



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

Células Treg y Th17 en carcinomas
pulmonares de células no pequeñas

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

LORENZO ISLAS VÁZQUEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOSÉ SULIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ

COMITÉ TUTOR: DR. CONSTANTINO III ROBERTO LÓPEZ MACIAS
DR. RAFAEL S. SAAVEDRA DURAN

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de junio de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **ISLAS VÁZQUEZ LORENZO** con número de cuenta **99146025** con la tesis titulada **"CÉLULAS TREG Y Th17 EN CARCINOMAS PULMONARES DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS"**, realizada bajo la dirección del:
DR. JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ.

Presidente: DRA. YVONNE ROSENSTEIN AZOULAY
Vocal: DR. RAFAEL S. SAAVEDRA DURAN
Secretario: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA
Suplente: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
Suplente: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 12 de octubre de 2011

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

- Al Posgrado de Ciencias Biológicas de la UNAM por la formación académica, así como el apoyo durante la realización de este trabajo.
- Al CONACyT por el apoyo económico otorgado a través de la beca de posgrado con número de registro 233883.
- A los miembros del comité tutorial: Dr. José Sullivan López González permitirme ser parte de su grupo de trabajo y por su apoyo durante la realización de este trabajo. Al Dr. Constantino III Roberto López Macías por sus comentarios y sugerencias hechas para mejorar este trabajo. Al Dr. Rafael S. Saavedra Durán por su tiempo, asesoría y apoyo durante la realización del proyecto, así como las sugerencias y comentarios hechos para mejorar este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres por seguirme apoyando durante este tiempo, por sus palabras de aliento en momentos difíciles, pero sobre todo por el amor y cariño que me han dado. Agradezco a mis hermanos que me han apoyado durante este tiempo.

Agradezco al Dr. Sullivan por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por el apoyo que me ha brindado en mi vida profesional, por los consejos y asesoría brindada durante este tiempo.

Al Dr. Heriberto Prado García, por el apoyo y supervisión técnica durante la realización de este proyecto, por sus consejos, críticas y sugerencias hechas para mejorar este trabajo.

A los miembros del jurado por las sugerencias y comentarios realizados durante la revisión del escrito.

A mis compañeros del laboratorio de cáncer pulmonar del INER. Paty, Ángeles, Dolores, Susana, Fidel, Ere, Servando, Rubén, Manuel. Gracias por hacer tan agradables los momentos en el laboratorio.

A mis compañeros y amigos que he tenido la fortuna de encontrar durante este tiempo. Vero, Mariana, Gustavo, Rosita, Dona, Luzma. Gracias por compartir esos momentos especiales dentro y fuera de las clases.

A mis amigos que me han brindado su amistad sincera. Jonathan, Armando. Gracias por estar en los momentos que los he necesitado sin siquiera pedirlo.

A Edith por ser la personita que me motiva a seguir adelante, que me ha dado su apoyo y cariño incondicional. Gracias por compartir todo este tiempo conmigo, por aguantarme en los momentos de desesperación, por apoyarme en los momentos difíciles, en fin por hacer tan feliz mi vida.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de cáncer pulmonar, departamento de enfermedades crónico-degenerativas, unidad de investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” bajo la asesoría técnica del Dr. Heriberto Prado García.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| ABREVIATURAS | 4 |
| ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS | 6 |
| RESUMEN | 7 |
| ABSTRACT | 9 |
| INTRODUCCIÓN | 11 |
| Cáncer pulmonar | 11 |
| Etiología del cáncer pulmonar | 11 |
| Inflamación crónica y cáncer | 13 |
| <i>Tabaco y cáncer pulmonar</i> | 14 |
| Sistema inmune y cáncer | 15 |
| Inmunoedición | 15 |
| <i>Fase de eliminación</i> | 15 |
| <i>Fase de equilibrio</i> | 16 |
| <i>Fase de escape</i> | 16 |
| Evasión tumoral | 17 |
| Células Treg | 17 |
| <i>Diferenciación de células Treg</i> | 18 |
| <i>Caracterización de células Treg</i> | 19 |
| <i>FOXP3</i> | 19 |
| <i>Marcadores de membrana</i> | 20 |
| <i>Mecanismos de supresión de las células Treg</i> | 20 |
| Células Th17 | 22 |
| <i>Diferenciación de células Th17</i> | 23 |
| <i>IL-17</i> | 24 |
| <i>IL-22</i> | 25 |
| <i>Células Th17 en cáncer</i> | 25 |
| <i>Relación entre células Th17 y Treg</i> | 27 |
| ANTECEDENTES | 29 |
| Células Treg en cáncer | 29 |
| Células Th17 en cáncer | 29 |
| Antecedentes directos | 30 |

| | |
|---|-----------|
| JUSTIFICACIÓN | 31 |
| HIPÓTESIS | 32 |
| OBJETIVO | 33 |
| Objetivos particulares..... | 33 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 34 |
| Material biológico..... | 34 |
| Separación de células mononucleares | 34 |
| Purificación de células CD4⁺ | 35 |
| <i>Determinación de la pureza de la fracción CD4⁺</i> | 35 |
| Fenotipificación de células Treg y Th17 a partir de células CD4⁺ de sangre periférica..... | 35 |
| <i>Tinción de membrana e intracelular</i> | 36 |
| Detección de células Treg IL-10⁺ TGFβ⁺ | 36 |
| <i>Tinción de membrana e intracelular</i> | 36 |
| Detección intracelular de IL-17 e IL-22 en células Th17 a partir de CMN..... | 37 |
| <i>Estimulación de CMN</i> | 37 |
| <i>Tinción de membrana e intracelular</i> | 37 |
| Adquisición de Datos y Análisis Estadístico | 38 |
| RESULTADOS | 39 |
| Purificación de células CD4⁺ | 39 |
| FOXP3..... | 39 |
| Fenotipificación de células Treg en células CD4⁺ de sangre periférica | 40 |
| <i>Porcentaje de células Treg</i> | 40 |
| <i>Porcentaje de células Treg CTLA-4⁺</i> | 43 |
| <i>Expresión de CTLA-4 en células Treg</i> | 45 |
| Detección de IL-10 y TGF-β | 46 |
| <i>Porcentaje de células productoras de IL-10 y porcentaje de células CD4⁺CD127 LAP(TGF-β)⁺</i> | 46 |
| <i>Expresión de IL-10 y LAP(TGF-β)</i> | 48 |
| Fenotipificación de células Th17 en células CD4⁺ de sangre periférica | 49 |
| <i>Porcentaje de células Th17</i> | 49 |
| Detección de IL-17 e IL-22..... | 52 |
| <i>Porcentaje de células productoras de IL-17.....</i> | 52 |
| <i>Expresión de IL-17 en células Th17.....</i> | 54 |

| | |
|--|-----------|
| <i>Porcentaje de células productoras de IL-22</i> | 55 |
| <i>Expresión de IL-22 en células CD4⁺</i> | 55 |
| Correlación entre células Treg y Th17 | 56 |
| DISCUSIÓN | 57 |
| CONCLUSIONES | 61 |
| PERSPECTIVAS | 62 |
| REFERENCIAS | 63 |

ABREVIATURAS.

| | |
|---------------|--|
| EPOC: | Enfermedad pulmonar obstructiva crónica |
| NSCLC: | Carcinoma pulmonar de células no pequeñas |
| AD: | Adenocarcinoma |
| SCC: | Carcinoma de células escamosas |
| DNA: | Ácido desoxirribonucleico |
| CMN: | Células mononucleares |
| TILs: | Linfocitos infiltrantes del tumor |
| DCs: | Células dendríticas |
| TNF: | Factor de necrosis tumoral |
| IL: | Interleucina |
| VEGF: | Factor de crecimiento vascular endotelial |
| NFκB: | Factor nuclear κ B |
| AP: | Proteína activadora |
| STAT: | Transductor de señal y activador de la transcripción |
| MMP: | Metaloproteasas |
| Th17: | T cooperadoras (helper) 17 |
| Treg: | T reguladoras |
| NK: | Asesina natural (natural killer) |
| NKT: | Asesina natural (natural killer) T |
| IFN: | Interferón |
| LN: | Ganglio linfático |
| FasL: | Ligando de Fas |
| TRAIL: | Ligando inductor de muerte asociado a TNF |
| NOS: | Especies reactivas del nitrógeno |
| ROS: | Especies reactivas del oxígeno |
| CTLs: | Linfocitos T citotóxicos |
| TGF: | Factor de crecimiento transformante |
| LAP: | Péptido de latencia asociado |
| IDO: | Indolamina 2,3-dioxigenasa |

| | |
|--------------------|--|
| CD: | “Cluster” de diferenciación |
| TCR: | Receptor de célula T |
| TSLP: | Linfopoyetina estromal tímica |
| NFAT: | Factor nuclear de células T activadas |
| RMFI: | Intensidad media de fluorescencia relativa |
| MFI: | Intensidad media de fluorescencia |
| FOXP3: | Forkhead box P3 |
| ROR: | Receptor huérfano relacionado al ácido retinoico |
| CTLA-4: | Antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico |
| ATP: | Adenosina trifosfato |
| AMP: | Adenosina monofosfato |
| LAG3: | Gen-3 de activación de linfocitos |
| MHC: | Complejo principal de compatibilidad |
| AHR: | Receptor de aril hidrocarburos |
| PE: | Ficoeritrina |
| FITC: | Isotiocianato de fluoresceína |
| PE-Cy5: | Ficoeritrina-cianina 5 |
| PerCp/Cy5.5 | Proteína clorofila peridinina / cianina 5.5 |

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Adquisición de datos..... | 38 |
| Figura 2. Distribución de células CD4 ⁺ | 39 |
| Figura 3. Comparación de los porcentajes de células CD4 ⁺ FOXP3 ⁺ | 40 |
| Figura 4. Identificación de células Treg CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ | 41 |
| Figura 5. Identificación de células Treg CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ CD49 ⁻ | 42 |
| Figura 6. Porcentajes de células Treg..... | 43 |
| Figura 7. Porcentajes de células CTLA-4 ⁺ | 44 |
| Figura 8. Porcentaje de células Treg CTLA-4 ⁺ | 45 |
| Figura 9. Porcentajes de células productoras de IL-10..... | 46 |
| Figura 10. Porcentajes de células CD4 ⁺ CD127 ⁻ productoras de IL-10 y LAP(TGF-β) ⁺ | 47 |
| Figura 11. Porcentaje de células productoras de citocinas supresoras..... | 48 |
| Figura 12. Porcentajes de células Th17..... | 50 |
| Figura 13. Porcentajes de células CD4 ⁺ con marcadores RORγ y CCR6..... | 51 |
| Figura 14. Porcentajes de células productoras de IL-17..... | 52 |
| Figura 15. Porcentajes de células Th17 (IL-17 ⁺)..... | 53 |
| Figura 16. Porcentajes de células productoras de IL-17..... | 54 |
| Figura 17. Correlación empleando la prueba de Spearman..... | 56 |
| Tabla 1. Porcentajes de células Treg..... | 43 |
| Tabla 2. Porcentajes de células Treg CTLA-4..... | 44 |
| Tabla 3. Expresión (RMFI) de CTLA-4..... | 45 |
| Tabla 4. Expresión (RMFI) de IL-10 y LAP(TGF-β)..... | 49 |
| Tabla 5. Porcentajes de células IL-17 ⁺ y células Th17..... | 54 |
| Tabla 6. Expresión (RMFI) de IL-17..... | 55 |
| Tabla 7. Porcentajes de células productoras de IL-22..... | 55 |
| Tabla 8. Expresión (RMFI) de IL-22..... | 56 |

RESUMEN

Introducción. Las células tumorales presentan distintos mecanismos que afectan, directa o indirectamente, a las células del sistema inmune del huésped. Se ha reportado que el tumor libera o induce a las células del estroma a producir principalmente citocinas que inhiben la funcionalidad de diversas células del sistema inmune y además favorecen la inducción de las células T con capacidad reguladora (Treg). Por otro lado, se ha reportado que un estado de inflamación crónica favorece el desarrollo y progresión de algunos tumores; en este sentido, se ha propuesto que las células Th17 tienen un papel crítico en mantener la inflamación.

Objetivo. Evaluar a las células Treg y células Th17 en sangre periférica de pacientes con carcinomas pulmonares de células no pequeñas.

Materiales y métodos. El estudio incluyó 23 pacientes con diagnóstico de carcinoma pulmonar primario (18 adenocarcinomas y 5 carcinomas epidermoides). Como grupos control se incluyeron 11 sujetos fumadores y 10 sujetos no fumadores.

De los pacientes, sujetos fumadores y no fumadores se obtuvieron células mononucleares (CMN). A partir de células CD4⁺ purificadas por selección negativa empleando perlas magnéticas, se identificaron las células Treg empleando la combinación de marcadores CD25, CD127, CD49d y FOXP3. Se determinó el porcentaje de células Treg CTLA-4⁺, LAP(TGF-β)⁺ así como el porcentaje de células productoras de IL-10. Las células Th17 se identificaron por medio del marcador RORγ. Además, se determinó el porcentaje de células productoras de IL-17 para identificar a las células Th17. Análisis estadístico: como medida de resumen se indica la mediana y para la comparación entre los grupos estudiados se empleó la prueba de Kruskal-Wallis. Se considero una p<0.05 como nivel de significancia estadística.

Resultados. Las células Treg se fenotipificaron mediante los marcadores: CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ o CD4⁺CD25⁺CD127⁻CD49d⁻; sin embargo estas poblaciones no mostraron diferencias significativas entre los grupos de pacientes y de sujetos sanos fumadores y no fumadores. En la población CD4⁺CD25⁺CD127⁻ se analizó el porcentaje de células que expresaron: CTLA-4 e IL-10 y/o TGF-β. Los resultados encontrados no mostraron diferencias significativas entre los grupos estudiados.

En relación al porcentaje de células Th17, identificadas como CD4⁺RORγ⁺, se observó un incremento significativo en el grupo de pacientes con carcinoma pulmonar comparado con el porcentaje de células Th17 detectado en los sujetos no fumadores ($p=0.044$), pero no con el grupo de fumadores. Los grupos de sujetos fumadores y no fumadores no mostraron diferencia significativa cuando se compararon. A partir de la población CD4⁺ se determinó el porcentaje de células productoras de IL-17. El grupo de pacientes y sujetos fumadores mostraron un mayor porcentaje de células productoras de IL-17 con respecto al grupo de sujetos no fumadores ($p<0.05$).

Conclusiones. Ya que el porcentaje de células Treg de sangre periférica de los sujetos no fumadores, fumadores y pacientes con carcinoma pulmonar es similar, dichos resultados sugieren que ni el hábito tabáquico ni la patología estudiada afectan la proporción de células Treg. Al parecer, esta población no ejerce su efecto biológico por la liberación de citocinas anti-inflamatorias (IL-10, TGF-β), pero pudiera llevarlo a cabo a través de la interacción membrana-membrana mediada por la molécula co-inhibitoria CTLA-4.

El hábito tabáquico conlleva a un proceso de inflamación crónica de las vías respiratorias; con base a los datos obtenidos, las células Th17 parecen, entre otros factores, estar participando en este fenómeno. La persistencia del proceso inflamatorio, mediado en parte por las células Th17, pudiera favorecer el desarrollo y la progresión del tumor. Por ello, las células Th17 estarían desempeñando una función pro-tumoral.

Estos resultados permiten profundizar en el conocimiento de la biología tumoral y de su estrecha relación con la respuesta inmune. Lo anterior podrá contribuir al desarrollo de nuevos esquemas de tratamiento que impacten sobre el control del crecimiento tumoral a fin de incrementar la sobrevivencia de los pacientes con carcinomas pulmonares de células no pequeñas.

ABSTRACT

Introduction. Tumor cells affect, directly or indirectly, cells of the immune system. Tumor cells release or induced to stromal cells to secrete inhibitory cytokines to down-regulate tumor specific immunity. In addition, this tumor microenvironment induces regulatory T cell (Treg) differentiation. The Treg cells play a critical role in anti-tumor immune response. However, it has been reported that chronic inflammation stimulates tumor development and progression. Th17 cells are playing a critical role in maintaining the chronic inflammation.

Objective. In peripheral blood from non-small cell lung carcinomas patients, the Treg and Th17 cells were studied.

Materials and methods. 23 patients with diagnosis of primary lung carcinoma (18 adenocarcinomas and 5 squamous cell carcinomas), and 21 healthy subjects (11 heavy smoking and 10 non-smoking subjects) were included.

From patients and healthy subjects, PBMC were obtained. After purification of CD4⁺ cells by negative selection, Treg cells were identified by membrane and intracellular markers: CD25, CD127, CD49d, and FOXP3. The percentages of Treg cells expressing CTLA-4⁺, LAP(TGF-β)⁺ or the percentages of IL-10 producing Treg cells were determined. The Th17 cells were identified by expression of RORγ. Also, the percentages of IL-17 producing cells were identified. Statistical analysis: Data are expressed as median of percentages of cells. To assess differences among the groups studied, Kruskal-Wallis test was done. P < 0.05 was considered statistically significant.

Results. Treg cells were identified by the following markers: CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ or CD4⁺CD25⁺CD127⁻CD49d⁻. No significant differences were obtained when the percentages of these cell populations were compared among the groups studied. From the CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg cells, the percentages of cells expressing CTLA-4, IL-10 or TGF-β were analyzed. No significant differences among the groups included were obtained. Similar percentages of CD4⁺RORγ⁺ cells (Th17 cells) were found in patients and smokers subjects groups. In contrast, significant differences were obtained when percentages of Th17 cells from patients group and non-smoker subjects group were compared (p=0.044). From total CD4⁺ cell population, the percentages of IL-17 producing cells were determined for each group studied. Compare to non-smoking

subjects group, higher percentage of IL-17⁺ cells ($p < 0.05$) were detected in the patients and smokers subjects groups.

Conclusions. Due to similar percentages of Treg cells in peripheral blood from the groups studied were obtained, the tobacco smoke and the underlying pathology are not affecting the proportions of Treg cells. The biological effects of Treg cells detected could be mediated by CTLA-4 but not by production of anti-inflammatory cytokines (IL-10, TGF- β). By other side, chronic inflammation caused by tobacco smoke or other stimuli could be associated to the increase of Th17 cells detected in PBMC in lung cancer patients and smoker subjects. The persistence of the inflammatory process, mediated in part by Th17 cells, could support tumor development and progression. In this case, Th17 cells may be playing a pro-tumoral role. These results contribute to a better knowledge of tumor biology and tumor specific immunity. This knowledge might impact in design new schemes of treatment for control of tumor growth, and in the increased of the non-small cell lung carcinomas patients survival.

INTRODUCCIÓN

Cáncer pulmonar

En el año 2008, ocurrieron aproximadamente 57 millones de muertes en el mundo debido a diversas causas, de las cuales, aproximadamente 7 millones fueron asociadas al cáncer, lo que corresponde a la tercera causa de muerte. El cáncer pulmonar es un importante problema de salud pública, ya que es el que presenta el índice de mortalidad más alto. En el género femenino, el cáncer pulmonar representa la cuarta causa de muerte, mientras que en el género masculino es la primera causa de muerte debida al cáncer.

En México, varios autores han reportado un incremento en la incidencia y mortalidad debida al cáncer pulmonar. Lazcano y cols.¹ reportaron que en el período comprendido de 1979 a 1993, se presentaron 73,807 muertes debidas al cáncer pulmonar, con un incremento en la tasa de mortalidad de 5.01 a 7.25 por cada 100,000 habitantes. En hospitales especializados como el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), Medina y cols.² realizaron un estudio con 1019 pacientes atendidos entre los años 1984 a 1992 e indican que en ese período, el número de casos de pacientes con cáncer pulmonar se incrementó aproximadamente 4 veces. Además, reportaron que de los carcinomas pulmonares el mayor porcentaje corresponde a los adenocarcinomas (47.2%), seguido del carcinoma epidermoide (37.3%) y sólo un pequeño porcentaje corresponde a carcinomas de células pequeñas (10%).

Finalmente, Ruiz-Godoy³ documentó que durante el periodo del año 1998 al año 2004, en México se registraron 397,400 muertes debido a neoplasias malignas, de las cuales 45,578 (11.5%) correspondieron a cáncer de pulmón. La distribución con respecto al género fue, en hombres el 68.1% y en mujeres el 31.9%.

Etiología del cáncer pulmonar

La causa exacta y patogénesis del cáncer pulmonar aún es desconocida; sin embargo, hay factores que han sido señalados como posibles agentes causales.

