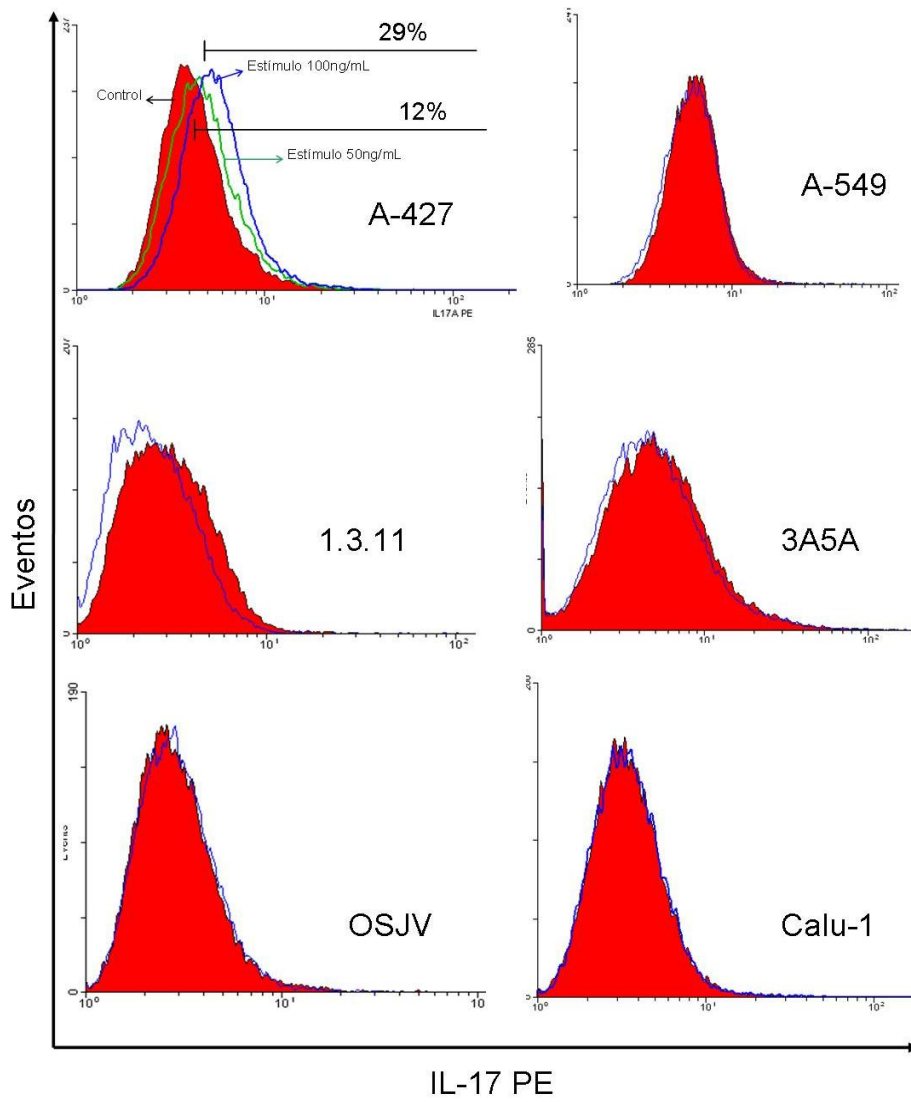


Figura 18: Porcentajes de células tumorales productoras de IL-17. Solo en la línea A-427 se detectó una población productora de dicha interleucina. El área roja representa el control, la línea azul indica las células de las líneas tumorales estimuladas con PMA (100ng/mL)/ Ionomicina durante 5h

DISCUSIÓN

En los últimos años han surgido reportes que indican porcentajes elevados de linfocitos Th17 en el infiltrado tumoral de varios tipos de tumores, pero no se sabe si estos son inducidos por el microambiente tumoral o si son reclutados desde un sitio distante. Además hay controversia sobre el papel que desempeñan dichos linfocitos en el sitio del tumor.⁷⁹ Por ello, resulta necesario el continuar con los estudios de esta subpoblación de linfocitos en el infiltrado tumoral y en otros sistemas biológicos para aclarar alguno de los aspectos mencionados.

Respecto al cáncer pulmonar, Chen y cols¹¹ estudiando cortes histológicos de NSCLC reportan que en el 52% de los casos analizados el porcentaje de células productoras de IL-17 es mayor al 5%. Los autores mencionan que dichas células corresponden a linfocitos y neutrófilos y que correlacionan con una menor sobrevida, por lo que podrían desempeñar un papel protumoral. Sin embargo, el hecho de que reporten dicho comportamiento en el 52% de los casos apoya la controversia que hasta ahora se ha mantenido respecto a la IL-17 y el tumor.

Nosotros estudiamos el porcentaje de linfocitos TCD4+IL-17+ en derrame pleural de pacientes con cáncer pulmonar, proponiendo que este sistema biológico nos permita obtener información adicional y complementaria a la obtenida en el infiltrado tumoral por Chen y cols. El derrame pleural maligno contiene células del sistema inmune y células tumorales por lo que se considera un sitio adecuado para el estudio de la respuesta inmune tumoral y los mecanismos de evasión. Se ha descrito que en el derrame pleural causado por carcinoma pulmonar hay un incremento en el porcentaje de linfocitos TCD4+.^{57,56} Dentro de dicha población se ha encontrado predominantemente un perfil Th1 45%(26-69) vs 0.5%(0.1-1.5) de Th2;⁵⁶ sin embargo, hay un porcentaje de linfocitos Th cuyo fenotipo se desconoce. Nosotros proponemos que hay un comportamiento análogo entre el derrame pleural y el infiltrado tumoral, de tal forma que una parte de los linfocitos Th de fenotipo hasta ahora desconocido corresponden en cierto porcentaje a linfocitos Th17 y Treg como lo refleja el presente trabajo.

Se sabe que las células tumorales son capaces de secretar citocinas antiinflamatorias como mecanismo de evasión, entre ellas TGF- β e IL-10; así mismo, también se ha reportado que son capaces de producir interleucinas proinflamatorias como IL-1, IL-8 e IL-6.^{4,31} De esta forma, en el microambiente tumoral están presentes las citocinas necesarias para la diferenciación de linfocitos naïve hacia Th17.⁷⁹ En ese sentido, existe la posibilidad de que en el derrame pleural maligno se presenten estas mismas condiciones y que por ende los linfocitos Th17 sean inducidos en el compartimento pleural.

Diversos estudios referentes al programa de diferenciación del perfil Th17 han concluido que el factor de transcripción RORgamma es el factor de transcripción master de esta subpoblación y el responsable de conferirles la característica de producir IL-17.^{14, 28, 40} Por ello en nuestro estudio se determinó en CMN-LP sin estimular (condiciones basales), el porcentaje de linfocitos TCD4+ que expresan el factor de transcripción RORgamma de los derrames pleurales malignos, para evaluar si las células tumorales tienen influencia sobre la presencia de dicha subpoblación de linfocitos. Dicho porcentaje fue comparado con el obtenido en derrames inducidos por tuberculosis puesto que se ha demostrado que en la respuesta inmune en el pulmón en contra de *M. tuberculosis* participan linfocitos Th17.¹³ No hubo diferencias significativas sugiriendo que las células tumorales no favorecen la presencia de linfocitos TCD4+RORgamma+; sin embargo, se hizo una consideración extra en este punto ya que se ha asociado la presencia de linfocitos Th17 con la inflamación crónica como se reporta en enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide^{32,55} e infección por *H. pylori*.⁷⁷ En ese sentido tanto el cáncer como la tuberculosis son consideradas patologías crónicas, hecho con el cual se puede explicar el que no haya diferencias entre los porcentajes de linfocitos TCD4+RORgamma+ en estos derrames. Para poder dilucidar sobre este aspecto, se incluyó un grupo de derrames inducidos por patologías no crónicas, y se determinó el porcentaje de las mismas células. Se comparó dicho porcentaje con los obtenidos en derrames malignos y de tuberculosis.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que los derrames de patologías crónicas (cáncer y tuberculosis) tienden a presentar un porcentaje mayor de linfocitos T