El tabaquismo es el principal factor asociado al cáncer pulmonar, ya que el humo de cigarro es responsable del 85-90% de los casos. Las tres clases principales de

carcinogénicos contenidos en el humo del cigarro son: hidrocarburos policíclicos, nitrosaminas y aminas aromáticas. El asbesto es el factor ocupacional más común relacionado con la incidencia de cáncer pulmonar. Otro factor ocupacional y ambiental incluye la exposición a radón, arsénico, cromo, níquel y radiación ionizante. Por otro lado, enfermedades pulmonares no malignas preexistentes como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis pulmonar idiopática y tuberculosis también se asocian con un incremento en el riesgo de desarrollar cáncer pulmonar⁴⁻⁶.

La mayoría de los agentes genotóxicos son metabolizados por enzimas detoxificadoras (principalmente de la familia del citocromo p450) para evitar que los metabolitos provenientes de estos agentes afecten al material genético. Algunos individuos portan variantes génicas de estas enzimas detoxificadoras, que poseen una menor actividad, lo que incrementa la vida media de los metabolitos altamente reactivos favoreciendo su unión a proteínas y ácidos nucleicos. Lo anterior conlleva a la formación de aductos que inducen mutaciones, especialmente del tipo de transversiones G-T^{5,7}. La permanencia de las mutaciones inducidas por los agentes genotóxicos marca la iniciación del proceso denominado carcinogénesis, el cual involucra tres etapas: iniciación, promoción y progresión.

La iniciación se lleva a cabo cuando la célula es afectada por algún agente genotóxico (químico, físico o biológico), ocasionando una mutación en los protooncogenes o bien en genes supresores de tumor. Los primeros son genes dominantes que codifican proteínas que participan en la proliferación celular; los segundos son genes recesivos que codifican proteínas involucradas en regulación o inhibición de la proliferación celular. Mutaciones en cualquiera de estos genes favorecen la proliferación celular descontrolada, característica del cáncer⁸⁻¹⁰.

Cuando el mismo carcinógeno, u otro, sigue en contacto con la célula iniciada se presenta la promoción, que consiste en la acumulación de mutaciones, generación tras generación, en las células transformadas. Lo anterior explica la heterogeneidad celular observada en los tumores. Como resultado de esta etapa, la célula transformada puede ganar autonomía e independizar su proliferación de las señales reguladoras del microambiente. La acumulación de las células transformadas origina un tumor primario o carcinoma *in situ*⁸⁻¹⁰.

La progresión implica la dispersión de las células del tumor hacia los tejidos adyacentes, fenómeno conocido como invasión. En esta etapa, las células transformadas manifiestan alteraciones en el patrón de expresión de las moléculas del complejo de adhesión celular E-cadherina-cateninas, el cual también es responsable en parte de mantener la arquitectura tisular y el fenotipo celular diferenciado. Las alteraciones en la expresión o función de las proteínas de este complejo, o de sus reguladores, provoca la pérdida de adhesión intercelular, alteraciones morfológicas e incremento en la motilidad celular. Aunado a esto, las células neoplásicas sintetizan enzimas proteolíticas con las que degradan la membrana basal y entran a la circulación sanguínea y/o linfática, para distribuirse a otros órganos del cuerpo. Durante este proceso más del 99% de las células malignas mueren; las que sobreviven pasan a través de la capa de células endoteliales que revisten el interior de la pared capilar y penetran en la matriz extracelular adyacente de algún órgano “blanco”, por distante que esté, y generar en él un tumor secundario. Este proceso se denomina metástasis y es una característica de los tumores malignos⁸⁻¹⁰.

Inflamación crónica y cáncer

Desde el año de 1863, Rudolf Virchow observó leucocitos en el tejido neoplásico y mencionó una probable conexión entre la inflamación y el cáncer. Sugirió que la presencia de patógenos y daño en el tejido promueven un ambiente pro-inflamatorio que incrementa la proliferación celular¹¹. Sin embargo, se ha demostrado que la proliferación celular *per se* no genera cáncer; en cambio la proliferación celular sostenida en un ambiente rico en células con actividad pro-inflamatorias, factores de crecimiento, células estromales “activadas” y agentes promotores de daño al DNA, son un riesgo potencial para el desarrollo de neoplasias¹².

Las causas de la inflamación crónica son varias e incluyen citocinas/quimiocinas pro-inflamatorias, infecciones, enfermedades autoinmunes, obesidad y exposición a toxinas ambientales (tabaco y dieta). El microambiente pro-inflamatorio de los tumores se caracteriza por la presencia de leucocitos en el estroma y áreas tumorales. Los linfocitos infiltrantes del tumor (TILs) pueden contribuir al crecimiento del tumor, así como a la inmunosupresión asociada con esta enfermedad.¹¹

Debido a la naturaleza dinámica de los tumores, que incluye cambios en la interacción entre las células tumorales y varios subtipos de macrófagos, neutrófilos, células B y T, células dendríticas (DCs), células endoteliales y mesenquimales, es difícil definir el papel que juega cada célula en particular, así como definir el origen de las citocinas que promuevan o contengan al cáncer. Sin embargo, hay moléculas como el TNF- α , interleucina 6 (IL-6), IL-1 β , CCL2, IL-8 (CXCL8), VEGF, los factores NF κ B, AP1, STAT3, así como macrófagos, que aparentemente tienen un papel más consistente en la progresión del tumor¹³.

Tabaco y cáncer pulmonar

La exposición al humo del tabaco es la principal causa epidemiológica de cáncer pulmonar. Además de ser un factor de riesgo de cáncer de vejiga, mesotelioma y cáncer cervical; es un probable co-factor en cáncer de estómago, hígado, útero y riñón¹⁴. 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 anatómica¹⁵. El humo del cigarro también tiene efectos sobre los macrófagos alveolares y DCs, alterando su maduración; además, en las células NK disminuye su capacidad citotóxica^{16,17}. Lo anterior da como resultado un incremento en la susceptibilidad para contraer infecciones en las vías aéreas. El humo del cigarro activa a las células epiteliales e incrementa el número de macrófagos alveolares, estas células producen citocinas pro-inflamatorias que favorecen el reclutamiento de otras células, entre ellas los neutrófilos. Las infecciones persistentes generan un estado de inflamación crónica que puede dañar al tejido debido a la producción de metaloproteinasas (MMP), además se presenta un incremento de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺. De estos últimos, la población secretora de IL-17 (Th17) se asocia con el mantenimiento del estado de inflamación crónica¹⁸. En los sujetos fumadores, la inflamación crónica junto con los carcinógenos presentes en el humo del cigarro puede dar como resultado mutaciones en las células epiteliales que conllevan al desarrollo de un carcinoma *in situ*. Sin embargo, solo entre el 1 y 5% de los fumadores desarrollan cáncer pulmonar^{19,20}.

Sistema inmune y cáncer

El sistema inmune puede proteger al huésped de tumores mediante la identificación y eliminación de células que expresen antígenos tumorales o moléculas inducidas por estrés celular, así como por una rápida eliminación de patógenos y una pronta resolución de la inflamación, lo cual previene el establecimiento de un microambiente inflamatorio que favorezca la tumorigénesis²¹.

En el primer proceso interviene la inmunovigilancia, por medio de la cual el sistema inmune identifica a las células tumorales y las elimina antes de que incrementen su masa tumoral y causen algún daño²¹. Sin embargo, se ha observado que a pesar de la inmunovigilancia, los tumores pueden desarrollarse y durante este proceso es importante la participación de la respuesta inmune del huésped, por lo que se consideró que la teoría denominada inmunoedición proporciona una mejor explicación sobre el papel que juega el sistema inmune en el desarrollo tumoral. La teoría de la inmunoedición consta de tres fases denominadas: eliminación, equilibrio y escape²².

Inmunoeedición

Fase de eliminación

En esta etapa participa la respuesta inmune innata y adaptativa. Las células NK, NKT y linfocitos T $\gamma\delta$ son activados por citocinas pro-inflamatorias liberadas por macrófagos, DCs, células estromales que rodean al tumor o por las mismas células tumorales. Cuando el tumor ha crecido de 1-3 mm, requiere irrigación sanguínea y una remodelación del estroma, lo que induce señales de alarma y pro-inflamatorias, las cuales reclutan células del sistema inmune innato (células NK, DCs y macrófagos) en el sitio del tumor. Las células NK y macrófagos reclutados producen IL-12 e IFN- γ ²³. El IFN- γ liberado por estas células presenta efectos antiproliferativos, antiangiogénicos e induce apoptosis, por lo que ejerce una limitada citotoxicidad²⁴. Además, las células NK inducen la muerte de células tumorales mediante la activación de mecanismos citotóxicos como la vía perforina-granzimas y la vía mediada por receptor (Fas/FasL y/o TRAIL/TRAILR); mientras que los macrófagos incrementan la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (NOS)²⁵. La combinación de algunas citocinas derivadas de los tumores y de los tejidos circundantes no tumorales bloquea la

formación de nuevos vasos sanguíneos, lo que contribuye a la muerte de más células tumorales²⁶. Las células tumorales apoptóticas o necróticas son endocitadas por las DCs inmaduras residentes en el tejido, las cuales inician su migración a los ganglios linfáticos (LN), durante este proceso las DCs maduran bajo condiciones pro-inflamatorias; en los LN, las DCs presentan los antígenos tumorales a las células T CD4⁺ naïve que se activan y liberan citocinas tipo Th1 (IL-2, IFN- γ , etc.) que ayudan a la proliferación y maduración de los linfocitos T citotóxicos (CTLs) específicos en contra del tumor²⁷. Los linfocitos T llegan al sitio del tumor, donde los CTLs efectores reconocen y eliminan a las células que expresan antígenos tumorales²⁸.

En esta fase, la eliminación de las células tumorales puede ser completa o incompleta; en el caso de la eliminación incompleta o parcial, la teoría de la inmuoedición considera una siguiente etapa en la cual se mantiene un estado temporal de equilibrio entre la respuesta inmune y el desarrollo del tumor.

Fase de equilibrio

Durante este período de selección natural, muchas variantes de células tumorales son eliminadas pero surgen nuevas variantes portando diferentes mutaciones que dan como resultado tumores con gran inestabilidad genética por lo que se generan, de manera gradual, células tumorales con baja antigenicidad capaces de evadir a las células efectoras del sistema inmune²⁹. Estas células pueden sobrevivir en un ambiente inmunocompetente, el cual favorece el crecimiento de más clones con fenotipo no inmunogénico. En esta etapa de inmunoselección, los linfocitos T y el IFN- γ tienen un papel crítico³⁰. La fase de equilibrio es el proceso más largo de la inmuoedición y puede transcurrir durante varios años.

Fase de escape

Durante la fase de escape, el sistema inmune ya no es capaz de reprimir el crecimiento del tumor, dando como resultado el crecimiento progresivo del mismo hasta su manifestación clínica²².

Evasión tumoral

Las células tumorales presentan diversos mecanismos que les permiten evadir o beneficiarse de la respuesta inmune, los cuales pueden ser parte del proceso de carcinogénesis o bien el resultado de la presión ejercida por la respuesta inmune que favorece la progresión tumoral³¹. En relación a la evasión tumoral, un aspecto importante es la generación de un microambiente inmunosupresivo local que puede extenderse a LN promoviendo la invasión y metástasis del tumor.

La inmunosupresión está mediada por diversos factores solubles derivados del tumor o células estromales, como la IL-10, el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y el factor de crecimiento vascular-endotelial (VEGF)³¹. El VEGF puede actuar como quimioatrayente para células mieloides, DCs y macrófagos. La IL-10 y el TGF- β pueden inhibir en las DCs la presentación de antígeno, la producción de IL-12, además de afectar su diferenciación, maduración y función. Las DCs inmaduras y/o los macrófagos pueden inducir supresión de las células T a través de la producción de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO)³². El TGF- β puede actuar sobre los CTLs reprimiendo la expresión de proteínas citolíticas como la perforina, granzimas, así como FasL³¹. Estos factores solubles pueden ser los responsables de afectar moléculas importantes para el reconocimiento y activación de las células del sistema inmune, como la cadena ζ o ϵ del CD3 en los linfocitos infiltrantes del tumor (TILs). Además pueden favorecer la diferenciación y reclutamiento de células T reguladoras (Treg)³³.

Por otra parte el establecimiento de un microambiente pro-inflamatorio crónico en el sitio del tumor contribuye a la proliferación tumoral, a su invasión, migración y metástasis. En este sentido las células Th17 tienen un papel importante para el mantenimiento de la inflamación³⁴.

Células Treg

Las células Treg tienen la capacidad de suprimir la activación, proliferación y diversas funciones efectoras de las células inmunes *in vivo* e *in vitro*. Esta característica las hace indispensables en la prevención de enfermedades autoinmunes, alérgicas, así como la tolerancia fetal durante el embarazo. Por otra parte, estas células tienen un papel

negativo ya que suprimen la respuesta inmune antitumoral y en consecuencia favorecen la progresión del tumor³⁵.

Basados en estudios realizados en ratón, las células Treg inicialmente fueron caracterizadas como células CD4⁺CD25⁺. Posteriormente se describió al factor de transcripción FOXP3 como marcador específico de esta población. Sin embargo, en humanos, se ha reportado que CD25 y FOXP3 pueden ser expresados en células T CD4⁺ activadas, lo que ha generado discrepancias sobre la adecuada identificación y funcionalidad de esta población de linfocitos T en humanos³⁵⁻³⁷.

Diferenciación de células Treg

A nivel de timo, el desarrollo de las células Treg requiere de una interacción de alta afinidad entre su TCR y el péptido propio presentado por las células estromales del timo. Estas células también proveen las señales de coestimulación necesarias para el desarrollo de las células Treg. La IL-2 e IL-7 en el microambiente del timo son necesarias para el desarrollo de las células Treg en ratón; sin embargo, en el caso de los humanos, los corpúsculos de Hassall, presentes en la médula del timo, secretan linfopoyetina estromal tímica (TSLP) la cual recluta DCs CD11c⁺ e induce la expresión de moléculas coestimuladoras. Las DCs activadas por la TSLP favorece en timocitos inmaduros CD4⁺CD8⁻CD25⁻ la expresión de FOXP3, lo que contribuye a la selección positiva de timocitos con alta afinidad al antígeno propio y favorece su diferenciación hacia células Treg FOXP3⁺^{35,38,39}. Existe evidencia de que las células Treg FOXP3⁺ también pueden ser generadas fuera del timo bajo ciertas condiciones; entre éstas se requiere la estimulación vía TCR y las citocinas IL-2 y TGF-β. El mecanismo por el cual el TGF-β induce la expresión de FOXP3 involucra la cooperación de los factores STAT3 y NFAT. La adquisición de la actividad supresora por parte de las células Treg tratadas con TGF-β *in vitro* requiere de la sobreexpresión de CTLA-4, mientras que para las que se desarrollan en el timo esta molécula no es necesaria⁴⁰.

Caracterización de células Treg

FOXP3

FOXP3 es miembro de la familia de factores de transcripción forkhead box (FOX), caracterizados por poseer un dominio “forkhead” de unión a DNA. FOXP3 fue identificado inicialmente en *Drosophila melanogaster* como un factor requerido para el patrón de formación en las regiones terminales del embrión. Varios miembros de la familia FOX tienen un papel importante en algunos aspectos de la regulación inmune^{41,42}.

El gen *Foxp3*, sumamente conservado en mamíferos, está localizado en el brazo corto del cromosoma X y consiste en 11 exones que codifican una proteína de 431 aminoácidos. En su región amino terminal contiene un dominio represor rico en prolinas, un dedo de zinc y un motivo de cierre de leucinas que permite la homo o heterodimerización; finalmente un dominio forkhead (FKH) de unión a DNA^{41,43}.

FOXP3 puede formar parte de un complejo molecular de aproximadamente 600 kDa junto con histonas deacetilasas, histonas acetiltransferasas y otros factores de transcripción, como por ejemplo Runx1. Este complejo se asocia con varios factores de transcripción, incluido NFAT para inhibir la expresión de IL-2 y otras citocinas pro-inflamatorias y disminuir las funciones efectoras de las células T cooperadoras⁴⁴.

En contraste con las células Treg en ratón, en donde FOXP3 es expresado como una proteína completa, las células Treg humanas expresan dos isoformas en cantidades equivalentes: la isoforma completa (FOXP3FL, con un peso molecular aparente de 58 kDa), homóloga del FOXP3 de ratón y la isoforma producto del splicing alternativo, carente de un exón (exón 2 [FOXP3Δ2] o exón 3 [FOXP3Δ3], dependiendo de los autores^{41,45,46}), con un peso molecular aparente de 54 kDa), dicho exón codifica para un dominio que interacciona e inhibe al factor RORγ^{41,47}.

FOXP3 se une a aproximadamente 700 genes que pueden expresarse o no en las células T FOXP3⁺, lo que sugiere que FOXP3 puede actuar como activador o represor génico. Cuando FOXP3 se une a los promotores y regiones reguladoras 5' de los genes *Ctla4* e *Il2ra* favorece su transcripción, mientras que si FOXP3 se une a los promotores de los genes *Il2* e *Il7ra* favorece la represión de esos genes³⁶. La actividad dual de FOXP3 explica algunas de las características de las células Treg, las cuales tienen una

alta expresión de CTLA-4 y CD25 así como una baja expresión del IL-7R, además de carecer de producción de IL-2. FOXP3 también puede unirse al locus *IFN γ* , suprimiendo la expresión de IFN γ ^{35,41}.

Marcadores de membrana

En el caso del ratón, las células Treg FOXP3⁺ pueden ser identificadas por la expresión de CD25. Sin embargo, la molécula CD25 se expresa tanto en células T activadas como células Treg. En humanos se ha reportado que el CD25 se expresa hasta en un 30% de los linfocitos de sangre periférica y de ellos sólo el 1 o 2% presentan actividad reguladora³⁵.

Debido a lo anterior, recientemente se han estudiado una serie de marcadores de membrana que se asocian con la actividad supresora de las células Treg. Entre estos marcadores se encuentra la molécula CD39, ectonucleasa asociada a la superficie celular, responsable del rompimiento del ATP a AMP⁴⁸. Una alternativa más es la expresión de la molécula CD62L (conocida también como L-selectina) que es empleada para diferenciar entre las células Treg CD62L⁺ de las células T CD4⁺ activadas que son CD62L^{low}^{35,49}.

Recientemente se ha reportado que la ausencia de receptor de IL-7 (IL-7R), conocido como CD127 puede ser utilizado como una alternativa para la identificación de las células Treg con función supresora⁵⁰. Finalmente se ha propuesto otro marcador que puede ayudar a la identificación de células Treg, la molécula CD49d (cadena α de la integrina VLA-4 [$\alpha_4\beta_1$]), presente en la mayoría de las células efectoras pro-inflamatorias pero ausente en las células Treg FOXP3⁺. La depleción de las células CD49d⁺ permite remover las células CD4⁺CD25⁺ con actividad pro-inflamatoria que expresan de manera transitoria el FOXP3⁵¹.

Mecanismos de supresión de las células Treg

Es importante definir cómo las células Treg llevan a cabo su función, no sólo para conocer el proceso de tolerancia periférica sino también como un blanco terapéutico potencial. Desde el punto de vista funcional, los mecanismos de supresión pueden agruparse dependiendo de su modo de acción: i) supresión mediada por citocinas, ii)

supresión mediada por disrupción metabólica o iii) supresión mediada por la modulación en la maduración y función de las DCs^{45,52}.

i) Supresión mediada por citocinas. Las citocinas anti-inflamatorias como la IL-10 y el TGF- β se han considerado mediadores importantes de la supresión inducida por las células Treg, debido a que afectan la maduración y función de DCs y células T efectoras⁴⁵. Además de ser importantes para el mantenimiento de la expresión del factor de transcripción FOXP3 en las células Treg, también favorecen la diferenciación hacia células Treg. Sin embargo aún existen ciertas discrepancias sobre su función^{53,54}.

ii) Supresión por disrupción metabólica. Recientemente se ha debatido sobre la capacidad de las células Treg para ejercer su efecto supresor mediante una disrupción metabólica, dada la alta expresión de CD25 (IL-2R α) en las células Treg estas consumen la IL-2 en el microambiente, la ausencia de esta citocina conduce a la apoptosis de las células efectoras⁵⁵. Estudios en células Treg humanas sugieren que la depleción de IL-2 no es requerida para suprimir a las células T efectoras⁵⁶, por lo que son necesarios más estudios para resolver este debate. Por otra parte, las células Treg expresan las ectoenzimas CD39 y CD73, que generan adenosina pericelular, la cual suprime la función de las células T efectoras a través de la activación del receptor de adenosina 2A (A_{2A}R)⁵⁷. La unión de la adenosina con su receptor A_{2A}R no solo inhibe a las células T efectoras, también favorece la diferenciación a células Treg inducidas mediante la inhibición de la expresión de IL-6 promoviendo la producción de TGF β ⁵⁸. La inhibición de IL-6 es importante en el mantenimiento de las células Treg, las cuales suprimen la función de las células T efectoras mediante la transferencia del segundo mensajero AMP cíclico (cAMP) a las células efectoras a través de las uniones estrechas⁵⁹.

iii) Supresión dirigida a las DCs: Además del efecto directo de las células Treg sobre las células T efectoras, las Treg pueden modular la maduración y función de las DCs, requeridas para la activación de las células efectoras. Se ha propuesto que esta interacción atenúa la activación de las células efectoras por las DCs. Este proceso que involucra la interacción de moléculas co-estimuladoras en las DCs con la molécula CTLA4 expresada en las células Treg. Además, las células Treg pueden promover que las DCs produzcan indolamina 2, 3-dioxigenasa (IDO), potente molécula reguladora que

induce la producción de metabolitos pro-apoptóticos generados del metabolismo del triptófano, que da como resultado la inhibición de las células T efectoras^{52,60,61}.

Finalmente, se ha sugerido que la molécula LAG3 (CD223) puede bloquear la maduración de las DCs. LAG 3, homólogo de CD4, se une con gran afinidad a las moléculas de clase II del MHC de las DCs inmaduras e impide su maduración y su capacidad inmunoestimuladora⁶². Sin embargo, se necesitan más estudios para dilucidar como las células Treg pueden suprimir la función de las células T efectoras a través de las DCs.

Células Th17

Las células Th17 han sido definidas como aquéllas que producen principalmente IL-17A (también conocida como IL17) e IL-17F, pero no IFN γ o IL4. Las células Th17 también producen TNF- α , IL-6, IL-21, IL-26 e IL-22. El patrón de expresión de receptores de quimiocinas y citocinas ha sido investigado ampliamente y se ha aceptado que expresan CCR4, CCR6 y el IL-23R, pero no CXCR3. La IL-17 tiene diversas funciones biológicas, pero la mejor caracterizada está relacionada con efectos pro-inflamatorios ya que recluta neutrófilos, favorece la granulopoesis y la inducción de quimiocinas (CXC). Actúa sobre los macrófagos promoviendo su reclutamiento; además, estimula la producción de citocinas pro-inflamatorias y péptidos antimicrobianos en una variedad de células inmunes y no inmunes⁶³.

La combinación de citocinas que estimula el desarrollo de las células Th17 ha sido blanco de debates, debido a que las diferentes condiciones de activación, tipos de cultivo y condiciones experimentales empleadas hacen difícil la comparación de los resultados de los experimentos *in-vitro*. Inicialmente se reportó que la presencia de IL-1 β , IL-6 y/o IL-23 era suficiente para inducir la diferenciación a células Th17; posteriormente se reportó que el TGF β 1 es importante para el desarrollo de las células Th17 en humanos⁶⁴.

Estudios en ratón han identificado al menos 5 factores de transcripción importantes para el desarrollo y función de las células Th17: ROR γ , ROR α , IRF-4, STAT3 y AHR. De estas proteínas, ROR γ se ha considerado como el factor de transcripción asociado a las células Th17 en ratón y en humano (también conocido como RORC)⁶⁵.

Diferenciación de células Th17

Para cualquier célula T, el primer paso hacia la activación (proliferación y diferenciación) ocurre como consecuencia de la unión del antígeno al TCR. Las señales dependientes del TCR juegan un papel importante en la diferenciación de las células Th17. La producción de IL-17 es mediada principalmente por el factor NFAT, ya que el promotor proximal del gen *Il17a* contiene dos sitios de unión a NFAT los cuales son importantes para la regulación de la IL-17⁶³.

La IL-6, producida por DCs activadas, es un factor clave que promueve la diferenciación de las células Th17 a partir de células T naive. Otra citocina que contribuye a la diferenciación y mantenimiento de las células Th17 es la IL-21, la cual es producida por las propias células Th17^{63,64,66}

Las citocinas de tipo I y tipo II como IL-12, IL-4, IL-6, IL-21 e IL-23 activan la familia de la cinasa Janus (Jak). La familia de proteínas Stat, de unión a DNA son críticas para la transmisión de señales a partir de los receptores de citocinas tipo I/II. Las citocinas IL-6, IL-21 e IL-23 que promueven la diferenciación de las células Th17 activan al factor Stat3, que interviene en la regulación de la expresión de la IL-17, IL-21 e IL-23R y el factor ROR γ ⁶³

TGF- β

Existen 3 isoformas del TGF- β , siendo el TGF- β 1 el más relevante inmunológicamente, el cual a pesar de sus funciones inmunosupresivas, también presenta un rol pro-inflamatorio importante para la diferenciación de las células Th17. El TGF- β en combinación con la IL-6 son factores necesarios para la diferenciación de las células Th17, ya que inducen la expresión del factor ROR γ , así como la expresión del IL-23R^{64,66}.

ROR γ

ROR γ pertenece a la superfamilia de los receptores nucleares a esteroides y está relacionado a la subfamilia del receptor de ácido retinoico. ROR γ es importante en la organogénesis linfocítica y en la timopoiesis y su participación en la regulación de la producción de IL-17 comienza a dilucidarse⁶⁶.

El promotor de *IL17a* contiene múltiples sitios de unión funcionales para ROR γ . El cual se ha encontrado unido al gen *IL17a* empleando inmunoprecipitación de cromatina. La expresión de ROR γ es regulada a través de la estimulación vía TCR en presencia de citocinas que inducen la diferenciación de Th17. Otro miembro relacionado es ROR α , el cual se ha encontrado sobreexpresado en las células Th17. La co-expresión de ambos factores se asocia con el incremento en el número de células productoras de IL-17, lo que sugiere que ROR α sinergiza con ROR γ para promover la diferenciación de las células Th17^{63,66}.

IL-17

La IL-17A (IL-17) pertenece a la familia de la IL-17, la cual también incluye IL-17B, IL-17C, IL17D, IL17E (también llamada IL-25) e IL-17F. La IL-17E no es producida por los linfocitos Th17, pero sí por los Th2. La IL-17E induce la expresión de citocinas y quimiocinas de tipo Th2 como CCL5 (RANTES) y CCL11 (Eotaxina) y está involucrada en la respuesta inmunológica alérgica^{67,68}.

La IL-17A e IL-17F además de ser producidas por las células Th17, también pueden ser producidas por una variedad de tipos celulares, incluidas las células T $\gamma\delta$, células NKT, NK, neutrófilos y eosinófilos⁶⁷. La IL-17A e IL-17F son las citocinas efectoras producidas por células de la respuesta inmune innata y adaptativa. Ambas citocinas tienen propiedades pro-inflamatorias y actúan sobre una gran variedad de células para inducir la expresión de otras citocinas (TNF, IL-1 β , IL-6, GM-CSF, G-CSF); quimiocinas (CXCL1, CXCL8, CXCL10) y metaloproteasas⁶⁹. Las células Th17 humanas producen CCL20, ligando de CCR6, que tiene actividad antimicrobiana y quimioatrayente. La IL-17A e IL-17F también son citocinas importantes para el reclutamiento, activación y migración de neutrófilos^{67,69}.

Los receptores para la IL-17 (IL-17R) se consideran una familia distinta de receptores para citocinas; la familia incluye IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD e IL-17RE. Mientras que IL-17RA e IL-17RC son los receptores para la IL-17A e IL-17F, el IL-17RB es el receptor para la IL-17E, pero también puede unir a la IL-17B con baja afinidad. La señalización del IL-17RB promueve una respuesta de tipo Th2; sin embargo, se ha reportado que la IL-17E (IL-25) puede unirse al IL-17RB e IL-17RA para inducir la

producción de IL-5 e IL-13, lo que sugiere el IL-25R está formado por un heterodímero de IL-17RA e IL-17RB. De esta manera, el IL-17RA no sólo participa en los efectos pro-inflamatorios de la IL-17, también contribuye a la señalización mediada por IL-17E. Los ligandos para el IL-17RD e IL-17RE aún no se han descrito^{66,67,70}.

Los miembros de la familia de IL-17R contienen un dominio transmembranal y un dominio C terminal intracelular largo. Excepto para el IL-17RA, aparentemente existe un splicing alternativo para todos los demás miembros de la familia de IL-17R. Además, los IL-17RB e IL-17RC presentan isoformas solubles con capacidad para reconocer a su ligando⁶⁷.

El IL-17RA es el receptor característico para la IL-17, puede unirse a la IL-17A e IL-17F; está altamente expresado en células hematopoyéticas, en bajos niveles en osteoblastos, fibroblastos, células endoteliales y epiteliales. El IL-17RA puede formar heterodímeros con el IL-17RC, el cual es el receptor afín para la IL-17F que, en contraste con el IL-17RA, es expresado en bajos niveles en células hematopoyéticas pero en altos niveles en células no hematopoyéticas^{66,67}.

IL-22

La IL-22 es una citocina de la familia de la IL-10. Esta familia incluye a la IL-19, IL-20, IL-24, IL-26 IL-28 e IL-29. La IL-22 es producida por células Th17 en respuesta a la IL-23. El receptor para la IL-22 (IL-22R), que también es un heterodímero compuesto por el IL-22R e IL-10R2, se expresa en células epiteliales y endoteliales. Pero en contraste con el IL-17R, el IL-22R no se expresa en células de la respuesta inmune y al parecer la IL-22 es usada por las células Th17 para comunicarse con los tejidos. La IL-22 induce la producción de agentes antimicrobianos en queratinocitos y es esencial en la función de la barrera inmune del epitelio^{66,71}.

Células Th17 en cáncer

La IL-17 puede contribuir a la progresión del tumor debido a su efecto en el microambiente tumoral, más que a un efecto directo en la proliferación y sobrevivencia de las células tumorales⁷². Su principal papel pro-tumoral, en la inflamación relacionada con el cáncer, es su propiedad pro-angiogénica sobre los fibroblastos y células

endoteliales circundantes. La IL-17 puede inducir una variedad de mediadores angiogénicos, entre ellos: el VEGF por parte de los fibroblastos, promoviendo la formación de nuevos vasos sanguíneos; a su vez, el VEGF puede inducir la producción de TGFβ que incrementa la expresión del VEGFR y por lo tanto la captación de VEGF por parte de las células endoteliales. La IL-17 también induce la producción de IL-6, prostaglandina E₂ (PGE₂) e incrementa la expresión de ICAM-1 en los fibroblastos. Todas estas moléculas tienen un rol importante en la angiogénesis y la invasión del tumor⁷³.

La IL-17 también estimula la producción de IL-8, la cual promueve una respuesta angiogénica en las células endoteliales, incrementa la proliferación y supervivencia de las células tumorales, además de favorecer la migración de las células tumorales y la infiltración de neutrófilos al sitio del tumor⁷⁴. Las quimiocinas pueden estimular o inhibir la proliferación y quimiotaxis de las células endoteliales presentes en los vasos sanguíneos que le sirven al tumor. El balance entre las quimiocinas angiogénicas y angiostáticas en el microambiente tumoral puede determinar la supervivencia del tumor. Cuando el tumor o las células infiltrantes del tumor secretan más quimiocinas angiogénicas que angiostáticas, se estimula la formación de nuevos vasos sanguíneos y el crecimiento del tumor. Por otro lado, exceso de factores angiostáticos en el microambiente tumoral puede inhibir la neovascularización y como consecuencia un arresto en el crecimiento tumoral. El IFN-γ es un inductor potente de citocinas angiostáticas (por ejemplo CXCL10) en distintas células, tales como los fibroblastos, células endoteliales e incluso las células tumorales. En cambio, la IL-17 incrementa de manera selectiva la producción de factores angiogénicos como el CXCL1, CXCL5, CXCL6, y CXCL8 por parte de las células tumorales y epiteliales. Adicionalmente, la IL-17 puede inhibir la producción de factores angiostáticos por parte de los fibroblastos. La IL-17 puede cambiar el balance entre los factores angiostáticos y angiogénicos hacia estos últimos, favoreciendo la actividad angiogénica^{72,75,76}.

Por otra parte, se ha propuesto que la IL-17 puede incrementar la actividad de los CTLs. La IL-17 puede inducir la producción de IL-6 por parte de otras células, además de la producción de IL-12 por parte de los macrófagos y DCs. La IL-6 e IL-12 se han asociado con la inducción de CTLs específicos en contra del tumor. La IL-17 promueve la

maduración de progenitores de DCs incrementando la expresión de moléculas coestimuladoras, moléculas del MHC clase II y su capacidad aloestimuladora⁷⁶.

Relación entre células Th17 y Treg

Las células Th17 se caracterizan por la expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-17 e IL-22, se localizan en mucosas como el intestino y tracto respiratorio, donde su función es defender al organismo de patógenos que invaden a través del epitelio⁷⁷⁻⁸⁰. Las células Treg se caracterizan por la expresión del factor de transcripción FOXP3 y se encuentran también en las mucosas para evitar que los patógenos induzcan una respuesta inmune excesiva⁷⁷⁻⁸⁰. El descubrimiento de que la diferenciación de las células Treg y Th17 requiere de TGF β da la primera evidencia de que estas poblaciones pueden estar relacionadas. Durante la homeostasis en las mucosas, el desarrollo de las Treg se ve favorecido por el TGF- β y por el co-factor Ácido Retinoico (AR) que es producido por las DCs residentes en las mucosas. Por otra parte, cuando las DCs reconocen algún patógeno, éstas producen IL-6. Esta citocina pro-inflamatoria y el TGF β inducen la diferenciación a células Th17. De esta manera, el balance entre el AR y la IL-6 determina el linaje pro o anti-inflamatorio de las células T en un microambiente rico en TGF- β , esto provee un mecanismo para que el sistema inmune mantenga o elimine algún microorganismo en las mucosas⁷⁷⁻⁸⁰.

Además del requerimiento del TGF- β para la diferenciación hacia células Th17 o Treg, se ha documentado sobre la interacción de los factores de transcripción de estas poblaciones⁷⁷⁻⁸⁰. El factor de transcripción FOXP3 puede unirse al factor de transcripción ROR γ a través de un motivo codificado en el exón 2, el cual interacciona con el carboxilo terminal del dominio de transactivación del factor ROR γ . La represión del factor ROR γ por FOXP3 depende de la concentración de TGF- β ; en altas concentraciones, la función del ROR γ es reprimida por el incremento en la expresión de FOXP3, pero a bajas concentraciones de TGF- β , la señalización iniciada por IL-6 a través del factor STAT3 evita la represión de ROR γ silenciando ahora al factor FOXP3⁷⁷⁻⁸⁰.

El factor de transcripción ROR γ es de suma importancia para las células Th17, mientras que el factor de transcripción FOXP3 lo es para las células Treg. Sin embargo en etapas tempranas de su diferenciación pueden co-expresar ambos factores⁷⁷⁻⁸⁰.

A pesar de que inicialmente se habían considerado a estas poblaciones como mutuamente excluyentes, la evidencia actual sugiere que la plasticidad de estas células está definida por factores presentes en el microambiente que afectan la diferenciación hacia células Treg o Th17^{81,82}.

ANTECEDENTES

Células Treg en cáncer

En 1971, Gershon y Kondo identificaron a las “células supresoras” cuando transfirieron tolerancia antígeno-específica en animales a través de células T. Debido a que en esta población de células no se identificaron marcadores exclusivos, entre otros factores; el concepto de supresión mediada por células T permaneció en relativa oscuridad durante los años 80⁸³. En los años 90, el grupo de Sakaguchi⁸⁴ identificó una población de células T CD4⁺ que expresaban gran cantidad de moléculas CD25, y tenían la capacidad de prevenir problemas de autoinmunidad en modelos murinos.

En cuanto a las células Treg en cáncer, el grupo de Woo fue el primero en reportar un incremento de las células Treg (CD4⁺CD25⁺) en los TILs de pacientes con NSCLC y pacientes con cáncer de ovario⁸⁵. Estas células producían TGF-β y expresaban la molécula CTLA-4. Mediante ensayos de supresión, esta población inhibía la proliferación de los linfocitos T CD4⁺CD25⁻⁸⁶. Ésta fue la primera evidencia de que las células Treg contribuyen a la progresión del cáncer, ya que inhiben la respuesta inmune antitumoral.

Otros grupos reportaron un incremento de células Treg en sangre periférica y TILs de pacientes con distintos tipos de cáncer⁸⁷⁻⁹³. Al igual que el grupo de Woo, observaron un incremento en el porcentaje de células Treg identificadas como CD4⁺CD25⁺^{87,89,90} o como CD4⁺CD25⁺FOXP3^{88,91-93}. Algunos de estos estudios indican que las células Treg llevan a cabo su función supresora mediante el contacto célula-célula⁹¹, mientras que otros sugieren un efecto mediado por factores solubles^{87,90}. Finalmente concluyen que el incremento de las células Treg se asocia con la progresión del cáncer^{90,92} así como a un mal pronóstico⁸⁸ o recurrencia⁹³.

Células Th17 en cáncer

Recientemente, el papel de la IL-17 y las células Th17 en cáncer se ha vuelto el centro de investigaciones. A pesar de los avances para entender su papel en la inflamación y la autoinmunidad, su actividad en cáncer aun es controversial puesto que en la literatura se implica a esta población en procesos pro y anti-tumorales⁹⁴. Algunos autores han

reportado un incremento de células Th17 (IL-17⁺) en sangre periférica y TILs de pacientes con cáncer gástrico, de ovario, carcinoma hepatocelular y NSCLC⁹⁵⁻⁹⁹. Dicho incremento se asocia con la progresión del tumor. Se ha demostrado que líneas de células tumorales no expresan el receptor para la IL-17¹⁰⁰, por lo que el efecto de la IL-17 en la progresión del tumor se asocia con el incremento en la densidad microvascular.

Antecedentes directos

Nuestro grupo de trabajo ha realizado estudios en líneas celulares de NSCLC, y se encontró que secretan TGF- β ¹⁰¹. Además, las DCs cultivadas en presencia de factores derivados de las líneas celulares de adenocarcinoma (AD) y carcinomas de células escamosas (SCC) incrementan la producción de IL-10¹⁰². La presencia de estas citocinas en el microambiente tumoral podría favorecer la diferenciación de células Treg. Esta población podría ser la responsable de la disminución en la producción de granzimas y perforina observada en los CTLs provenientes de derrame pleural de AD pulmonar¹⁰³.

Por otra parte también se encontró que las líneas celulares de SCC expresan IL-1 β e IL-6¹⁰². Además, las DCs cultivadas en presencia de factores derivados de líneas celulares de SCC también producen IL-6¹⁰². Estas citocinas junto con el TGF- β podría favorecer la diferenciación de células Th17, las cuales al mantener un ambiente pro-inflamatorio crónico afectan a las células T efectoras provocando su sobreactivación y posteriormente su agotamiento. Este fenómeno incrementaría la susceptibilidad de las células T efectoras a una muerte celular inducida por activación (AICD), lo que podría explicar la disminución en el porcentaje de CTLs presentes en el derrame pleural de AD pulmonar¹⁰³.

Por lo anterior, es necesario estudiar a las poblaciones de células Treg y células Th17 en NSCLC para tratar de definir su participación en la progresión del tumor a fin de diseñar estrategias que permitan mejorar la respuesta inmune antitumoral.

JUSTIFICACIÓN

Las células tumorales presentan diversos mecanismos de escape que afectan, directa o indirectamente, a las células del sistema inmune del huésped. En particular, se ha demostrado que el tumor libera o induce en las células del estroma la producción principalmente de IL-4, PGE2, IL-10 y TGF- β . Diversos grupos de investigación, incluido el nuestro, han documentado que el NSCLC mantiene a las DCs en estadio inmaduro e induce en estas células la producción de IL-6, PGE2 e IL-10. En conjunto, estas citocinas disminuyen el número de macrófagos productores de TNF- α , reducen la actividad citolítica de células NK y linfocitos T citotóxicos. Estas citocinas se han asociado a la inducción de las células Treg. La actividad de estas células, aunado a otros mecanismos de escape tumoral, son responsables de disminuir la actividad antitumoral de diversas células del sistema inmune lo que favorece el crecimiento tumoral y su progresión.

Por otro lado, se ha reportado que el desarrollo y la progresión de algunos tipos de tumores se asocian con un estado de inflamación crónica. En este sentido, recientemente se ha propuesto que las células Th17 tienen un papel crítico para mantener la inflamación, mediante la producción de citocinas de la familia de la IL-17 (IL-17A, IL-22). Estas citocinas por tener propiedades pro-inflamatorias inducen, en distintos tipos de células inmunes y no inmunes, la expresión de IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF y otras proteínas de fase aguda. La inflamación crónica puede verse exacerbada por la producción, por parte de algunos tipos de tumores o por las células del estroma tumoral, de citocinas como TNF- α , IL-6, que al reforzar de manera constante la actividad de las células pro-inflamatorias, provoca que queden exhaustas o debilitadas, lo que conlleva a que no se induzca una eficiente respuesta antitumoral.