CD4+RORgamma+ que los de patologías no crónicas, lo que es explicable si se considera el supuesto en el que un linfocito TCD4+RORgamma+ corresponde a un linfocito Th17 y que éstos a su vez participan preferentemente en la inflamación crónica. Sin embargo, la diferencia solo fue significativa al comparar el grupo de tuberculosis con el de patologías no crónicas. El que no haya diferencias entre el grupo de cáncer y el de patologías no crónicas puede deberse a la mayor dispersión en la distribución de los porcentajes que presentó en el grupo de cáncer. Para poder determinar si existe o no diferencias entre estos grupos se podría realizar un análisis diferente del factor de transcripción RORgamma ya que existe la posibilidad de que algunas de las células analizadas expresen el factor de transcripción RORgamma en una cantidad que no fue detectada por el análisis de citometría de flujo, por ejemplo, puede cuantificarse el mRNA de dicha proteína mediante RT-PCR.

Por otra parte, para evaluar si las células tumorales tienen influencia sobre la presencia de linfocitos Th productores de IL-17 se determinó el porcentaje de linfocitos TCD4+IL-17+ (en CMN-LP estimuladas) en los derrames de los tres grupos experimentales: cáncer, tuberculosis (Tb) y no crónicas. Se realizó la comparación de los porcentajes de dichas células entre los tres grupos y no hubo diferencias significativas sugiriendo que en el derrame pleural la presencia de linfocitos Th productores de IL-17 no está relacionada con el origen etiológico, sino con la formación del derrame *per se* o bien que las células tumorales no influyen en la presencia de linfocitos TCD4+IL-17. Si bien no se encontraron diferencias estadísticas, se observa una tendencia en dónde hay un menor porcentaje de linfocitos TCD4+IL-17+ en los derrames malignos sugiriendo que las células tumorales no solo no favorecen la presencia de dichas células sino que pudieran bloquearlas o bloquear su capacidad para producir IL-17. Esta última idea surge a partir de los resultados obtenidos en los porcentajes de linfocitos TCD4+RORgamma+ que fueron muy similares en los grupos de cáncer y tuberculosis; sin embargo, este comportamiento no se mantuvo al determinar los porcentajes de células TCD4+IL-17+, donde el porcentaje mayor fue en el grupo de tuberculosis reflejando que posiblemente las células tumorales afectan la capacidad de los linfocitos

Th para producir IL-17 o bien que la estimulación proporcionada a las CMN-LP favoreciera la muerte de linfocitos Th17 a través de la muerte celular inducida por activación como se ha observado para otras subpoblaciones efectoras en los derrames pleurales de carcinomas pulmonares.^{56,57}

Recientemente Ayyoub y cols⁶ reportan que existe una población de linfocitos Treg (definidos en el presente trabajo como linfocitos TCD4+FOXP3+) que expresan el factor de transcripción RORgamma constitutivamente y además son capaces de producir IL-17, con ello y dado que en el presente trabajo se definió a los linfocitos Th17 como células TCD4+IL-17+, existía la posibilidad que entre éstos, se encontraran algunos linfocitos Treg productores de IL-17, de tal forma que se realizó la inmunotinción correspondiente a fin de discernir si en los derrames pleurales de origen maligno estaban presentes o no dichos linfocitos. De los derrames analizados se detectaron las poblaciones TCD4+FOXP3+IL-17- y TCD4+FOXP3-IL-17+ y no se encontró una población de linfocitos TCD4+FOXP3+IL-17+, por lo que proponemos que una población equivalente a la población reportada por Ayyoub y cols. no está presente en los derrame de origen maligno.

Cuando se analizó la inmunotinción para determinar los linfocitos Treg productores de IL-17 se observó un hecho interesante, el porcentaje de linfocitos TCD4+FOXP3+ se incrementó alrededor de 2% en la población estimulada comparada con la población no estimulada (estado basal). Es probable que el estímulo con PMA/Ionomicina incrementara la traducción del mRNA que codifica para la proteína FOXP3 de aquellos linfocitos que ya estaban diferenciados en Treg pero que no habían sintetizado FOXP3 o bien que la población no estimulada expresara este marcador en baja proporción y que el análisis por citometría de flujo no permitía identificarlos como positivos.

Por otra parte, al excluir la posibilidad de tener presentes una población de linfocitos Treg IL-17+, se determinó si existía alguna correlación entre las células TCD4+ productoras de IL-17 y los linfocitos TCD4+RORgamma+. En este sentido, nosotros encontramos una tendencia en la que se observa una correlación positiva, por lo que proponemos que sí existe una relación directa entre las células TCD4+RORgamma+ y los linfocitos Th17, lo que apoya la idea de que las células que expresan RORgamma

pueden producir IL-17. Aunque es necesario incrementar el tamaño de la muestra y realizar más estudios para confirmar dicha correlación.

Diversos autores han propuesto un mecanismo mutuamente excluyente en la diferenciación de los linfocitos Th17 y los Treg,^{30, 42, 65, 75} con base en dicha propuesta y debido a que se encontraron bajos porcentajes de linfocitos TCD4+ que expresan el factor de transcripción RORgamma, se decidió cuantificar, en CMN-LP sin estimular, la población de linfocitos Treg (TCD4+FOXP3+) en los tres grupos experimentales. En los resultados se observó un comportamiento similar al de la población de linfocitos TCD4+RORgamma+, es decir una tendencia en donde se aprecia un porcentaje mayor de linfocitos Treg en los derrames malignos y de tuberculosis; sin embargo, los porcentajes fueron mayores a los de la población TCD4+RORgamma+. Estos hallazgos concuerdan con lo reportado para linfocitos infiltrantes del tumor,^{37,65} ya que se observa un ambiente inmunosupresor propiciado por las mismas células tumorales y que favorece la diferenciación de linfocitos T naïve a Treg.^{4, 37, 46, 65}

Por otra parte, se analizó una posible correlación inversa entre las subpoblaciones de células TCD4+RORgamma+ y TCD4+FOXP3+ que podría ser evidencia de la hipótesis que postula que ambas poblaciones comparten alguna vía de diferenciación y, de acuerdo al microambiente, una población predomina a costa de la otra.⁷⁹ Se encontró que dicha correlación no fue significativa, lo que puede deberse a que no existe una correlación entre dichas poblaciones en el derrame pleural o bien que por el reducido número de pacientes incluidos no fue posible establecerla. No obstante, nosotros sugerimos una correlación inversa y esta propuesta contrasta con lo reportado por Sfanos y cols.⁶⁵ en el cáncer de próstata, quienes proponen una correlación directa entre los linfocitos Th17 y Treg aunque debido a la naturaleza del anticuerpo anti-FOXP3 que utilizan no pueden discernir si en realidad están cuantificando linfocitos Treg o T activados (estos autores realizan la inmunotinción en linfocitos T estimulados). Probablemente esta sea la causa principal de la discrepancia en los resultados obtenidos por nosotros y este grupo.

Finalmente, se evaluó la posibilidad de que en el derrame pleural maligno haya un reclutamiento de linfocitos Th17. En los estudios iniciales en los que se caracterizó a la

subpoblación estas células, se determinaron algunas moléculas, citocinas y factores de transcripción presentes en el fenotipo de dicha subpoblación. Entre las moléculas estudiadas, se propuso al receptor de quimiocinas CCR6 como una molécula presente en el fenotipo de la subpoblación de linfocitos Th17; sin embargo, no es exclusiva de esta estirpe ya que se expresa también en linfocitos Th1.^{40,79} Dicha molécula es el receptor para el ligando CCL20 que es un factor quimiotáctico. En este sentido los linfocitos TCD4+CCR6+ pueden ser reclutados mediante el ligando CCL20 producido por los macrófagos durante una respuesta inflamatoria, como lo demostraron Harrison y cols²⁴ en pulmón y Wang y cols⁷² en intestino. Así mismo se ha reportado que CCL20 se encuentra en el microambiente tumoral⁷⁹, por lo que se planteó la posibilidad de que los linfocitos TCD4+CCR6+ fuesen reclutados al derrame pleural maligno.