Por lo anterior, es necesario estudiar si en los pacientes con carcinoma pulmonar, la respuesta inmune se encuentra bloqueada por las células Treg o si la activación constante del sistema inmune por las células Th17 lleva a su agotamiento. Ambos eventos favorecer la proliferación y progresión del tumor. Definir la participación de las células Treg y células Th17 en la respuesta inmune anti-tumoral, permitirá diseñar estrategias para controlar el crecimiento o eliminar de manera eficiente al NSCLC.

HIPÓTESIS

Los carcinomas pulmonares de células no pequeñas favorecen el incremento de los linfocitos Treg o de los linfocitos Th17 como mecanismo de escape del tumor a la respuesta inmune antitumoral.

OBJETIVO

Evaluar las poblaciones de células Treg y Th17 en sangre periférica de pacientes con carcinomas pulmonares de células no pequeñas.

Objetivos particulares

Identificar y cuantificar las poblaciones de células Treg y Th17 en sangre periférica de pacientes con carcinomas pulmonares de células no pequeñas.

Evaluar la expresión de CTLA-4 y LAP(TGF- β), así como el porcentaje de células productoras de IL-10.

Evaluar el porcentaje de células productoras de IL-17 (Th17).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se colectaron muestras sanguíneas de 23 pacientes con carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) primario, 18 con diagnóstico de adenocarcinoma y 5 de carcinoma epidermoide. El diagnóstico fue establecido con base al análisis histológico por parte del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) basados en los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS)¹⁰⁴. Las muestras sanguíneas fueron colectadas antes de que los pacientes recibieran algún tipo de tratamiento. La distribución con respecto al género fue de 13 sujetos masculinos y 10 sujetos femeninos. La edad promedio de este grupo fue de 59 años con rango de 40 a 83 años. Todos los pacientes fueron atendidos en el año 2010 en el servicio clínico 3 del INER.

Como grupo control, se colectaron muestras sanguíneas de 11 sujetos fumadores considerados pesados (consumo de cigarrillos > 15 por día). La distribución con respecto al género fue de 6 sujetos masculinos y 5 sujetos femeninos. La edad promedio de este grupo fue de 52 años con un rango de edad de 45 a 63 años. También, como grupo control, se colectaron muestras sanguíneas de 10 sujetos no fumadores. La distribución con respecto al género fue de 6 sujetos masculinos y 4 sujetos femeninos. La edad promedio de este grupo fue de 56 años con un rango de 43 a 83 años. La función respiratoria de los grupos control se determinó por medio de la prueba de espirometría.

Para este estudio, la obtención de muestras sanguíneas fue aprobada por el Comité de Ciencia y Bioética del INER. Los pacientes, sujetos fumadores y no fumadores que aceptaron participar en el estudio, autorizaron la toma de la muestra sanguínea firmando una carta de consentimiento informado.

Separación de células mononucleares

De la sangre periférica se obtuvieron las células mononucleares (CMN) mediante gradiente de densidad empleando ficoll (Lymphoprep, Axis-Shield), centrifugando a 1500 rpm durante 30 min. La fracción correspondiente a las CMN se colectó y se lavó

con medio RPMI-1640 a 1500 rpm durante 10 min, se retiró el sobrenadante y las CMN se congelaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

Purificación de células CD4⁺

A partir de las CMN, se purificaron por selección negativa las células CD4⁺ empleando el kit CD4+ Tcell Isolation Kit II human (MACS, Miltenyi Biotec) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Para conocer el grado de pureza de la fracción obtenida, se realizó la tinción con anticuerpos α -CD3 FITC (Clona: HIT3a, BioLegend), α -CD4 PE (Clona: RPA-T4, BioLegend), α -CD8 PE-Cy5 (Clona: HIT8a, BioLegend).

Determinación de la pureza de la fracción CD4⁺

La fracción CD4⁺, CD4⁻, así como las CMN se ajustaron a 1×10^5 cel/tubo de tinción, se lavaron con 1mL de solución PBS/BSA al 1% y los tubos se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min. Se retiró el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 100 μ L de PBS/BSA, con los anticuerpos α -CD3, α -CD4 y α -CD8. La mezcla se incubó a temperatura ambiente (TA) durante 30 min con agitación constante. Al término de la incubación, las células se lavaron y el botón celular se resuspendió en 300 μ L de paraformaldehído al 1% en PBS. Finalmente, las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo FACSCalibur (BD).

Fenotipificación de células Treg y Th17 a partir de células CD4⁺ de sangre periférica

La fenotipificación de las células Treg y Th17 se llevó a cabo en la fracción de células CD4⁺. Para la identificación de las células Treg se emplearon mezclas de los siguientes anticuerpos: α -CD4 Alexa Fluor 700 (Clona: RPA-T4, BD Pharmingen), α -FOXP3 Alexa Fluor 488 (Clona: 150D, BioLegend), α -CD25 PE-Cy5 (Clona: M-A251, BD Pharmingen), α -CTLA4 PE (Clona: BNI3, BD Pharmingen), α -CD127 Alexa Fluor 647 (Clona: HCD127, BioLegend) y α -CD49d PE (Clona: 9F10, BioLegend).

Para la fenotipificación de las células Th17 se emplearon los siguientes anticuerpos: α -CD4 Alexa Fluor 700 (Clona: RPA-T4, BD Pharmingen), α -CCR6 Alexa Fluor 488 (Clona: TG7/CCR6, BioLegend) y α -ROR γ PE (Clona: AFKJS9, eBioscience).

Tinción de membrana e intracelular

Las células CD4⁺ se ajustaron a 1X10⁵ cel/tubo de tinción, se realizó un lavado con solución PBS/BSA y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min. El botón celular se resuspendió en 100µL de PBS/BSA y, para identificar a las células Treg por marcadores de membrana se adicionaron los anticuerpos α-CD4, α-CD25, α-CD49, α-CD127. En cambio para identificar a las células Th17 se emplearon los anticuerpos α-CD4 y α-CCR6. Los tubos se incubaron a TA durante 30 min con agitación constante. Las células se lavaron y el botón celular se resuspendió en 200µL de solución Fix/Perm (BioLegend), se incubó a TA durante 20 min con agitación constante. Las células se lavaron nuevamente y el botón celular se resuspendió en 200µL de solución de permeabilización (BioLegend), se incubó a TA durante 15 min con agitación constante. A las células permeabilizadas se agregaron los anticuerpos α-CTLA4 y α-FOXP3 como marcadores intracelulares de las células Treg y el anticuerpo α-RORγ como marcador nuclear de las células Th17. Los tubos se incubaron a TA durante 30 min con agitación constante, las células se lavaron y el botón celular se resuspendió en 300µL de paraformaldehído. Finalmente las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo FACSCanto II (BD).

Detección de células Treg IL-10⁺ TGFβ⁺

Las células CD4⁺ se estimularon con PMA (25ng/mL), ionomicina (1µg/mL) y brefeldina A (10µg/mL) en un volumen de 1mL con medio RPMI-1640 (suplementado con 10% de suero fetal bovino) a 37°C por 5 h. Para corroborar la estimulación de las células se realizó la tinción empleando el anticuerpo α-CD69 FITC (Clona: FN50, Biolegend).

Tinción de membrana e intracelular

Las células CD4⁺ estimuladas se ajustaron a 1X10⁵ cel/tubo de tinción, se realizó un lavado y el botón celular se resuspendió en 100µL de PBS/BSA. Se adicionaron los anticuerpos α-CD4 Alexa Fluor 700 (Clona: RPA-T4, BD Pharmingen) y α-CD127 Alexa Fluor 647 (Clona: HCD127, BioLegend) para identificar a las células Treg por sus marcadores de membrana. El anticuerpo α-LAP(TGFβ1) PerCP/Cy5.5 (Clona: BG/hLAP, BioLegend) se empleó para detectar de manera indirecta el TGF-β en

membrana. Las células se incubaron con agitación constante TA durante 30 min. Se lavó y el botón celular se resuspendió en 200µL de solución de permeabilización (BD), se incubó a TA durante 10 min con agitación constante. Concluida la incubación, las células se lavaron y el botón celular se resuspendió en 100µL de PBS/BSA, posteriormente se adicionó el anticuerpo α-IL-10 PE (Clona: JES3-19F1, BioLegend) para detectar la citocina intracelular. Se incubó nuevamente a TA durante 30 min con agitación constante. Al concluir la incubación, las células se lavaron y se resuspendieron en 300µL de paraformaldehído. Finalmente, las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo FACSCanto II (BD).

Detección intracelular de IL-17 e IL-22 en células Th17 a partir de CMN

Estimulación de CMN

A 1×10^6 CMN en 500µL de medio RPMI-1640 (suplementado con 10% de suero fetal bovino) se adicionaron 5µL de perlas látex con los anticuerpos α-CD2, α-CD3 y α-CD28 (T Cell Activation/Expansion Kit human, MACS Miltenyi Biotec) y se colocaron en placa de 48 pozos. La placa se incubó a 37°C durante 72 h. Después de colectar las células, se lavaron, se ajustaron a 1×10^6 células y se estimularon con PMA, ionomicina y brefeldina como se mencionó anteriormente.

Tinción de membrana e intracelular

Las CMN estimuladas se ajustaron a 1×10^5 cel/tubo de tinción, se realizó un lavado y el botón celular se resuspendió en 100µL de PBS/BSA. Se procedió a identificar la población CD4⁺ empleando el anticuerpo α-CD4 PE-Cy5 (Clona: RPA-T4, BioLegend). Las células se lavaron nuevamente y el botón celular se resuspendió en 200µL de solución de permeabilización (BD), se incubó a TA durante 10 min con agitación constante. Concluida la incubación, las células se lavaron y el botón celular se resuspendió en 100µL de PBS/BSA con el anticuerpo α-IL-17 PE (Clona: BL168, BioLegend) ó α-IL-22 PE (Clona: 22URTI, eBioscience) para identificar a las células Th17. Se empleó el anticuerpo α-IFNγ Alexa Fluor 488 (Clona: 4S.B3, BioLegend) para discriminar a las células Th1, productoras de esta citocina y de IL-17, de las células Th17 productoras sólo de IL-17. Los tubos se incubaron a TA durante 30 min con

agitación constante. Las células se lavaron y se resuspendieron en 300µL de paraformaldehído. Finalmente, las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo FACSCalibur (BD).

Adquisición de Datos y Análisis Estadístico

Las muestras se adquirieron en los citómetros de flujo FACSCalibur o FACSCanto II (BD) empleando los programas CellQuest y FacsDiva, respectivamente. En todas las muestras se realizó la gráfica de tamaño (FSC) vs granularidad (SSC), se delimitó la región correspondiente a los linfocitos y a partir de esa región se realizó la gráfica de CD4 vs granularidad, donde se seleccionaron a los linfocitos CD4⁺. Se adquirieron 20,000 eventos correspondientes a la región de linfocitos CD4⁺ (figura1).

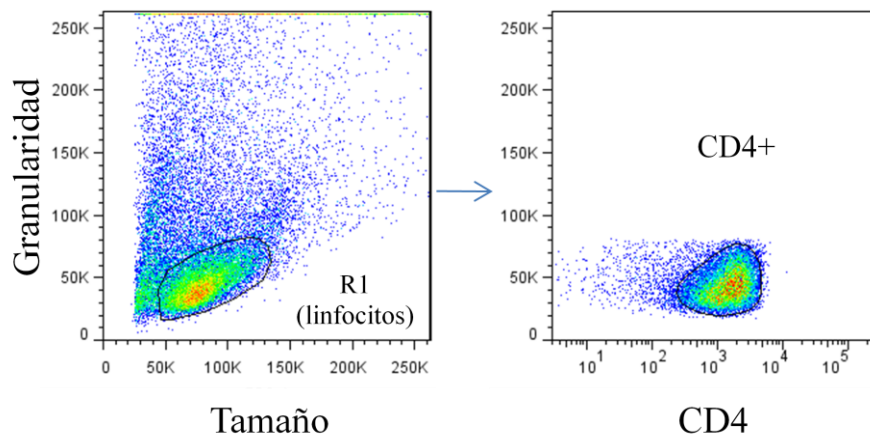


Figura 1: Adquisición de datos. De la gráfica de tamaño vs granularidad se obtiene la región correspondiente a los linfocitos (R1). A partir de R1 se obtiene en la gráfica CD4 vs granularidad, la región correspondiente a los linfocitos CD4⁺.

Para el análisis de los datos obtenidos se empleó el programa FlowJo versión 7.6 (TreeStar). Las gráficas y pruebas estadísticas se realizaron empleando el programa GraphPad Prism 5.

Se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para comparar los resultados obtenidos en nuestros grupos estudiados, se consideró una $p < 0.05$ como nivel de significancia estadística. En las gráficas se indica la mediana como medida de resumen.

RESULTADOS

Purificación de células CD4⁺

Dadas las limitaciones iniciales en relación al equipo para detectar los marcadores empleados para la identificación de las células Treg y Th17, se realizó la purificación por selección negativa de las células CD4⁺ con la finalidad de emplear una mayor cantidad de marcadores y llevar a cabo una identificación más estricta de las poblaciones estudiadas.

Empleando la tinción con los anticuerpos α -CD3, α -CD4 y α -CD8 determinamos la pureza de la población CD4⁺ después de la purificación. Al observar la distribución en las fracciones obtenidas del procedimiento, así como en las CMN totales obtuvimos que el porcentaje de pureza de la fracción correspondiente a las células CD4⁺ fue superior al 95% en todos los casos (figura 2).

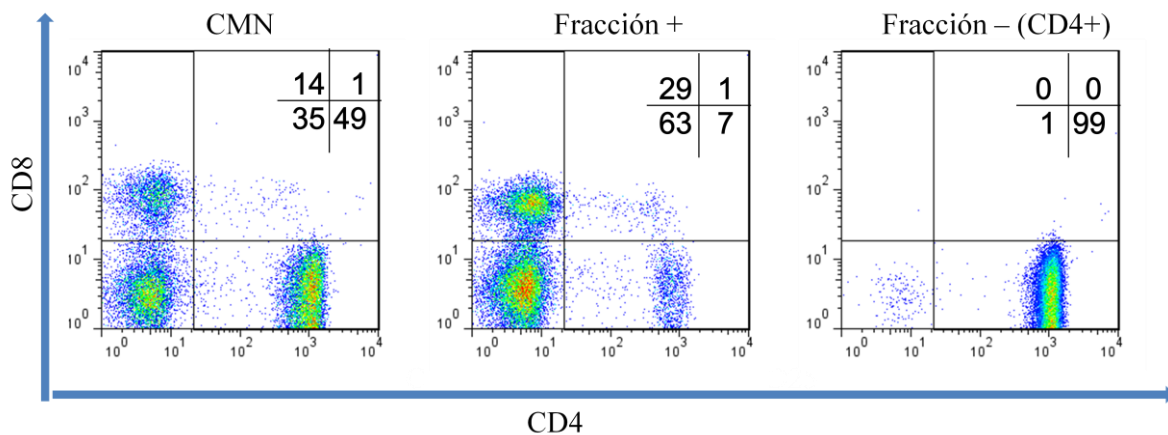


Figura 2: Distribución de células CD4⁺. Porcentajes de las células CD4⁺ y CD8⁺ en las CMN y en las fracciones obtenidas después de la purificación de células CD4⁺ (fracción + y fracción -). Gráficas tipo dot plot. Muestra sanguínea representativa proveniente de un sujeto no fumador.

FOXP3

Debido a que se ha documentado que el factor de transcripción FOXP3 se expresa de manera transitoria en células T activadas carentes de actividad reguladora^{37,105}, decidimos emplear 2 anticuerpos α -FOXP3 (clona 236A/E7 y clona 150D) y realizar la tinción en células estimuladas y no estimuladas. Observamos que los porcentajes de células FOXP3⁺ obtenidos con ambos anticuerpos son similares en las células no

estimuladas, sin embargo, la tinción en las células estimuladas con el anticuerpo 236A/E7, mostró un incremento en el porcentaje de células FOXP3⁺; mientras que el porcentaje de células FOXP3⁺ detectado en la tinción con el anticuerpo clona 150D fue similar al obtenido en las células no estimuladas (figura 3).

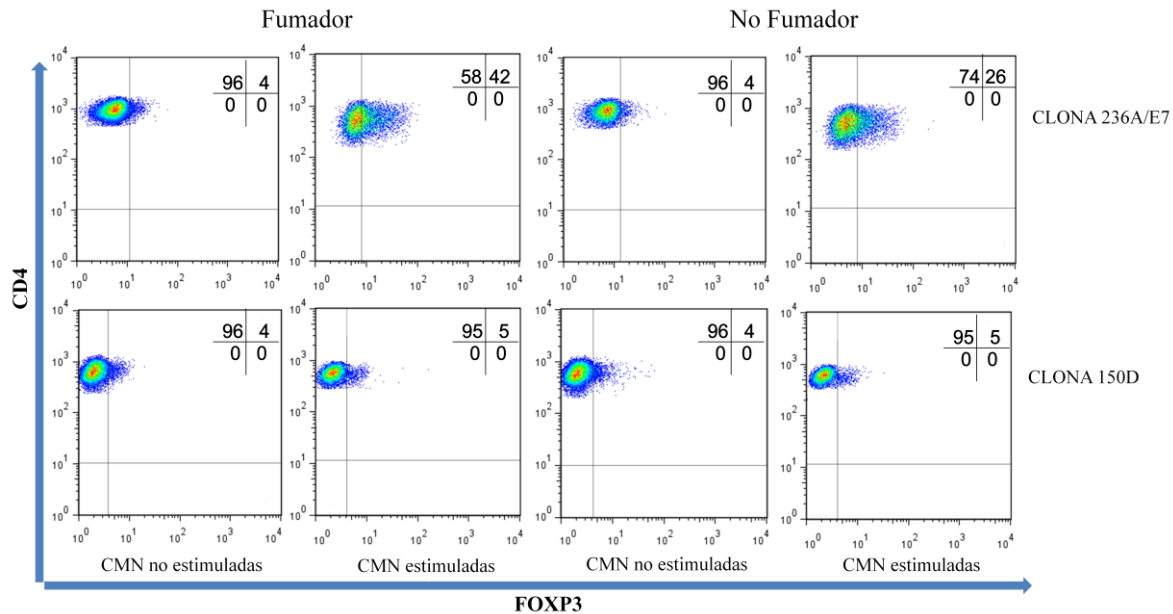


Figura 3: Comparación de los porcentajes de células CD4⁺FOXP3⁺. En la parte superior se muestran los porcentajes obtenidos con el anticuerpo α -FOXP3 clona 236A/E7 y en la parte inferior los obtenidos con el anticuerpo α -FOXP3 clona 150D. CMN sin estimular y estimuladas por 72 h con los anticuerpos α -CD3, α -CD28 y α -CD2 unidos a perlas de látex. Muestras provenientes de un sujeto fumador y un sujeto no fumador. Los ejes se colocaron con respecto al control de isotipo.

Con estos resultados decidimos emplear el anticuerpo α -FOXP3 clona 150D para llevar a cabo la fenotipificación puesto que al emplear este anticuerpo no detectamos un incremento en el porcentaje de células FOXP3⁺ que puede deberse a la expresión transitoria de FOXP3 en células estimuladas. De esta manera podemos identificar de manera más estricta a las células Treg FOXP3⁺.

Fenotipificación de células Treg en células CD4⁺ de sangre periférica

Porcentaje de células Treg

Para llevar a cabo la identificación de las células Treg en los grupos estudiados, seleccionamos aquellas células CD4⁺ que expresaron la molécula CD25. A partir de la población CD4⁺CD25⁺ se determinó el porcentaje de células que expresaban el factor

de transcripción FOXP3. Observamos porcentajes similares entre los grupos de pacientes y sujetos fumadores, mientras que en el grupo de sujetos no fumadores el porcentaje fue menor. El análisis representativo se muestra en la figura 4.

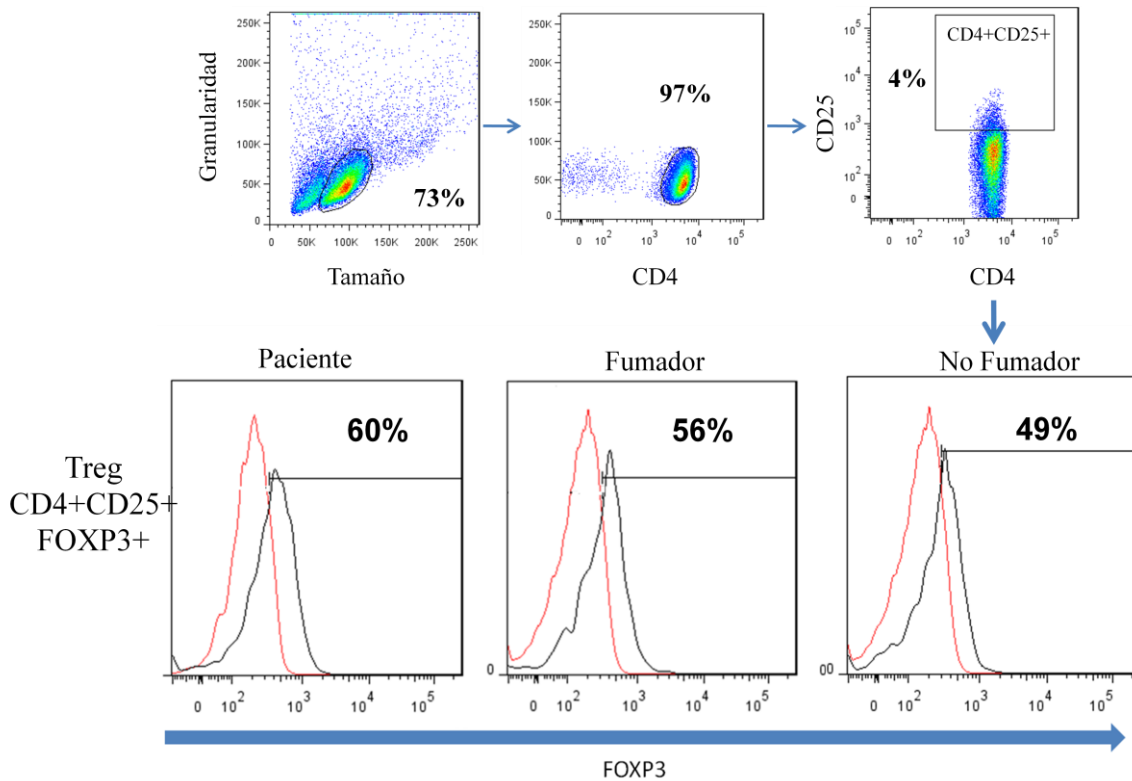


Figura 4: Identificación de células Treg $CD4^+CD25^+FOXP3^+$. De la región de linfocitos se seleccionaron los positivos para la molécula CD4, posteriormente se seleccionaron los linfocitos $CD4^+CD25^+$. A partir de la población $CD4^+CD25^+$ se muestran los histogramas obtenidos para la expresión nuclear de FOXP3 (histograma color negro). El isotipo se representa con el histograma color rojo. Se representan los gráficos obtenidos del análisis de un sujeto de cada grupo estudiado (pacientes, fumadores y no fumadores).

Debido a la controversia actual sobre la expresión de FOXP3 y su asociación con la actividad reguladora de las células Treg^{37,41} y a que recientemente se ha documentado que la ausencia de las moléculas CD127⁵⁰ y CD49d⁵¹ se asocia con la función supresora de las células Treg, empleamos la combinación de las moléculas CD127 y CD49d como otra opción para llevar a cabo una identificación estricta de las células Treg. A partir de la población $CD4^+CD25^+$ determinamos el porcentaje de células negativas para ambas moléculas. Al igual que en el análisis anterior, los porcentajes de células $CD4^+CD25^+CD127^-CD49d^-$ fueron similares entre los pacientes y sujetos

fumadores, mientras que en los sujetos no fumadores fue menor. El análisis se representa en la figura 5.

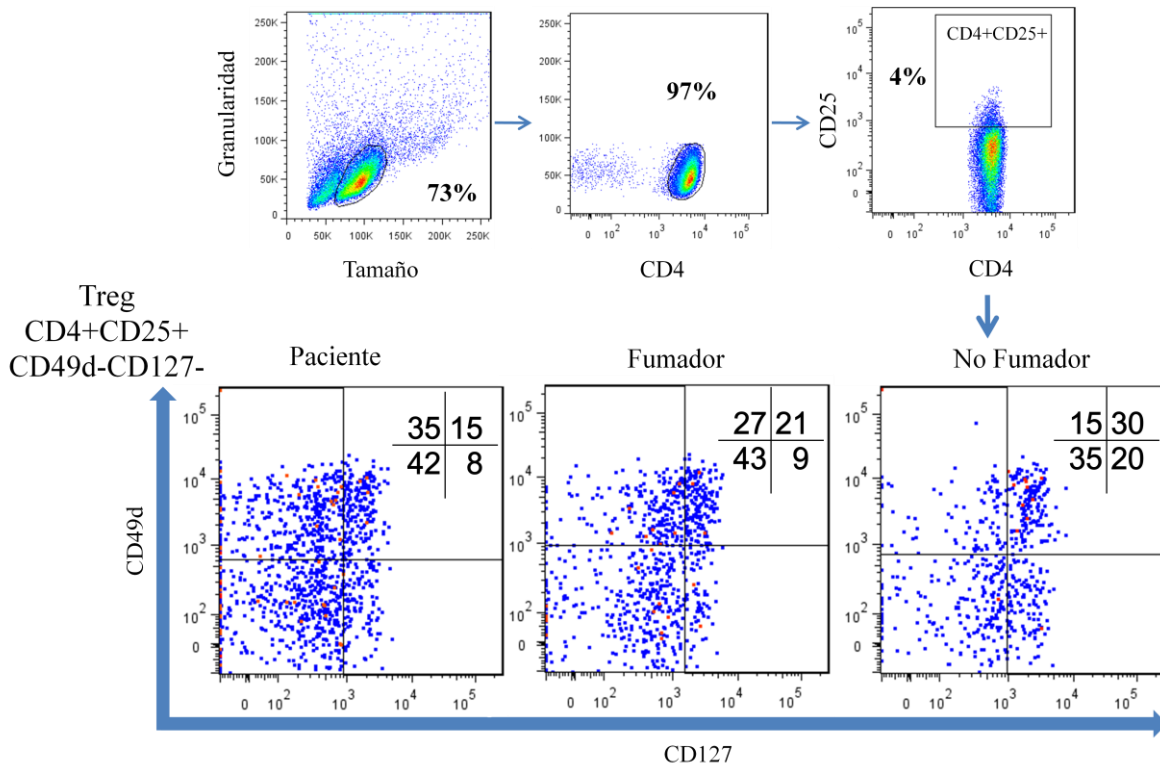


Figura 5: Identificación de células Treg $CD4^+CD25^+CD127^-CD49d^-$. De la región de linfocitos se seleccionaron los positivos para la molécula CD4, posteriormente se seleccionaron los linfocitos $CD4^+CD25^+$. A partir de la población $CD4^+CD25^+$ se muestran las gráficas tipo dot plot obtenidas para determinar el porcentaje de células Treg de acuerdo a la ausencia de las moléculas CD127 y CD49d. Las células Treg se localizan en el cuadrante inferior izquierdo (dobles negativas). Los ejes se colocaron con respecto al control de isotipo. Se representan los gráficos obtenidos del análisis de un sujeto de cada grupo estudiado (pacientes, fumadores y no fumadores).

Los porcentajes de células $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ y células $CD4^+CD25^+CD127^-CD49d^-$ fueron similares en los grupos estudiados (tabla1). Empleando ambos métodos de análisis observamos que el porcentaje de células Treg de los pacientes y sujetos fumadores son similares y se incrementaron de manera no significativa con respecto al porcentaje de células Treg de los sujetos no fumadores (figura 6). Por lo que, aparentemente el hábito tabáquico y la patología estudiada no modifica la proporción de las células Treg en sangre periférica.

| Tabla 1: Porcentajes de células Treg | | | | |
|--|----------------|----------------|------------------|----|
| Población | Pacientes | Fumadores | No fumadores | p |
| CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ | 2.3 (1-3.6) | 2 (1-3.4) | 1.5 (1.1-3.6) | NS |
| CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ CD49d ⁻ | 2.5 (1.1-4) | 2.4 (1-3.4) | 1.5 (0.7-3.8) | NS |

(): Rango. NS: No significativo.

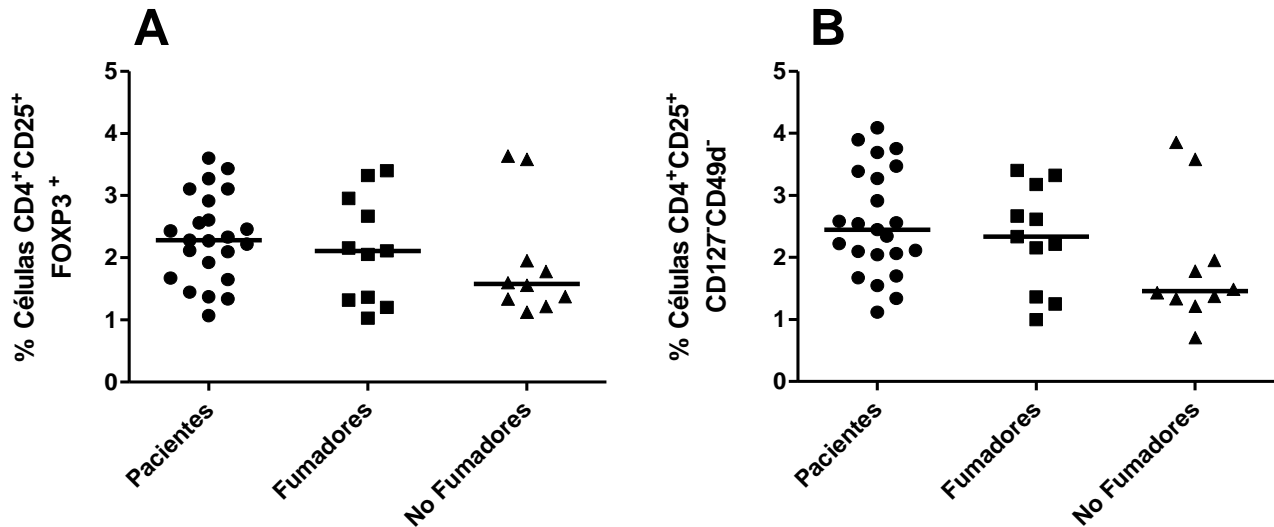


Figura 6: Porcentaje de células Treg. A) Datos obtenidos con el análisis de la población CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺. B) Datos obtenidos con el análisis de la población CD4⁺CD25⁺CD49d⁻CD127⁻. Se indica la mediana como medida de resumen. Pacientes n=23, sujetos fumadores n=11 y sujetos no fumadores n=10.

Porcentaje de células Treg CTLA-4⁺

Se ha documentado que las células Treg expresan la molécula CTLA-4 de manera constitutiva y que dicha molécula es importante para que esta población ejerza su función supresora por contacto célula-célula^{45,86,88,89}. Dichos reportes detectan la molécula CTLA-4 en la población CD4⁺CD25⁺; en nuestro caso analizamos el porcentaje de la población positiva para la molécula CTLA-4 a partir de las poblaciones de células Treg identificadas anteriormente (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ y CD4⁺CD25⁺CD127⁻). El análisis realizado se muestra en la figura 7.

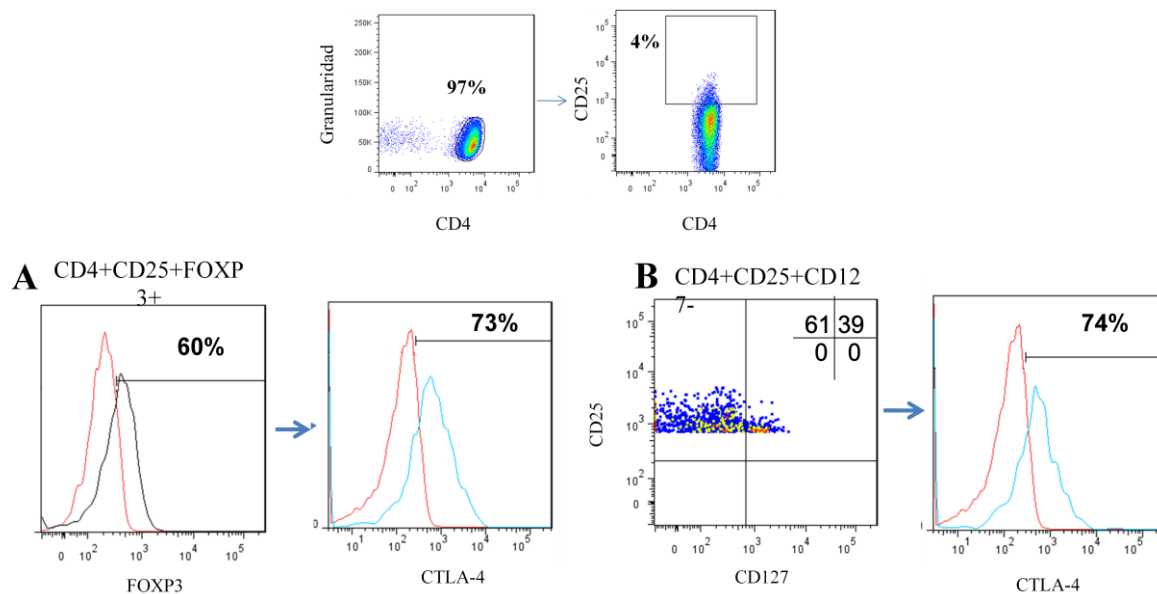


Figura 7: Porcentajes de CTLA-4⁺. A partir de la región de linfocitos se seleccionaron aquellos positivos para la molécula CD4. Se seleccionaron los linfocitos CD4⁺CD25⁺ y a partir de esta población: **A)** Se detectó la expresión nuclear de FOXP3 (histograma color negro). En la población CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ se detectó la expresión de la molécula CTLA-4 (histograma color azul) **B)** Se seleccionaron los linfocitos CD4⁺CD25⁺CD127⁻. En la población CD4⁺CD25⁺CD127⁻ se detectó la expresión de la molécula CTLA-4 (histograma color azul). El isotipo se representa con histograma color rojo.

Los porcentajes de células Treg CTLA-4⁺ obtenidos en la población CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ fueron similares a los obtenidos en la población CD4⁺CD25⁺CD127⁻ (tabla 2).

| Tabla 2: Porcentajes células Treg CTLA-4⁺ | | | | |
|---|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------|
| Población | Pacientes | Fumadores | No fumadores | P |
| CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ | 38.0 (11.7-63.7) | 42.0 (32.5-66.4) | 33.5 (19.7-54.5) | NS |
| CD4⁺CD25⁺CD127⁻ | 41.1 (14.0-62.9) | 43.0 (30.9-57.2) | 36.5 (19.4-60.7) | NS |

(): Rango. NS: No significativo.

En ambos casos, los porcentajes de células Treg CTLA-4⁺ no mostraron diferencias significativas entre pacientes, sujetos fumadores y sujetos no fumadores (figura 8), por lo que, aparentemente el hábito tabáquico y la patología estudiada no modifica el porcentaje de células Treg CTLA-4⁺.

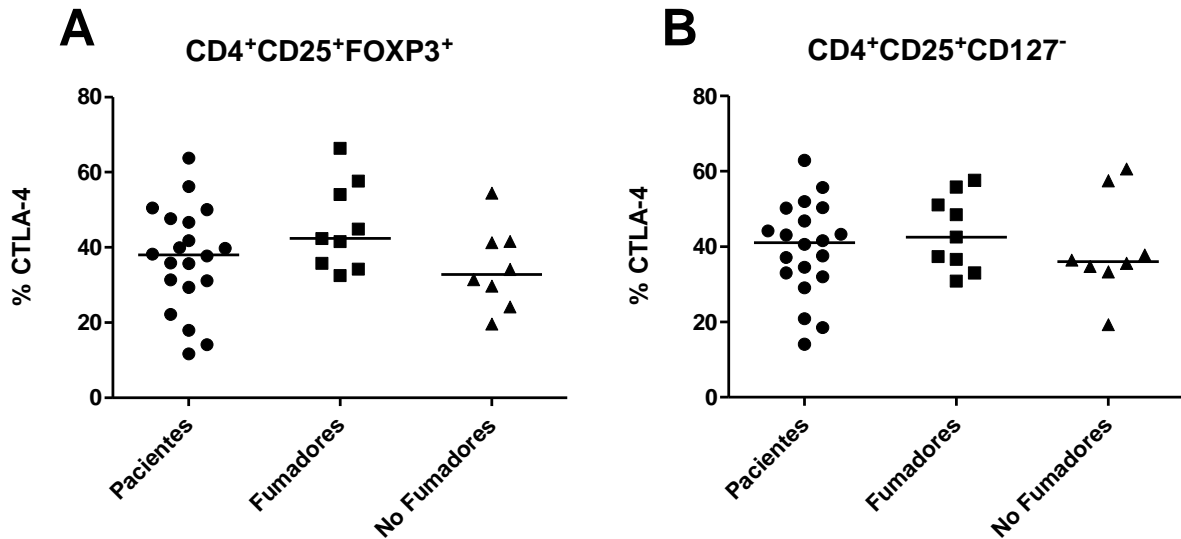


Figura 8: Porcentaje de células Treg CTLA-4⁺. **A)** Datos obtenidos con el análisis de la población $CD4^+CD25^+FOXP3^+$. **B)** Datos obtenidos con el análisis de la población $CD4^+CD25^+CD127^-$. Se gráfica la mediana como medida de resumen. Pacientes n=20, Fumadores n=9 y No Fumadores n=8.

Expresión de CTLA-4 en células Treg

Se analizó la expresión de la molécula CTLA-4 en la población $CD4^+CD25^+CD127^-$, empleando la intensidad media de fluorescencia relativa (RMFI), obtenida de la siguiente manera: $RMFI = \text{intensidad media de fluorescencia (MFI) obtenida de la muestra} / \text{MFI del control de isotipo correspondiente}^{106-108}$. No encontramos diferencias significativas entre los grupos estudiados (tabla 3).

Tabla 3: Expresión (RMFI) de CTLA-4

| Población | Pacientes | Fumadores | No fumadores | p |
|----------------------|------------------|------------------|------------------|----|
| $CD4^+CD25^+CD127^-$ | 2.7 (1.3-5.8) | 2.5 (1.5-4.8) | 2.7 (1.6-5.0) | NS |

(): Rango. NS: No significativo.

Estos resultados sugieren que la expresión de la molécula CTLA-4 no se ve afectada ni por el tabaquismo ni por el cáncer pulmonar.

Detección de IL-10 y TGF- β

Porcentaje de células productoras de IL-10 y porcentaje de células CD4⁺CD127⁻LAP(TGF- β)⁺

Se ha reportado que las células Treg, además de llevar a cabo su función supresora mediante el contacto célula-célula, lo hacen liberando citocinas anti-inflamatorias, principalmente IL-10 y TGF- β ⁴⁵. Distintos grupos han cuantificado estas citocinas en plasma de los pacientes con cáncer o en sobrenadantes de cultivos de células CD4⁺CD25⁺ estimuladas con PMA^{86,88,89}. En nuestro caso decidimos analizar los porcentajes de células productoras de IL-10 a partir de células CD4⁺ estimuladas con PMA. El análisis se ilustra en la figura 9.

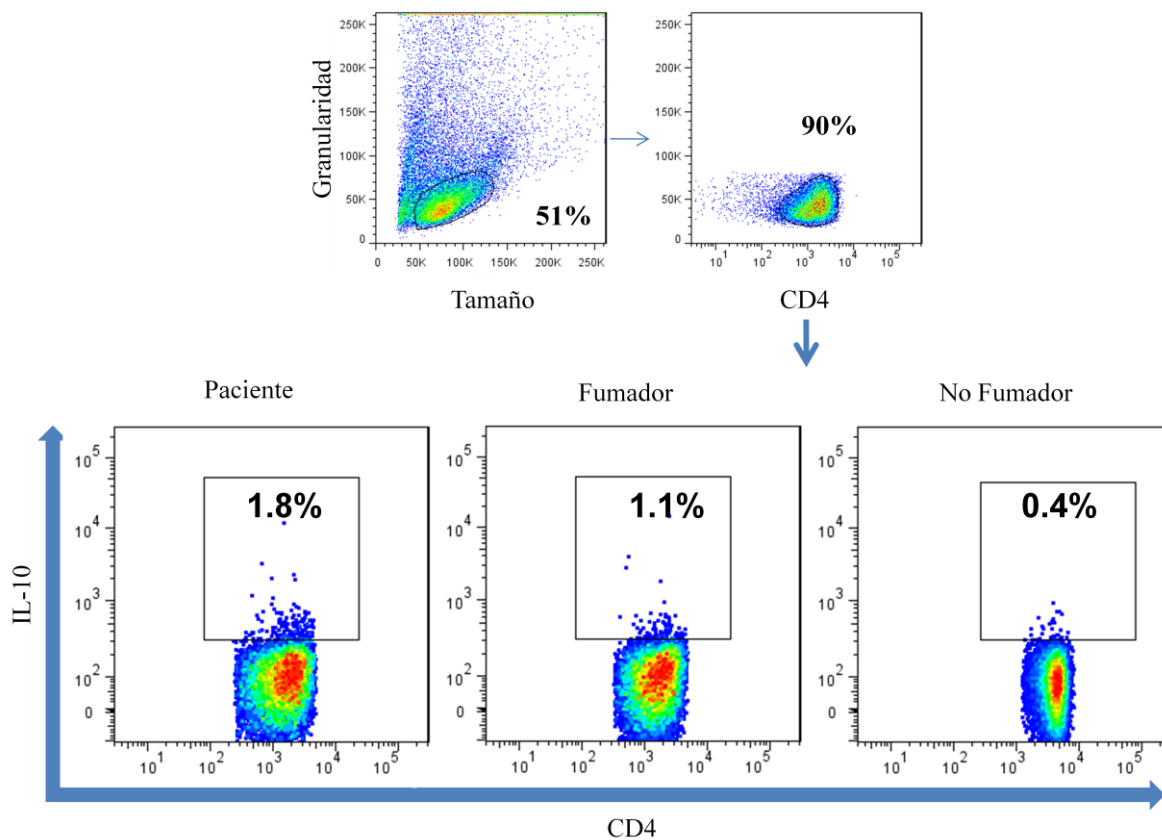


Figura 9: Porcentajes de células productoras de IL-10. A partir de la región de linfocitos se seleccionaron los positivos para la molécula CD4. A partir de la población CD4⁺ se determinó el porcentaje de células CD4⁺IL-10⁺. Gráficos obtenidos del análisis de un sujeto de cada grupo estudiado (pacientes, fumadores y no fumadores). Los ejes se colocaron con respecto al control de isotipo.