Para demostrar dicha posibilidad se determinaron los porcentajes de linfocitos TCD4+CCR6+ en los derrames de los tres grupos experimentales, como se ha presentado en la sección de resultados no hubo diferencias estadísticas entre dichas poblaciones entre los tres grupos. Este resultado sugiere varios escenarios: i) la formación del derrame pleural *per se* podría ser responsable de la presencia de dicha población, es decir, que la acumulación de linfocitos T CD4+CCR6+ en el derrame pleural obedezca solamente a un factor mecánico como el aumento de la permeabilidad capilar o bien la disminución del drenaje linfático; ii) las células tumorales en los derrames pleurales no influyen en la presencia (porcentaje) de células TCD4+CCR6+; iii) otra posibilidad es que ocurra un reclutamiento de la población mencionada, pero que este sea independiente del origen patológico que conlleva a la formación del derrame pleural, o bien que dependiendo el origen etiológico haya un reclutamiento preferente entre los perfiles Th1 o Th17 por medio del CCR6, es decir que haya diferencias en el balance Th1/Th17 entre los diversos grupos; sin embargo, como se detectó la población de linfocitos TCD4+CCR6+ en general, no se aprecian dichas diferencias. Se requieren más estudios para aclarar este aspecto.

Tinción intracelular de IL-17 en líneas tumorales de carcinoma pulmonar

Se ha mencionado la capacidad que tienen las células tumorales para producir citocinas antiinflamatorias y proinflamatorias,^{4,31,79} en este sentido se evaluó en el presente trabajo la posibilidad de que las líneas tumorales de carcinoma pulmonar produzcan IL-17. En este ensayo se observó que sólo 1/6 líneas tumorales la produce.

En general, y dado que el 83% de las líneas tumorales estudiadas no producen IL-17 proponemos que la IL-17 que pudiera encontrarse en el microambiente tumoral no sería debida a las células tumorales sino a linfocitos Th17 y posiblemente neutrófilos como lo reporta Chen y cols¹¹; sin embargo, se requieren estudios complementarios para determinar que estirpe celular contribuye mayoritariamente y la relevancia o función de dicha citocina en el microambiente tumoral.

En resumen, los linfocitos TCD4+ productores de IL-17 están presentes en el derrame pleural maligno inducido por carcinoma pulmonar; sin embargo, los estudios realizados en el presente trabajo sugieren que la presencia de dichas células en este fluido no es favorecida por la presencia de células tumorales y las citocinas que pudieran secretar, sino que la formación del derrame pleural *per se* y el estado inflamatorio que éste conlleva, son los responsables de que dichos linfocitos se encuentren en los derrames pleurales, pues como se demostró, los porcentajes encontrados de linfocitos TCD4+IL-17+ en los derrames de los tres grupos son similares y no difieren estadísticamente. De una manera similar los porcentajes de células TCD4+RORgamma+ no difieren entre los grupos de cáncer y tuberculosis, reforzando la idea de que las células tumorales no influyen sobre dicha subpoblación. Así mismo los porcentajes de células TCD4+CCR6+ sugieren que las células tumorales no influyen sobre el reclutamiento de dicha subpoblación.

Por otra parte, el porcentaje de linfocitos TCD4+FOXP3+ en el grupo de pacientes con cáncer pulmonar fue ligeramente mayor que en los otros dos, sugiriendo una mayor participación de esta subpoblación de linfocitos. Sin embargo, se necesita incrementar el número de muestras así como realizar estudios complementarios para poder

determinar la participación de los linfocitos Th17 y Treg en el cáncer de pulmón; entre ellos, la determinación de los porcentajes de dichas subpoblaciones en sangre periférica y compararlas con sangre de donadores sanos, fumadores pesados, en ese sentido se espera que aquellos pacientes que han fumado durante un gran periodo de tiempo y que siguen manteniendo este hábito presenten mayor porcentaje de linfocitos Th17 puesto que el hábito tabáquico se relaciona con la inflamación crónica^{20, 66} además de determinar estos mismos porcentajes en cortes histológicos de la zona tumoral y tejido sano adyacente al tumor.