Dado las limitaciones iniciales en relación a los diversos fluorocromos conjugados a los anticuerpos empleados para detectar marcadores de células Treg, así como en base a reportes recientes que indican que la ausencia de la molécula CD127 en la población CD4⁺CD25⁺ correlaciona con la expresión de FOXP3 y la actividad supresora de las células Treg⁵⁰, decidimos analizar la co-expresión de IL-10 y TGF-β en la población CD4⁺CD127⁻, como se ilustra en la figura 10.

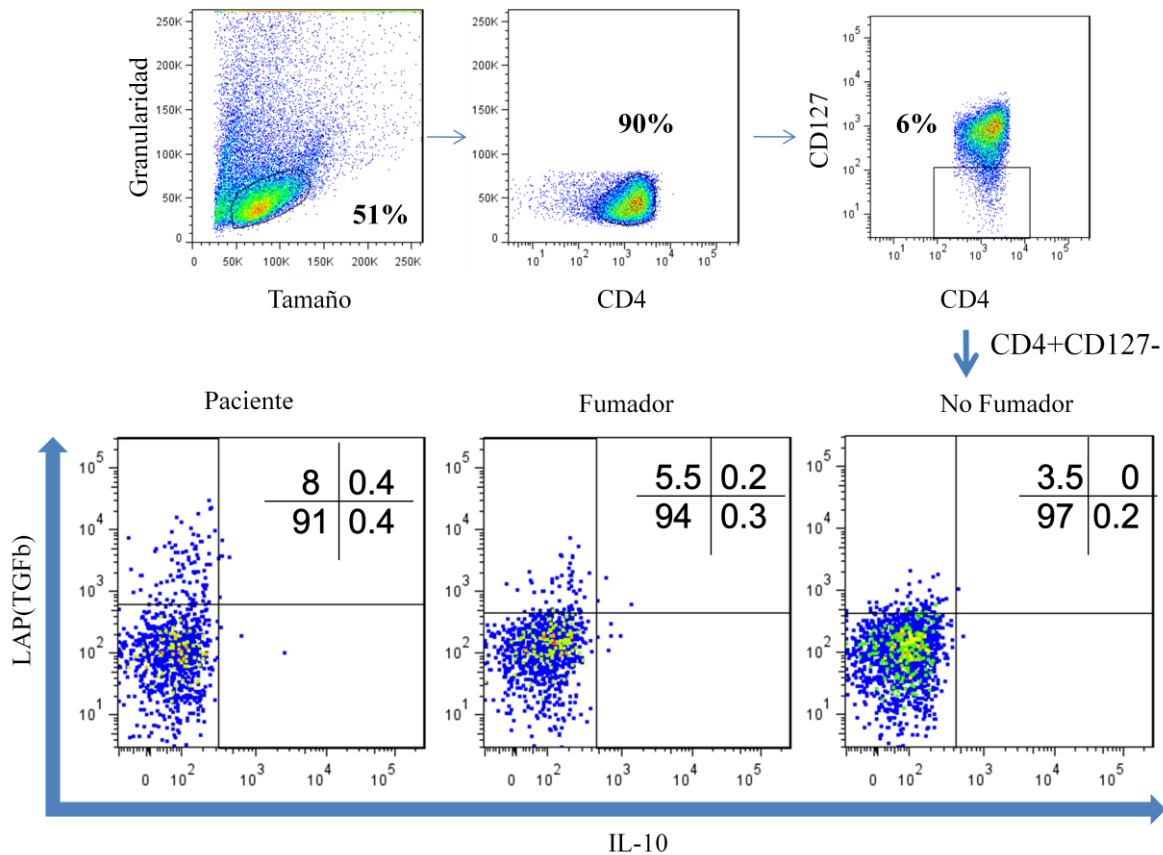


Figura 10: Porcentajes de células CD4⁺CD127⁻ productoras de IL-10 y LAP(TGF-β)⁺. A partir de la región de linfocitos se seleccionaron los positivos para la molécula CD4, posteriormente se seleccionaron los linfocitos CD4⁺CD127⁻. A partir de la población CD4⁺CD127⁻ se determinó el porcentaje de células LAP(TGF-β)⁺, cuadrante superior izquierdo y cuadrante superior derecho. En la población CD4⁺CD127⁻ no se observó producción de IL-10 (cuadrante superior e inferior derecho). Gráficos obtenidos del análisis de un sujeto de cada grupo estudiado (pacientes, fumadores y no fumadores). Los ejes se colocaron con respecto al control de isotipo.

En relación al porcentaje de células CD4⁺ productoras de IL-10, el grupo de pacientes presento el mayor porcentaje (1.4%), seguido del grupo de sujetos fumadores (0.91%), mientras que el grupo de sujetos no fumadores presentó el menor porcentaje (0.79%). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre estos porcentajes (figura

11A). Al analizar la población $CD4^+CD127^-$ detectamos que menos del 0.5% de esta población produce IL-10. La diferencia de los resultados obtenidos en ambas poblaciones puede deberse, en parte, a que en las células $CD4^+$ se incluyen células Th2 productoras de IL-10.

Por otra parte, como se mencionó anteriormente, el TGF- β es otra citocina que es producida por las células Treg, y puede mantenerse en su membrana unido a la molécula LAP¹⁰⁹, por lo que nosotros empleamos la molécula LAP(TGF- β) para detectar indirectamente al TGF- β en la población $CD4^+CD127^-$.

El porcentaje de células LAP(TGF- β)⁺ obtenido en los sujetos fumadores y sujetos no fumadores fue similar (4.4 y 4.2%, respectivamente). En cambio, en el grupo de los pacientes, el porcentaje se incrementó al doble (8.5%). Sin embargo, dicho incremento no mostró diferencia significativa al compararse con los otros grupos (figura 11B).

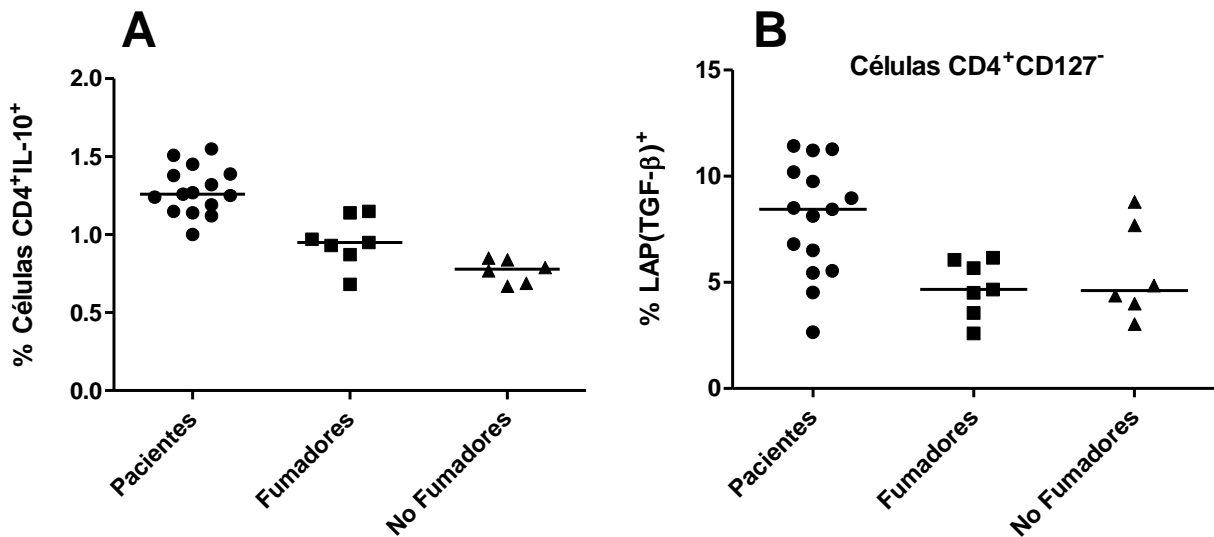


Figura 11: Porcentaje de células productoras de citocinas supresoras. **A)** Porcentaje de células $CD4^+$ productoras de IL-10. **B)** Porcentaje de células LAP(TGF- β)⁺ provenientes de la población $CD4^+CD127^-$. Se gráfica la mediana como medida de resumen. Pacientes n=15, Fumadores n=7 y No Fumadores n=6.

Expresión de IL-10 y LAP(TGF- β)

Para medir la expresión de IL-10 en la población de células $CD4^+$ se empleó la RMFI. No observamos diferencias significativas entre los grupos de estudio. Por otra parte también medimos la expresión de LAP(TGF- β) en la población $CD4^+CD127^-$, y observamos que en el grupo de pacientes, la RMFI se incrementó al doble comparada

con la RMFI de los grupos de sujetos fumadores y sujetos no fumadores (tabla 4), por lo que podemos sugerir que en nuestras condiciones las células Treg de los pacientes no producen IL-10, pero sí incrementan la expresión de LAP(TGF- β).

| Tabla 4: Expresión (RMFI) de IL-10 y LAP(TGF-β) | | | | |
|---|--------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------|
| Población | Pacientes | Fumadores | No fumadores | p |
| CD4+ | 4.9 (4.5-6.0) | 4.7 (4.3-5.1) | 5.1 (4.2-5.5) | NS |
| CD4+CD127- | 9.7 (5.8-20.5) | 5.2 (5.0-5.3) | 5.3 (4.2-5.9) | *0.024 |

*: Diferencia significativa entre pacientes y sujetos fumadores y no fumadores. (): Rango.
NS: No significativo

Fenotipificación de células Th17 en células CD4⁺ de sangre periférica

Porcentaje de células Th17

El factor de transcripción ROR γ se ha considerado marcador exclusivo de las células Th17, ya que participa en la diferenciación de las células T naïve a células Th17⁶³. Con base a este marcador en este estudio identificamos, a partir de la población de linfocitos CD4⁺, el porcentaje de células positivas para este factor de transcripción. El análisis realizado para la identificación de las células CD4⁺ROR γ ⁺ se muestra en la figura 12 A. Además del factor de transcripción ROR γ , se ha propuesto que la población de células Th17, pueden expresar el receptor de quimiocinas CCR6, que les permite migrar a los sitios de inflamación para llevar a cabo su función efectora⁶³. A partir de la población CD4⁺ROR γ ⁺ se determinó el porcentaje de células que expresan al receptor CCR6, como se ilustra en la figura 12B.

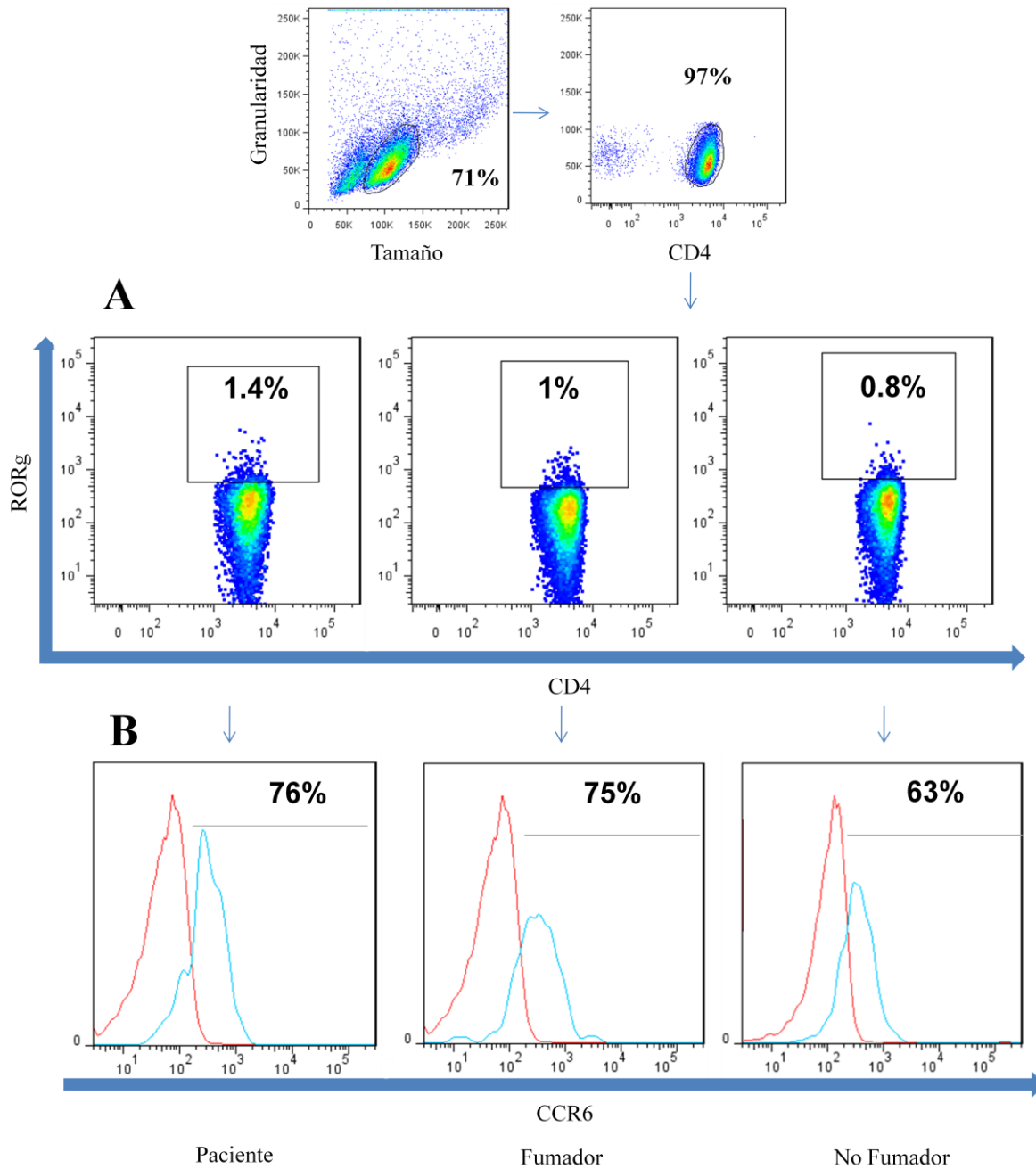


Figura 12: Porcentajes de células Th17. A partir de la región de linfocitos se seleccionaron los positivos para la molécula CD4. **A)** A partir de la población CD4⁺ se muestra la gráfica tipo dot plot donde se determinó el porcentaje de células CD4⁺ROR γ ⁺. **B)** A partir de la población CD4⁺ROR γ ⁺ se determinó la expresión de la molécula CCR6 (histograma color azul). Gráficos obtenidos del análisis de un sujeto de cada grupo estudiado (pacientes, fumadores y no fumadores). El isotipo se representa con el histograma color rojo.

Encontramos que en los pacientes el porcentaje de células $CD4^+ROR\gamma^+$ se incrementó tres veces (1.6%) con respecto a los sujetos no fumadores (0.5%), mientras que en los sujetos fumadores el incremento fue el doble (1.2%) con respecto a los sujetos no fumadores. El porcentaje de células $CD4^+ROR\gamma^+$ de los pacientes con respecto a los sujetos no fumadores mostró diferencias significativas ($p=0.041$) (figura 13A). Estos resultados sugieren que el hábito tabáquico y el cáncer pulmonar, promueven un proceso de inflamación crónica, que incrementa el porcentaje de células Th17 ($CD4^+ROR\gamma^+$).

Aproximadamente el 50% de las células $CD4^+ROR\gamma^+$ expresaron CCR6; el porcentaje encontrado fue ligeramente mayor en el grupo de pacientes (53%) comparado con los sujetos fumadores (43%) y sujetos no fumadores (49%). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos estudiados (figura 13B). Estos resultados sugieren que el porcentaje de células $CD4^+ROR\gamma^+$ que presentan el receptor CCR6 no se ve afectado ni por el hábito tabáquico ni por la patología estudiada.

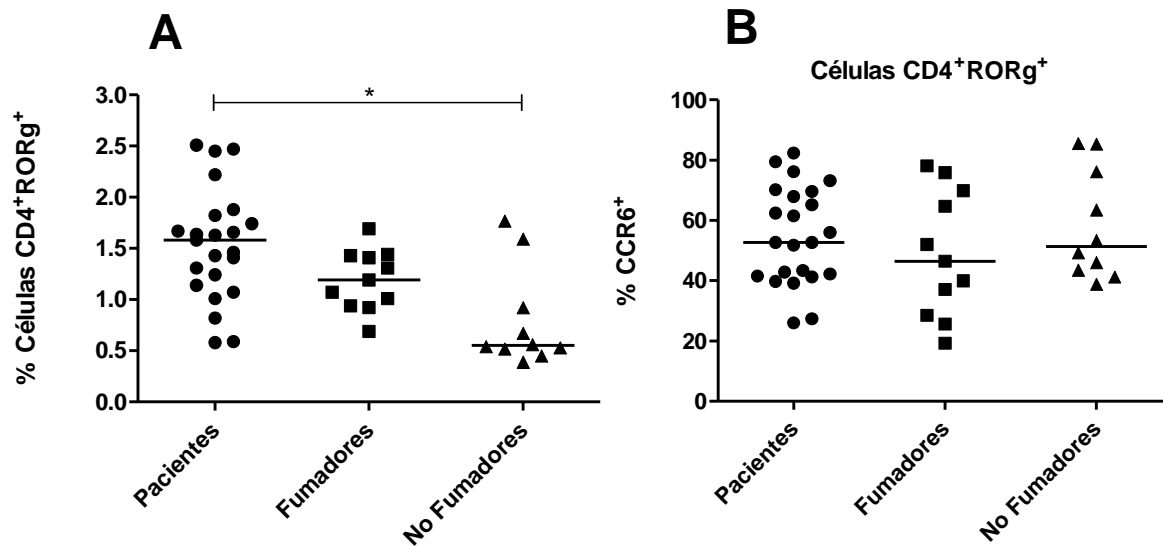


Figura 13: Porcentaje de células $CD4^+$ con marcadores $ROR\gamma$ y CCR6. **A)** Porcentaje de células $CD4^+ROR\gamma^+$. * $p=0.0408$. **B)** Porcentaje de células $CCR6^+$ provenientes de la población $CD4^+ROR\gamma^+$. Se gráfica la mediana como medida de resumen. Pacientes $n=15$, Fumadores $n=7$ y No Fumadores $n=6$.

Detección de IL-17 e IL-22

Porcentaje de células productoras de IL-17

La población Th17 se ha asociado con la secreción de citocinas de la familia de la IL-17, principalmente la IL-17A (IL-17). Esta citocina ha sido detectada empleando diferentes técnicas (ELISA, citometría e inmunohistoquímica^{95,97,99}). En nuestro estudio empleamos la tinción intracelular para detectar la IL-17 en la población CD4⁺. El análisis empleado se indica en la figura 14. Encontramos que el porcentaje de células CD4⁺ productoras de IL-17 se incrementó en el grupo de pacientes y sujetos fumadores con respecto a los sujetos no fumadores.

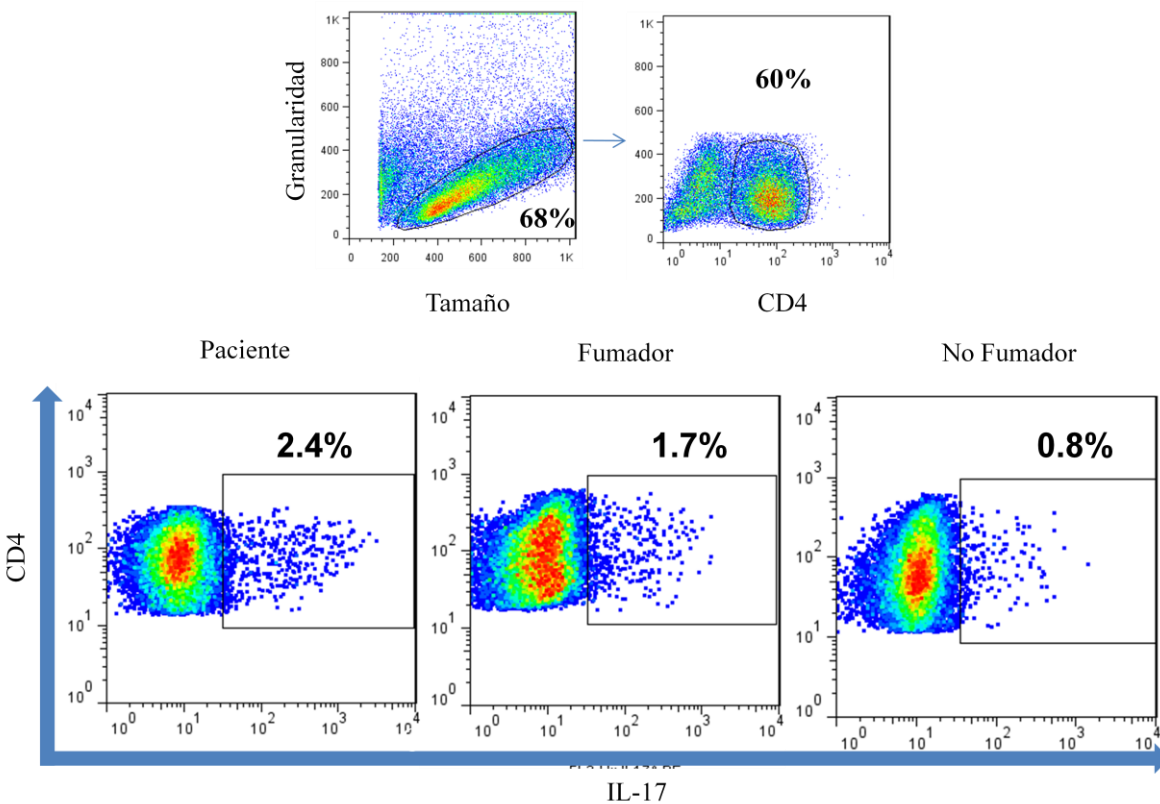


Figura 14: Porcentajes de células productoras de IL-17. A partir de la región de linfocitos se seleccionaron los positivos para la molécula CD4. A partir de la población CD4⁺ se muestra la gráfica tipo dot plot donde se determinó la población de células CD4⁺IL-17⁺. Gráficos obtenidos del análisis de un sujeto de cada grupo estudiado (pacientes, fumadores y no fumadores). Los ejes se colocaron con respecto al control de isotipo.

Se ha documentado que las células Th1 además de secretar IFN- γ también producen IL-17⁶⁷. Para distinguir entre las células CD4⁺ Th1 o Th17, se analizaron las citocinas

intracelulares IFN- γ e IL-17. Se definieron como células Th1 aquellas que producían ambas citocinas; mientras que las células Th17 se identificaron como aquellas que se restringieron a la producción exclusiva de IL-17. El análisis utilizado se muestra en la figura 15. Encontramos que el porcentaje de células Th17 incrementó en el grupo de pacientes y sujetos fumadores con respecto a los sujetos no fumadores.

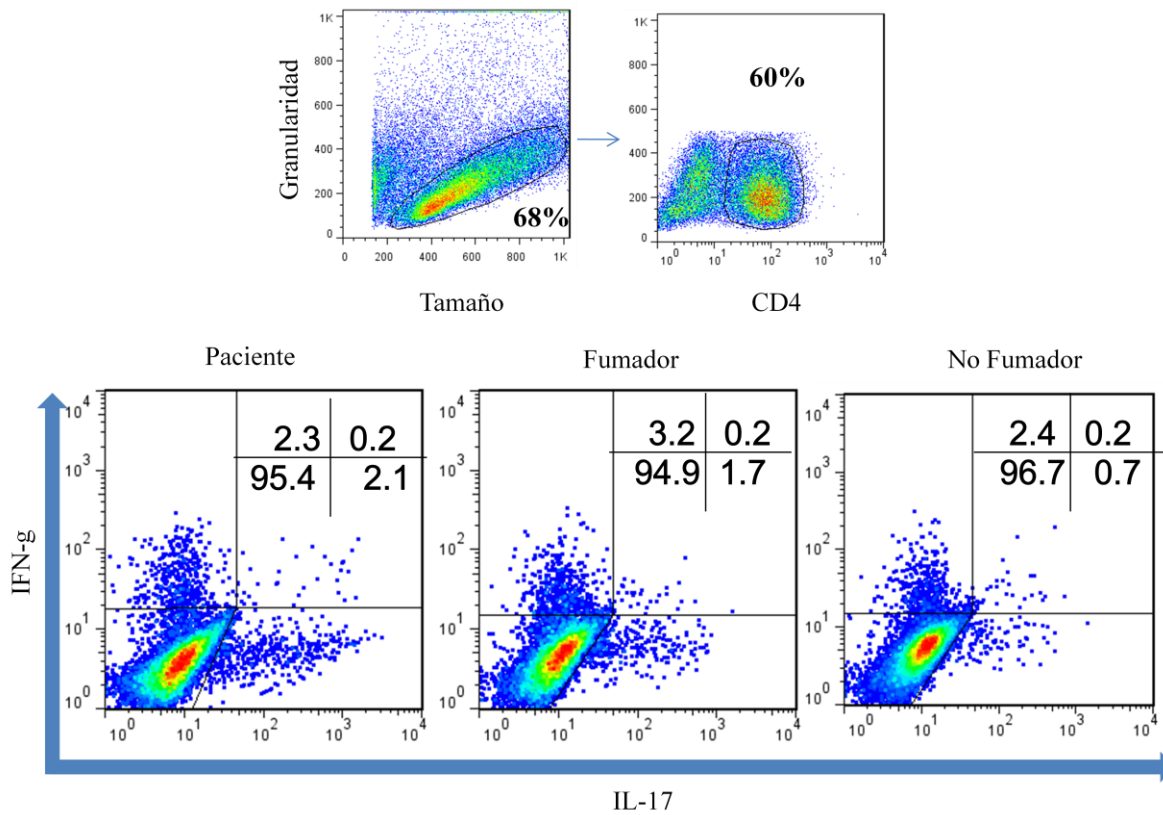


Figura 15: Porcentajes de células Th17 (IL-17⁺). A partir de la región de linfocitos se seleccionaron los positivos para la molécula CD4. A partir de la población CD4⁺ se muestra la gráfica tipo dot plot donde se determinó el porcentaje células Th17 productoras de IL-17. Las células Th17 se identifican como la población de células CD4⁺IL-17⁺IFN- γ ⁻ (cuadrante inferior derecho). Gráficos obtenidos del análisis de un sujeto de cada grupo estudiado (pacientes, fumadores y no fumadores). Los ejes se colocaron con respecto al control de isotipo.

Observamos que los porcentajes de células Th17 fueron ligeramente menores a los porcentajes de células CD4⁺IL-17⁺ (tabla 5). En ambos casos observamos diferencias significativas entre los grupos de pacientes y sujetos no fumadores, así como entre sujetos fumadores y sujetos no fumadores (figura 16).

Tabla 5: Porcentajes de células IL-17⁺ y células Th17

| Población estudiada | Pacientes | Fumadores | No fumadores | p |
|--|------------------|------------------|-------------------|----------|
| CD4 ⁺ IL-17 ⁺ | 1.6 (0.9-4.8) | 1.5 (0.8-2.4) | 0.86 (0.6-1.3) | *0.0004 |
| CD4 ⁺ IL-17 ⁺ IFN- γ ⁻ | 1.3 (0.7-2.8) | 1.1 (0.7-2.1) | 0.66 (0.4-0.8) | *<0.0001 |

*: Diferencia significativa entre el grupo de pacientes y sujetos no fumadores, así como entre el grupo de sujetos fumadores y sujetos no fumadores. (): Rango

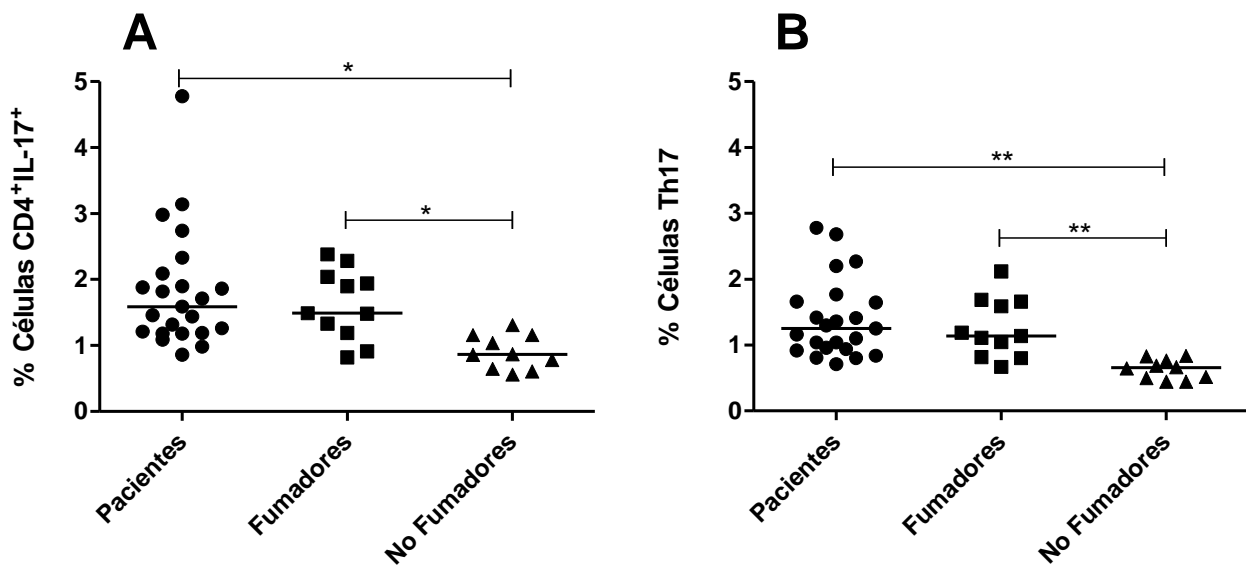


Figura 16: Porcentajes de células productoras de IL-17. **A)** Datos obtenidos a partir de las células CD4⁺ *p=0.0004. **B)** Datos obtenidos a partir de la población CD4⁺IL-17⁺IFN γ ⁻. **p<0.0001. Se gráfica la mediana como medida de resumen. Pacientes n=23, Fumadores n=11 y No Fumadores n=10.

Estos resultados muestran que la principal fuente de IL-17 encontrada en los grupos estudiados es debido a la presencia de células Th17. Esto refuerza la idea de que un proceso inflamatorio promovido por el tabaquismo o por el tumor incrementa el porcentaje de células con fenotipo Th17 (CD4⁺ROR γ ⁺), así como el porcentaje de células productoras de IL-17 exclusivamente.

Expresión de IL-17 en células Th17

Empleamos la RMFI para determinar la expresión de la IL-17 detectada en los grupos estudiados y observamos un incremento significativo en la RMFI del grupo de pacientes

cuando se comparó con el grupo de sujetos no fumadores (tabla 6). Esto sugiere que el cáncer pulmonar además de promover un incremento en el porcentaje de células Th17 (IL-17⁺) también incrementa la expresión de la IL-17.

| Tabla 6: Expresión (RMFI) de IL-17 | | | | |
|---|--------------------------|---------------------------|--------------------------|----------|
| Citocina estudiada | Pacientes | Fumadores | No fumadores | p |
| IL-17 | 9.0 (3.2-48.8) | 6.7 (3.6-20.19) | 4.3 (2.7-10.0) | * 0.001 |

*: Diferencia significativa entre pacientes y sujetos no fumadores. () Rango

Finalmente, los porcentajes obtenidos de la fenotipificación de células Th17, fueron similares a los porcentajes obtenidos para la detección de IL-17. Lo que sugiere que la producción de IL-17 se asocia con la proporción de células con fenotipo CD4⁺RORγ⁺.

Porcentaje de células productoras de IL-22

Se ha documentado que las células Th17 además de la IL-17, producen la IL-22⁶⁴. Nosotros determinamos los porcentajes de células CD4⁺ productoras de IL-22. En nuestras condiciones experimentales, el porcentaje de células CD4⁺IL-22⁺ en los grupos estudiados fue menor al 0.6% (tabla 7), no se observó diferencia significativa, tampoco se encontró una relación con la producción de IL-17.

| Tabla 7: Porcentajes células productoras de IL-22 | | | | |
|--|-------------------|------------------|---------------------|----------|
| Población estudiada | Pacientes | Fumadores | No fumadores | P |
| CD4⁺IL-22⁺ | 0.44 (0.3-1.3) | 0.6 (0.4-0.9) | 0.5 (0.4-1.1) | NS |

() Rango. NS: No significativo.

Expresión de IL-22 en células CD4⁺

Al analizar la expresión de la IL-22 observamos que la RMFI mostró diferencia significativa entre los pacientes y los sujetos fumadores y no fumadores (tabla 8). Aparentemente el cáncer pulmonar incrementa la expresión de la IL-22, pero hacen falta estudios para dilucidar la participación de esta citocina en dicha patología.

| Tabla 8: Expresión (RMFI) de IL-22 | | | | |
|------------------------------------|------------------|------------------|------------------|--------|
| Citocina | Pacientes | Fumadores | No fumadores | p |
| IL-22 | 4.8 (2.7-8.8) | 4.1 (2.9-4.4) | 3.7 (3.3-5.0) | *0.001 |

*: Diferencia significativa entre pacientes y sujetos fumadores y no fumadores. () Rango

Correlación entre células Treg y Th17

Se ha documentado que las poblaciones de células Treg y Th17 tienen funciones antagónicas y se diferencian de manera excluyente^{77,78}. Para conocer si en los grupos analizados existe alguna asociación entre las células Treg y Th17, se realizó el análisis de correlación. Los resultados obtenidos no mostraron una tendencia positiva en el grupo de pacientes y sujetos no fumadores, mientras que en los sujetos fumadores no se observó tendencia alguna (figura 17). Estos resultados sugieren que ambas poblaciones se comportan de manera independiente y la presencia de alguna no afecta la proporción de la otra. Consideramos necesario incrementar el número de muestras para determinar si existe o no una correlación.

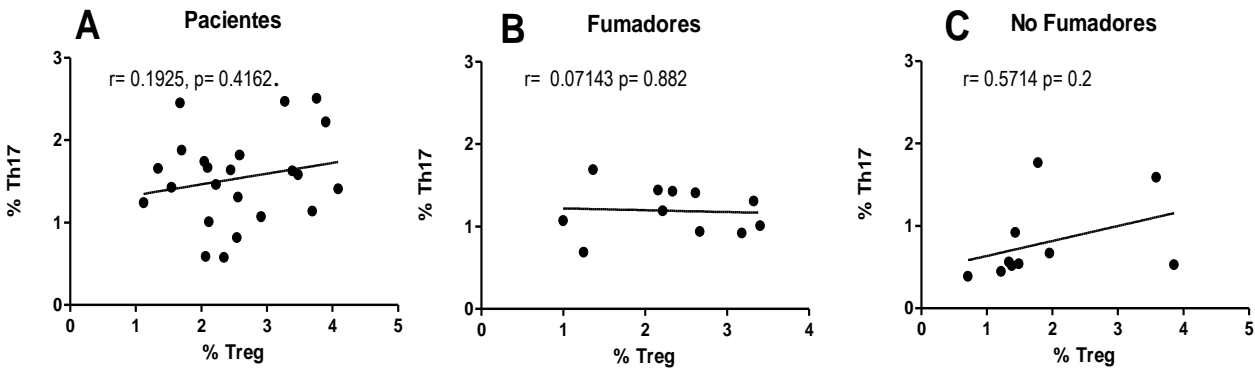


Figura 17: Correlación empleando la prueba de Spearman. Porcentaje de células Treg (X) vs porcentaje de células Th17 (Y) **A)** Pacientes n=23. **B)** Sujetos fumadores n=11. **C)** Sujetos no fumadores n=10. Línea = tendencia.

DISCUSIÓN

Las células tumorales emplean distintos mecanismos que afectan la respuesta inmunológica³³. Por un lado, producen factores solubles que al actuar sobre la célula blanco inhiben su participación o bien inducen poblaciones celulares con capacidad reguladora³². Por otra parte, se ha reportado que el tumor induce la activación crónica de la respuesta inmunológica y que los mediadores de la inflamación estimulan la proliferación y/o progresión del tumor³¹.

En este estudio se identificaron a las células Treg y células Th17 para definir el papel de éstas en pacientes con NSCLC. Las células Treg se identificaron como células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺, empleando el anticuerpo α -FOXP3 clona 150D que no reconoce la expresión transitoria de FOXP3 en las células activadas³⁷. Ya que recientemente se ha reportado que las células Treg pueden identificarse empleando una serie de moléculas de membrana^{50,51,110}, se definió a la población CD4⁺CD25⁺CD127⁻CD49d⁻ como células Treg. Los porcentajes de células Treg identificadas por ambos procedimientos son similares en los grupos estudiados.

La población CD4⁺CD25⁺CD127⁻CD49d⁻ no expresó IL-10 pero sí las moléculas CTLA-4 y TGF- β , lo que sugiere que esta población puede presentar actividad reguladora por medio de estas moléculas. En relación a la IL-10, la mayoría de los reportes indican que ésta se encuentra elevada en los pacientes con cáncer^{87,90}, incluyendo cáncer pulmonar^{85,86}. Esta citocina se ha cuantificado inmunoenzimáticamente en plasma o sobrenadante de cultivos de células CD4⁺CD25⁺^{52,55,50,51}. La determinación sérica no permite conocer la fuente real de la IL-10 y en los cultivos de células CD4⁺CD25⁺, la presencia de IL-10 puede deberse a células Th2 o Tr1. El grupo de Wolf⁸⁹ analizó la expresión intracelular de IL-10 en células CD4⁺CD25⁺ y CD4⁺CD25⁻ y encontró bajos porcentajes de células productoras de esta citocina en ambas poblaciones. Nosotros empleamos un procedimiento similar, y nuestros resultados mostraron que alrededor del 1% de la población CD4⁺ produce IL-10; sin embargo, esta citocina no fue producida por la población CD4⁺CD127⁻.

En relación a la molécula CTLA-4, la población CD4⁺CD25⁺CD127⁻ fue positiva en porcentajes similares a la población CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ detectada en nuestro estudio

así como lo reportado por otros autores^{86,91}. Por otra parte, la población CD4⁺CD127⁻ mostró un incremento tanto en el porcentaje de células TGF-β⁺, como en la expresión de TGF-β. Los resultados anteriores sugieren que esta población puede llevar a cabo su función supresora a través del contacto célula-célula. A pesar de que se ha reportado que la población CD4⁺CD25⁺CD127⁻CD49⁻ tiene actividad supresora⁵¹, es necesario realizar ensayos que permitan conocer si, en nuestras condiciones experimentales, esta población tiene actividad reguladora.

Por otra parte, el grupo de Woo^{85,86}, al igual que nosotros, no encontró diferencias a nivel sanguíneo entre los porcentajes de células Treg de pacientes y sujetos sanos, mientras que otros grupos detectaron un incremento de células Treg que infiltran al tumor^{90,93}. Por lo anterior, consideramos necesario realizar la identificación de esta población en los TILs.

En relación a las células Th17, las identificamos como células CD4⁺RORγ⁺ ya que estudios referentes a la diferenciación de esta población han establecido que RORγ es el factor de transcripción maestro para esta población⁶⁵, por lo que se ha considerado marcador exclusivo. Además, al igual que otros reportes^{95,97,98}, también identificamos a la población Th17 como la productora de IL-17.