CONCLUSIONES

- En los derrames pleurales se encontraron poblaciones de linfocitos T con el fenotipo: CD4+RORgamma+; CD4+FOXP3+; CD4+CCR6+ en CMN-LP sin estimular y CD4+IL-17+ en CMN-LP estimuladas.
- No hay diferencias entre los porcentajes de la población de células TCD4+CCR6+ indicando que el tumor no afecta a dicha población.
- En todos los grupos experimentales se encontraron mayores porcentajes de células TCD4+FOXP3+ que de células TCD4+RORgamma+ indicando que las primeras tienen una mayor participación.
- Las células TCD4+FOXP3+ de los derrames malignos analizados no producen IL-17.
- Las poblaciones de linfocitos TCD4+IL-17+ y TCD4+RORgamma+ correlacionan directamente apoyando la idea de que RORgamma confiere la capacidad para producir IL-17.
- Las células TCD4+IL-17+ tienden a presentarse en menor porcentaje en los derrames malignos.
- Las líneas tumorales estudiadas no produjeron IL-17 (83%) bajo estimulación.

REFERENCIAS

1. Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, Sallusto F, Napolitani G. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol*. 2007;8:639-46.
2. Aguiar LM, Antonangelo L, Vargas FS, Zerbini MC, Sales MM, Uip DE, Saldiva PH. Malignant and tuberculous pleural effusions: immunophenotypic cellular characterization. *Clinics*. 2008;63:637-44.
3. Allan SE, Passerini L, Bacchetta R, Crellin N, Dai M, Orban PC, Ziegler SF, Roncarolo MG, Levings MK. The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4+ Tregs. *J Clin Invest*. 2005;115:3276-84.
4. Avila-Moreno F, López-González JS, Galindo-Rodríguez G, Prado-García H, Bajaan S, Sánchez-Torres C. Lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma cell lines use different mediators to induce comparable phenotypic and functional changes in human monocyte-derived dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2006;55:598-611.
5. Awasthi A, Kuchroo VK. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *Int Immunol* 2009;21:489-98.
6. Ayyoub M, Deknuydt F, Raimbaud I, Dousset C, Leveque L, Bioley G, Valmori D. Human memory FOXP3+ Tregs secrete IL-17 ex vivo and constitutively express the T(H)17 lineage-specific transcription factor RORgamma t. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:8635-40.
7. Blagosklonny MV. Cell immortality and hallmarks of cancer. *Cell Cycle*. 2003;2:296-9.
8. Blagosklonny MV. Molecular theory of cancer. *Cancer Biol Ther*. 2005;4:621-7.
9. Camacho DF., Garavito CE. Derrame pleural. En: Guía para manejo de urgencias, Bogotá, Universidad El Bosque 2002; 557-562.
10. Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, Samstein RM, Liang Y, Kas A, Rudensky AY. CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science*. 2009;326:986-91.
11. Chen X, Wan J, Liu J, Xie W, Diao X, Xu J, Zhu B, Chen Z. Increased IL-17-producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients. *Lung Cancer*. 2009.

12. Chen Z et al. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Semin Immunol* 2007;19:400-8.
13. Curtis MM, Way SS. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology*. 2009;126:177-85.
14. Dong C. Differentiation and function of pro-inflammatory Th17 cells. *Microbes Infect*. 2009;11:584-8.
15. Dong C. Th17 cells in development: an updated view of the molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:337-48
16. Duhon T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol*. 2009;10:857-63.
17. Fong KM, Sekido Y, Gazdar AF, Minna JD. Lung cancer. 9: Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax*. 2003;58:892-900.
18. Gaffen SL. An overview of IL-17 function and signaling. *Cytokine*. 2008;40:2-7.
19. Gavin P. Dunn, Catherine M. Koebel & Robert D. Schreiber. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature Reviews Immunology* 2006; 6:836-848.
20. Hagemann T, Balkwill F, Lawrence T. Inflammation and cancer: a double-edged sword. *Cancer Cell*. 2007;12:300-1.
21. Hammerschmidt S, Wirtz H. Lung cancer: current diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int*. 2009;106:809-18.
22. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
23. Harris TJ, Grosso JF, Yen HR, Xin H, Kortylewski M, Albesiano E, Hipkiss EL, Getnet D, Goldberg MV, Maris CH, Housseau F, Yu H, Pardoll DM, Drake CG. Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *J Immunol*. 2007;179:4313-7.
24. Harrison OJ, Foley J, Bolognese BJ, Long E 3rd, Podolin PL, Walsh PT. Airway infiltration of CD4+ CCR6+ Th17 type cells associated with chronic cigarette smoke induced airspace enlargement. *Immunol Lett*. 2008;121:13-21.
25. Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:733-44.

26. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *N Engl J Med*. 2008;359:1367-80.
27. Hinrichs CS, Kaiser A, Paulos CM, Cassard L, Sanchez-Perez L, Heemskerk B, Wrzesinski C, Borman ZA, Muranski P, Restifo NP. Type 17 CD8+ T cells display enhanced antitumor immunity. *Blood*. 2009;114:596-9.
28. Ivanov II, Zhou L, Littman DR. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Semin Immunol*. 2007;19:409-17.
29. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol*. 2002;3:999-1005.
30. Kim CH. Regulation of FoxP3 regulatory T cells and Th17 cells by retinoids. *Clin Dev Immunol*. 2008;2008:416910.
31. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*. 2007;1211-14.
32. Koenders MI, Lubberts E, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Helsen MM, Kolls JK, Joosten LA, van den Berg WB. Induction of cartilage damage by overexpression of T cell interleukin-17A in experimental arthritis in mice deficient in interleukin-1. *Arthritis Rheum*. 2005;52:975-83
33. Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2006;177:566–73.
34. Korn T, Oukka M, Kuchroo V, Bettelli E. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol*. 2007;19:362-71.
35. Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, Vatan L, Szeliga W, Wei S, Huang E, Finlayson E, Simeone D, Welling TH, Chang A, Coukos G, Liu R, Zou W. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood*. 2009;114:1141-9.
36. Kryczek I, Wei S, Szeliga W, Vatan L, Zou W. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood*. 2009;114:357-9.
37. Kryczek I, Wei S, Zou L, Altuwaijri S, Szeliga W, Kolls J, Chang A, Zou W. Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. *J Immunol*. 2007;178:6730-3.

38. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Ex Med* 2005;201:233–40.
39. Lim HW, Lee J, Hillsamer P, Kim CH. Human Th17 cells share major trafficking receptors with both polarized effector T cells and FOXP3+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2008;180:122-9
40. Liu H, Rohowsky-Kochan C. Regulation of IL-17 in human CCR6+ effector memory T cells. *J Immunol*. 2008;180:7948-57.
41. Lu B, Finn OJ. T-cell death and cancer immune tolerance. *Cell Death Differ*. 2008;15:70-9.
42. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat. *Nat Immunol*. 2008;9:641-9.
43. Marks BR, Nowyhed HN, Choi JY, Poholek AC, Odegard JM, Flavell RA, Craft J. Thymic self-reactivity selects natural interleukin 17-producing T cells that can regulate peripheral inflammation. *Nat Immunol*. 2009;10:1125-32.
44. Mathur AN, Chang HC, Zisoulis DG, Kapur R, Belladonna ML, Kansas GS, Kaplan MH. T-bet is a critical determinant in the instability of the IL-17-secreting T-helper phenotype. *Blood*. 2006;108:1595-601.
45. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med*. 2009;361:888-98.
46. Miyahara Y, Odunsi K, Chen W, Peng G, Matsuzaki J, Wang RF. Generation and regulation of human CD4+ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:15505-10.
47. Murugaiyan G, Saha B. Protumor vs antitumor functions of IL-17. *J Immunol*. 2009;183:4169-75.
48. Nistala K, Moncrieffe H, Newton KR, Varsani H, Hunter P, Wedderburn LR. Interleukin-17-producing T cells are enriched in the joints of children with arthritis, but have a reciprocal relationship to regulatory T cell numbers. *Arthritis Rheum*. 2008;58:875-87
49. Nowak EC, Weaver CT, Turner H, Begum-Haque S, Becher B, Schreiner B, Coyle AJ, Kasper LH, Noelle RJ. IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. *J Exp Med*. 2009;206:1653-60.