El papel de estas células en cáncer aún es controversial, ya que se han asociado con procesos anti- y pro-tumorales⁷². Inicialmente, las células Th17 se reportaron en neoplasias asociadas a un estado de inflamación crónica^{95,98}. Ya que se ha documentado que el hábito tabáquico mantiene un estado de inflamación crónica y que el tabaquismo es un factor de riesgo para el desarrollo de NSCLC, consideramos a los sujetos fumadores como un grupo control. El porcentaje de esta población en los pacientes con NSCLC varió con respecto a otros tipos de cáncer^{95,98}; pero al igual que en cáncer gástrico⁹⁵, encontramos un incremento significativo en la población de células Th17 (RORγ⁺) en sangre periférica de los pacientes. Al detectar la producción de IL-17, observamos un incremento en el porcentaje de células IL-17⁺ en pacientes y sujetos fumadores. Por otra parte, algunos autores detectan la presencia de esta población en el infiltrado inflamatorio de algunos tipos de tumores. Chen y cols.⁹⁹ identificaron células IL-17⁺ en cortes histológicos de NSCLC. Se ha propuesto que la molécula CCR6

detectada en la población Th17 favorece su reclutamiento al sitio del tumor⁶³, por lo que consideramos necesario estudiar esta población en el infiltrado inflamatorio del tumor. Estos resultados sugieren que en el estado de inflamación crónica debido al hábito tabáquico participan las células Th17. Es necesario determinar si el ambiente inflamatorio crónico debido a las células Th17, además de ser un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer pulmonar, es promovido o mantenido por el tumor ya establecido y participa en su crecimiento o progresión. Para conocer este aspecto estamos iniciando estudios en pacientes con NSCLC sin antecedentes de tabaquismo o de otros factores que induzcan un proceso inflamatorio crónico.

Participación de las células Treg y Th17 en cáncer pulmonar.

El hábito tabáquico afecta las barreras primarias de defensa del tracto respiratorio, ya que disminuye la actividad de la carpeta mucociliar. Lo anterior lleva a una ineficiente eliminación de los patógenos y otros agentes tóxicos presentes en el aire, que constantemente penetran al tracto respiratorio. Lo anterior induce una reacción inflamatoria aguda que, por la persistencia del tabaquismo, se transforma en una inflamación crónica que afecta diversas estructuras celulares de tracto respiratorio. Los mecanismos de reparación y regulación, entre ellos la presencia de células Treg, participan evitando la exacerbación de la respuesta inflamatoria crónica¹⁸. Sin embargo, ya que el tabaquismo continua, la inflamación crónica sobrepasa estos mecanismos de reparación y regulación del tejido dañado. Los agentes genotóxicos presentes en el humo del cigarro afectan irreversiblemente al material genético de las células epiteliales adyacentes al tejido dañado, lo que inicia el proceso de malignidad. Transcurrido el tiempo y ya que el tabaquismo se mantiene, así como se incrementa la heterogeneidad tumoral, algunas clonas de células malignas producen TGF- β ¹⁰¹ y otros mediadores que inducen en las DCs locales la producción de IL-6¹⁰². El TGF- β y la IL-6 participan en la diferenciación e incremento de la población de células Th17. La IL-17 producida por estas células favorece el establecimiento de un microambiente pro-inflamatorio, y al actuar en células blanco como células endoteliales y fibroblastos, induce en ellas la producción de IL-6. Este microambiente inflamatorio, en el que sobresale la producción de IL-17 estimula en los fibroblastos la producción de VEGF para generar nuevos vasos

sanguíneos. La neovascularización favorece el crecimiento tumoral. Además, la IL-17 induce en células endoteliales y fibroblastos la producción de metaloproteasas que promueven la remodelación de la matriz extracelular, favoreciendo la invasión y metástasis de las células tumorales⁷².

En relación a la respuesta inmune, la IL-17 promueve la maduración de DCs así como la activación de células NK y CTLs⁷². En parte, la activación constante puede llevar a que las células inmunes queden exhaustas y disminuyan la síntesis de granzimas y perforina por las células citotóxicas¹⁰³. Lo anterior puede ser aprovechado por las células tumorales para evadir la respuesta inmune del huésped. Sin embargo, y debido a la inflamación crónica perenne, el organismo trata aun de mesurar este fenómeno, manteniendo y/o incrementando la funcionalidad de las células Treg.

Profundizar en el conocimiento de la participación de las células Treg y Th17 permitirá el desarrollo de tratamientos que permitan controlar el crecimiento y favorecer la eliminación del tumor.

CONCLUSIONES

- Se identificaron células Treg y Th17 en la sangre periférica de pacientes con carcinomas pulmonares de células no pequeñas, sujetos fumadores y sujetos no fumadores.
- El porcentaje de células Treg con fenotipo CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ fue similar al porcentaje de células Treg con fenotipo CD4⁺CD25⁺CD127⁻CD49d⁻.
- El porcentaje de células Treg fue similar entre los grupos estudiados, lo que sugiere que ni el hábito tabáquico ni la patología estudiada incrementan su porcentaje en sangre periférica.
- Las células Treg expresaron las moléculas CTLA-4 y LAP(TGF-β), pero no produjeron IL-10, lo que sugiere que podrían llevar a cabo su efecto biológico por la interacción célula-célula.
- El porcentaje de células CD4⁺RORγ⁺ es mayor en los pacientes con respecto a los sujetos no fumadores.
- El porcentaje de células productoras de IL-17 (Th17) es mayor en los pacientes y sujetos fumadores con respecto a los sujetos no fumadores.
- Los porcentajes de células Th17 con fenotipo CD4⁺RORγ⁺ es similar al porcentaje de células Th17 productoras de IL-17⁺.
- En los sujetos fumadores, un proceso inflamatorio crónico debido al hábito tabáquico incrementa el porcentaje de células Th17. En los pacientes con NSCLC, la persistencia del proceso inflamatorio, por la continuación del tabaquismo o por la propia masa tumoral, puede mantener el microambiente que favorece el incremento en el porcentaje de células Th17.

PERSPECTIVAS

- Realizar la identificación, cuantificación y evaluación de las células Treg y Th17, en el infiltrado inflamatorio de los NSCLC.
- Realizar estudios que permitan corroborar la funcionalidad de las células Treg identificadas en este estudio. De igual manera realizar estudios que puedan definir el mecanismo por el cual las células Treg llevan a cabo su función supresora. En caso de no presentar una actividad reguladora, identificar las alteraciones que puedan evitar la funcionalidad de estas células.
- Realizar estudios que demuestren la funcionalidad de la IL-17 producida por las células Th17.
- Realizar estudios que permitan dilucidar si el incremento de las células Th17 en los pacientes con NSCLC es favorecido por el hábito tabáquico o por la masa tumoral.

REFERENCIAS

1. Lazcano Ponce EC, Tovar Guzman V, Meneses Gonzalez F, Rascon Pacheco RA, Hernandez Avila M. 1997. Trends of lung cancer mortality in Mexico. *Arch Med Res* 28: 565-70
2. Medina FM, Barrera RR, Morales JF, Echegoyen RC, Chavarria JG, Reborá FT. 1996. Primary lung cancer in Mexico city: a report of 1019 cases. *Lung Cancer* 14: 185-93
3. Ruiz-Godoy L, Rizo Rios P, Sanchez Cervantes F, Osornio-Vargas A, Garcia-Cuellar C, Meneses Garcia A. 2007. Mortality due to lung cancer in Mexico. *Lung Cancer* 58: 184-90
4. Davila DG, Williams DE. 1993. The etiology of lung cancer. *Mayo Clin Proc* 68: 170-82
5. Zochbauer-Muller S, Gazdar AF, Minna JD. 2002. Molecular pathogenesis of lung cancer. *Annu Rev Physiol* 64: 681-708
6. Gazdar AF, Minna JD. 1997. Cigarettes, sex, and lung adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 89: 1563-5
7. Minna JD, Roth JA, Gazdar AF. 2002. Focus on lung cancer. *Cancer Cell* 1: 49-52
8. Weinberg RA. 1996. How cancer arises. *Sci Am* 275: 62-70
9. Pitot HC, Dragan YP. 1991. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *Faseb J* 5: 2280-6
10. Barrett JC. 1993. Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environ Health Perspect* 100: 9-20
11. Balkwill F, Mantovani A. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357: 539-45
12. Coussens LM, Werb Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature* 420: 860-7
13. Sansone P, Bromberg J. 2011. Environment, inflammation, and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 21: 80-5
14. Kuper H, Boffetta P, Adami HO. 2002. Tobacco use and cancer causation: association by tumour type. *J Intern Med* 252: 206-24
15. Dye JA, Adler KB. 1994. Effects of cigarette smoke on epithelial cells of the respiratory tract. *Thorax* 49: 825-34
16. Sopori M. 2002. Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat Rev Immunol* 2: 372-7
17. Mian MF, Lauzon NM, Stampfli MR, Mossman KL, Ashkar AA. 2008. Impairment of human NK cell cytotoxic activity and cytokine release by cigarette smoke. *J Leukoc Biol* 83: 774-84
18. Stampfli MR, Anderson GP. 2009. How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. *Nat Rev Immunol* 9: 377-84
19. Alberg AJ, Brock MV, Samet JM. 2005. Epidemiology of lung cancer: looking to the future. *J Clin Oncol* 23: 3175-85
20. Vakkila J, Lotze MT. 2004. Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nat Rev Immunol* 4: 641-8
21. Swann JB, Smyth MJ. 2007. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest* 117: 1137-46
22. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. 2006. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 6: 715-27
23. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. 2001. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2: 293-9
24. Qin Z, Schwartzkopff J, Pradera F, Kammertoens T, Seliger B, Pircher H, Blankenstein T. 2003. A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells. *Cancer Res* 63: 4095-100
25. Sinha P, Clements VK, Miller S, Ostrand-Rosenberg S. 2005. Tumor immunity: a balancing act between T cell activation, macrophage activation and tumor-induced immune suppression. *Cancer Immunol Immunother* 54: 1137-42
26. Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, Liao F, Farber JM, Maheshwari S, Kleinman HK, Reaman GH, Tosato G. 1995. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* 182: 155-62
27. Kim R, Emi M, Tanabe K. 2007. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 121: 1-14
28. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. 2004. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21: 137-48
29. Kim R, Emi M, Tanabe K, Arihiro K. 2006. Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. *Cancer Res* 66: 5527-36

30. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. 2001. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410: 1107-11
31. Kim R, Emi M, Tanabe K. 2005. Cancer cell immune escape and tumor progression by exploitation of anti-inflammatory and pro-inflammatory responses. *Cancer Biol Ther* 4: 924-33
32. Kim R, Emi M, Tanabe K. 2006. Cancer immunosuppression and autoimmune disease: beyond immunosuppressive networks for tumour immunity. *Immunology* 119: 254-64
33. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. 2007. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 25: 267-96
34. Zou W, Restifo NP. 2010. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 10: 248-56
35. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. 2010. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 10: 490-500
36. Lu LF, Rudensky A. 2009. Molecular orchestration of differentiation and function of regulatory T cells. *Genes Dev* 23: 1270-82
37. Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE. 2007. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol* 37: 129-38
38. Hori S. 2010. Developmental plasticity of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 22: 575-82
39. Hanabuchi S, Ito T, Park WR, Watanabe N, Shaw JL, Roman E, Arima K, Wang YH, Voo KS, Cao W, Liu YJ. 2010. Thymic stromal lymphopoietin-activated plasmacytoid dendritic cells induce the generation of FOXP3⁺ regulatory T cells in human thymus. *J Immunol* 184: 2999-3007
40. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. 2009. Natural and adaptive foxp3⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 30: 626-35
41. Martin F, Ladoire S, Mignot G, Apetoh L, Ghiringhelli F. 2010. Human FOXP3 and cancer. *Oncogene* 29: 4121-9
42. Coffey PJ, Burgering BM. 2004. Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. *Nat Rev Immunol* 4: 889-99
43. Ziegler SF. 2006. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol* 24: 209-26
44. Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. 2005. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF- κ B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 5138-43
45. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. 2008. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8: 523-32
46. Du J, Huang C, Zhou B, Ziegler SF. 2008. Isoform-specific inhibition of ROR α -mediated transcriptional activation by human FOXP3. *J Immunol* 180: 4785-92
47. Allan SE, Passerini L, Bacchetta R, Crellin N, Dai M, Orban PC, Ziegler SF, Roncarolo MG, Levings MK. 2005. The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4⁺ Tregs. *J Clin Invest* 115: 3276-84
48. Mandapathil M, Lang S, Gorelik E, Whiteside TL. 2009. Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from the peripheral blood based on the CD39 expression. *J Immunol Methods* 346: 55-63
49. Hamann A, Klugewitz K, Austrup F, Jablonski-Westrich D. 2000. Activation induces rapid and profound alterations in the trafficking of T cells. *Eur J Immunol* 30: 3207-18
50. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. 2006. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med* 203: 1701-11
51. Kleinewietfeld M, Starke M, Di Mitri D, Borsellino G, Battistini L, Rotzschke O, Falk K. 2009. CD49d provides access to "untouched" human Foxp3⁺ Treg free of contaminating effector cells. *Blood* 113: 827-36
52. Shevach EM. 2009. Mechanisms of foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30: 636-45
53. Murai M, Turovskaya O, Kim G, Madan R, Karp CL, Cheroutre H, Kronenberg M. 2009. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol* 10: 1178-84

54. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198: 1875-86
55. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. 2007. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* 8: 1353-62
56. Oberle N, Eberhardt N, Falk CS, Krammer PH, Suri-Payer E. 2007. Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4+CD25 T cells by CD4+Foxp3+ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF-beta, and various inhibitors of TCR signaling. *J Immunol* 179: 3578-87
57. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 204: 1257-65
58. Zarek PE, Huang CT, Lutz ER, Kowalski J, Horton MR, Linden J, Drake CG, Powell JD. 2008. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood* 111: 251-9
59. Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmethofer A, Serfling E, Heib V, Becker M, Kubach J, Schmitt S, Stoll S, Schild H, Staeger MS, Stassen M, Jonuleit H, Schmitt E. 2007. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 204: 1303-10
60. Cederbom L, Hall H, Ivars F. 2000. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 30: 1538-43
61. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre ML, Puccetti P. 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 4: 1206-12
62. Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, Hipkiss EL, Ravi S, Kowalski J, Levitsky HI, Powell JD, Pardoll DM, Drake CG, Vignali DA. 2004. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 21: 503-13
63. O'Shea JJ, Steward-Tharp SM, Laurence A, Watford WT, Wei L, Adamson AS, Fan S. 2009. Signal transduction and Th17 cell differentiation. *Microbes Infect* 11: 599-611
64. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. 2007. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol* 19: 652-7
65. de Jong E, Suddason T, Lord GM. 2009. Translational mini-review series on Th17 cells: development of mouse and human T helper 17 cells. *Clin Exp Immunol* 159: 148-58
66. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 27: 485-517
67. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. 2007. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 25: 821-52
68. Aggarwal S, Gurney AL. 2002. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J Leukoc Biol* 71: 1-8
69. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. 2009. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 361: 888-98
70. Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. 2003. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 14: 155-74
71. Wolk K, Witte E, Witte K, Warszawska K, Sabat R. 2010. Biology of interleukin-22. *Semin Immunopathol* 32: 17-31
72. Murugaiyan G, Saha B. 2009. Protumor vs antitumor functions of IL-17. *J Immunol* 183: 4169-75
73. Honorati MC, Neri S, Cattini L, Facchini A. 2006. Interleukin-17, a regulator of angiogenic factor release by synovial fibroblasts. *Osteoarthritis Cartilage* 14: 345-52
74. Waugh DJ, Wilson C. 2008. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 14: 6735-41
75. Kryczek I, Wei S, Szeliga W, Vatan L, Zou W. 2009. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood* 114: 357-9
76. Benchetrit F, Ciree A, Vives V, Warnier G, Gey A, Sautes-Fridman C, Fossiez F, Haicheur N, Fridman WH, Tartour E. 2002. Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood* 99: 2114-21
77. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441: 235-8

78. Weaver CT, Hatton RD. 2009. Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective. *Nat Rev Immunol* 9: 883-9
79. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. 2007. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 148: 32-46
80. Lee YK, Mukasa R, Hatton RD, Weaver CT. 2009. Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. *Curr Opin Immunol* 21: 274-80
81. Peck A, Mellins ED. 2009. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. *Immunology* 129: 147-53
82. Zhou X, Bailey-Bucktrout S, Jeker LT, Bluestone JA. 2009. Plasticity of CD4(+) FoxP3(+) T cells. *Curr Opin Immunol* 21: 281-5
83. Beyer M, Schultze JL. 2006. Regulatory T cells in cancer. *Blood* 108: 804-11
84. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155: 1151-64
85. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, Rubin SC, Kaiser LR, June CH. 2001. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 61: 4766-72
86. Woo EY, Yeh H, Chu CS, Schlienger K, Carroll RG, Riley JL, Kaiser LR, June CH. 2002. Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol* 168: 4272-6
87. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA, Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS, Linehan DC. 2002. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 169: 2756-61
88. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10: 942-9
89. Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B. 2003. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res* 9: 606-12
90. Ichihara F, Kono K, Takahashi A, Kawaida H, Sugai H, Fujii H. 2003. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clin Cancer Res* 9: 4404-8
91. Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F. 2005. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 65: 2457-64
92. Ling KL, Pratap SE, Bates GJ, Singh B, Mortensen NJ, George BD, Warren BF, Piris J, Roncador G, Fox SB, Banham AH, Cerundolo V. 2007. Increased frequency of regulatory T cells in peripheral blood and tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer patients. *Cancer Immun* 7: 7
93. Petersen RP, Campa MJ, Sperlazza J, Conlon D, Joshi MB, Harpole DH, Jr., Patz EF, Jr. 2006. Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer* 107: 2866-72
94. Maniati E, Soper R, Hagemann T. 2010. Up for Mischief? IL-17/Th17 in the tumour microenvironment. *Oncogene* 29: 5653-62
95. Zhang B, Rong G, Wei H, Zhang M, Bi J, Ma L, Xue X, Wei G, Liu X, Fang G. 2008. The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 374: 533-7
96. Miyahara Y, Odunsi K, Chen W, Peng G, Matsuzaki J, Wang RF. 2008. Generation and regulation of human CD4+ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 15505-10
97. Wu C, Wang S, Wang F, Chen Q, Peng S, Zhang Y, Qian J, Jin J, Xu H. 2009. Increased frequencies of T helper type 17 cells in the peripheral blood of patients with acute myeloid leukaemia. *Clin Exp Immunol* 158: 199-204
98. Zhang JP, Yan J, Xu J, Pang XH, Chen MS, Li L, Wu C, Li SP, Zheng L. 2009. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol* 50: 980-9
99. Chen X, Wan J, Liu J, Xie W, Diao X, Xu J, Zhu B, Chen Z. 2010. Increased IL-17-producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients. *Lung Cancer* 69: 348-54

100. Numasaki M, Watanabe M, Suzuki T, Takahashi H, Nakamura A, McAllister F, Hishinuma T, Goto J, Lotze MT, Kolls JK, Sasaki H. 2005. IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. *J Immunol* 175: 6177-89
101. Lopez-Gonzalez JS, Aguilar-Cazares D, Prado-Garcia H, Nieto-Rodriguez A, Mandoki JJ, Avila-Moreno F, Rivera RM, Chavarria-Garces J. 2002. Lack of correlation between growth inhibition by TGF-beta and the percentage of cells expressing type II TGF-beta receptor in human non-small cell lung carcinoma cell lines. *Lung Cancer* 38: 149-58
102. Avila-Moreno F, Lopez-Gonzalez JS, Galindo-Rodriguez G, Prado-Garcia H, Bajana S, Sanchez-Torres C. 2006. 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* 55: 598-611
103. Prado-Garcia H, Aguilar-Cazares D, Flores-Vergara H, Mandoki JJ, Lopez-Gonzalez JS. 2005. Effector, memory and naive CD8+ T cells in peripheral blood and pleural effusion from lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer* 47: 361-71
104. Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y. 2001. The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J* 18: 1059-68
105. Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, DeRoos P, Ho WY, Stray-Pedersen A, Ocheltree EL, Greenberg PD, Ochs HD, Rudensky AY. 2006. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 6659-64
106. Venditti A, Del Poeta G, Maurillo L, Buccisano F, Del Principe MI, Mazzone C, Tamburini A, Cox C, Panetta P, Neri B, Ottaviani L, Amadori S. 2004. Combined analysis of bcl-2 and MDR1 proteins in 256 cases of acute myeloid leukemia. *Haematologica* 89: 934-9
107. Juarez E, Nunez C, Sada E, Ellner JJ, Schwander SK, Torres M. 2010. Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes. *Respir Res* 11: 2
108. Kim DS, Paik SH, Lim CM, Lee SD, Koh Y, Kim WS, Kim WD. 1999. Value of ICAM-1 expression and soluble ICAM-1 level as a marker of activity in sarcoidosis. *Chest* 115: 1059-65
109. Khalil N. 1999. TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect* 1: 1255-63
110. Vergati M, Cereda V, Madan RA, Gulley JL, Huen NY, Rogers CJ, Hance KW, Arlen PM, Schlom J, Tsang KY. 2010. Analysis of circulating regulatory T cells in patients with metastatic prostate cancer pre- versus post-vaccination. *Cancer Immunol Immunother*