50. Organización Mundial de la Salud. OMS. Nota No.297. <http://www.who.int>. Consultado en Enero 30 de 2010.
51. Ostrand-Rosenberg S. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Curr Opin Genet Dev.* 2008;18:11-8.
52. Pardoll D. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol.* 2003;21:807-39.
53. Pardoll D. T cells take aim at cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:15840-2.
54. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system, *Immunology.* 2001;357:1777-89
55. Peck A, Mellins ED. Breaking old paradigms: Th17 cells in autoimmune arthritis. *Clin Immunol.* 2009;132:295-304.
56. Prado G. Marcadores de activación y capacidad efectora de linfocitos T citotóxicos provenientes de pacientes con carcinoma pulmonar. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. 2004.
57. Prado-Garcia 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.* 2005;47:361-71.
58. Prado-Garcia H, Aguilar-Cazares D, Meneses-Flores M, Morales-Fuentes J, Lopez-Gonzalez JS. Lung carcinomas do not induce T-cell apoptosis via the Fas/Fas ligand pathway but down-regulate CD3 epsilon expression. *Cancer Immunol Immunother.* 2008;57:325-36.
59. Prado-García H, Avila-Moreno F, López-González JS. Linfocitos T citotoxicos en cancer y auoinmunidad. *Rev Invest Clin.* 2004;56:629-39.
60. Rajput S, Wilber A. Roles of inflammation in cancer initiation, progression, and metastasis. *Front Biosci (Schol Ed).* 2010;2:176-83.
61. Rakoff-Nahoum S. Why cancer and inflammation? *Yale J Biol Med.* 2006;79:123-30.
62. Reiman JM, Kmieciak M, Manjili MH, Knutson KL. Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression. *Semin Cancer Biol.* 2007;17:275-87.
63. Romagnani S. Human Th17 cells. *Arthritis Res Ther.* 2008;10:206.

64. Ruíz-Godoy L, Rizo Rios P, Sánchez Cervantes F, Osornio-Vargas A, García-Cuellar C, Meneses García A. Mortality due to lung cancer in Mexico. *Lung Cancer*. 2007;58:184-90.
65. Sfanos KS, Bruno TC, Maris CH, Xu L, Thoburn CJ, DeMarzo AM, Meeker AK, Isaacs WB, Drake CG. Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing. *Clin Cancer Res*. 2008;14:3254-61.
66. Stämpfli MR, Anderson GP. How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:377-84.
67. Stockinger B, Veldhoen M, Martin B. Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity. *Semin Immunol*. 2007;19:353-61.
68. Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest*. 2007 May;117:1137-46.
69. Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, Crellin NK, Spits H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol*. 2009;10:864-71.
70. Von Euw E, Chodon T, Attar N, Jalil J, Koya RC, Comin-Anduix B, Ribas A. CTLA4 blockade increases Th17 cells in patients with metastatic melanoma. *J Transl Med*. 2009;7:35.
71. Voo KS, Wang YH, Santori FR, Boggiano C, Wang YH, Arima K, Bover L, Hanabuchi S, Khalili J, Marinova E, Zheng B, Littman DR, Liu YJ. Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:4793-8.
72. Wang C, Kang SG, Lee J, Sun Z, Kim CH. The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut. *Mucosal Immunol*. 2009;:173-83.
73. Wang L, Yi T, Kortylewski M, Pardoll DM, Zeng D, Yu H. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *J Exp Med*. 2009;206:1457-64.
74. Yang ZZ, Novak AJ, Ziesmer SC, Witzig TE, Ansell SM. CD70+ non-Hodgkin lymphoma B cells induce Foxp3 expression and regulatory function in intratumoral CD4+CD25 T cells. *Blood*. 2007;110:2537-44.
75. Yang ZZ, Novak AJ, Ziesmer SC, Witzig TE, Ansell SM. Malignant B cells skew the balance of regulatory T cells and TH17 cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res*. 2009;69:5522-30.

76. Zhang B, Rong G, Wei H, Zhang M, Bi J, Ma L, Xue X, Wei G, Liu X, Fang G. The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;374:533-7.
77. Zhang JP, Yan J, Xu J, Pang XH, Chen MS, Li L, Wu C, Li SP, Zheng L. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol.* 2009;50:980-9.
78. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:715-27.
79. Zou W, Restifo NP. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:248-56