



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

PAPEL DE LAS CÉLULAS SUPRESORAS
DE ORIGEN MIELOIDE EN
CÁNCER PULMONAR.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A

RENATO AUGUSTO MORALES FLORES.

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

DRA. LOURDES MARÍA BARRERA RAMÍREZ

COMITÉ TUTOR:

M. en C. OSCAR GERARDO ARRIETA RODRIGUEZ

DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE, 2012



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 agosto de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **MORALES FLORES RENATO AUGUSTO** con número de cuenta 511012356, con la tesis titulada "**PAPEL DE LAS CÉLULAS SUPRESORAS DE ORIGEN MIELOIDE EN CÁNCER PULMONAR**", realizada bajo la dirección de la: **DRA. LOURDES MARÍA BARRERA RAMÍREZ**

Presidente: DR. HÉCTOR DE JESÚS MAYANI VIVEROS
Vocal: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Secretario: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Suplente: M EN C. OSCAR GERARDO ARRIETA RODRÍGUEZ
Suplente: DR. ÁNGEL ALFONSO ZARAIN HERZBERG

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 09 de octubre de 2012

María del Coro Arizmendi Arriaga
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme realizar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo recibido mediante la beca de posgrado que me otorgó y gracias a la cual me fue posible dedicarme en tiempo completo al programa.

A los miembros del comité tutorial por la dirección y apoyo en mis estudios de posgrado.

Tutor principal: Dra. Lourdes María Barrera Ramírez

Comité Tutorial: M. en C. Oscar Gerardo Arrieta Rodríguez

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

A mis padres como muestra de mi eterno agradecimiento por el apoyo brindado durante mi desarrollo académico, el cual, representa la mejor de las herencias.

A los miembros de mi comité tutorial la Dra. Lourdes María Barrera Ramírez, el M. en C. Oscar Gerardo Arrieta Rodríguez y al Dr. Alejandro Zentella Dehesa, por si invaluable apoyo durante la realización del presente proyecto

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN	14
SUMMARY.....	16
INTRODUCCIÓN	18
I. ANTECEDENTES	22
1.1 Cáncer.....	22
1.1.1 Epidemiología del cáncer.....	23
1.1.2 Inmunología en cáncer.....	27
1.2 Cáncer Pulmonar.....	28
1.2.1 Epidemiología.....	29
1.2.2 Etiología del cáncer de pulmón.....	30
1.2.3 Clasificación de Cáncer de Pulmón.....	34
1.2.3.1 Clasificación histopatológica.....	35
1.2.3.1.1 Cáncer pulmonar de células no-pequeñas.....	35
1.2.3.1.2 Cáncer pulmonar de células pequeñas.....	36
1.2.4 Estadificación y Diagnóstico.....	36
1.2.4.1 Procedimientos de estadificación.....	43
1.2.4.2 Estadificación patológica.....	46
1.2.4.3 Estadificación molecular del cáncer de pulmón.....	46
1.2.5 Tratamiento.....	47
1.2.6 Inmunología del cáncer de pulmón.....	50
1.3 Células mieloides.....	53
1.3.1 Regulación de las células mieloides durante el desarrollo del tumor.....	56
1.3.1.1 Las Células Dendríticas en el desarrollo del cáncer.....	57
1.3.1.2 Macrófagos en la promoción del tumor.....	58
1.3.1.3 Granulocitos en la progresión del Cáncer.....	59
1.3.2 Mecanismos de impacto tumoral sobre células mieloides.....	60

1.4 Células supresoras de origen mieloide (MDSCs)	63
1.4.1 Contexto histórico	64
1.4.2 MDSCs como células regulatorias	65
1.4.3 Origen de las MDSCs	65
1.4.4 Subgrupos de MDSCs	67
1.4.5 Expansión y activación	69
1.4.6 MDSCs en cáncer	71
1.4.7 Mecanismos de Supresión	72
1.4.7.1 Mecanismos dependientes de L-Arginina	73
1.4.7.1.1 Agotamiento de L-arginina y sus efectos en la proliferación y activación de Linfocitos T	74
1.4.7.1.2 Estrés Oxidante como promotor de la falta de reconocimiento antigénico	79
1.4.7.1.3 Supresión cooperativa de arginasa e iNOS	80
1.4.7.2 Nuevos mecanismos	81
1.4.7.2.1 Afectación del tráfico y viabilidad de linfocitos T	81
1.4.7.2.2 Inducción de apoptosis en LinfocitosT	81
1.4.7.2.3 Promoción de la activación y expansión de Linfocitos Tregs	83
1.4.8 Especificidad de las MDSCs para suprimir la respuesta inmune en tejidos específicos	83
1.4.9 Relación de las MDSCs con otras células mieloides	85
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	87
III. HIPOTESIS	88
IV. OBJETIVOS	89
4.1 Objetivo General	89
4.2 Objetivos Específicos	89

V. METODOLOGÍA.....	90
5.1 Población de estudio.....	90
5.2 Criterios de inclusión.....	90
5.3 Criterios de exclusión.....	91
5.4 Obtención de células mononucleares de sangre periférica.....	91
5.5 Caracterización fenotípica de MDSCs Polimorfonucleares.....	92
5.6 Caracterización fenotípica Linfocitos T.....	93
5.7 Análisis estadístico.....	93
VI. RESULTADOS.....	94
6.1 Características socio-demográficas de los pacientes estudiados.....	94
6.2 Características clínicas de los pacientes estudiados.....	94
6.3 Incremento de poblaciones mieloides en pacientes con CáncerPulmonar.....	95
6.4 Incremento de la población supresora de origen mieloide CD11b ⁺ CD14 ⁻ CD66b ⁺ CD15 ⁺ en pacientes con adenocarcinoma en estadio IV.....	98
6.5 Aumento de la expresión del VEGFR en la población mieloide supresora CD11b ⁺ CD14 ⁻ CD66b ⁺ CD15 ⁺ de pacientes con adenocarcinoma.....	99
6.6 Disminución de poblaciones linfocitarias en pacientes con adenocarcinoma pulmonar.....	100
6.7 Disminución de la expresión de la cadena ζ en las subpoblaciones CD3 ⁺ , CD3 ⁺ CD4 ⁺ y CD3 ⁺ CD8 ⁺ de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar.....	102
6.8 Correlación entre el aumento de poblaciones mieloides y la disminución de linfocitos.....	107
VII. DISCUSIÓN.....	108
VIII. CONCLUSIONES.....	115
IX. REFERENCIAS.....	116

LISTA DE ABREVIATURAS.

MDSCs	Células Supresoras de Origen Mieloide
NK	Célula Asesina Natural
TGF- β	Factor de Crecimiento Tumoral-beta
Treg	Célula T reguladora
CPM	Cáncer Pulmonar Microcitico
CPNM	Cáncer Pulmonar No Microcitico
IASLC	Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón
TC	Tomografía Computarizada
PET	Tomografía por Emisión de Positrones
EBUS	Ultrasonido Endobronquial
EUS	Ultrasonido Esofágico
MED	Mediastinoscopia
MEDTM	Mediastinotomía
MEDCE	Mediastinoscopia cervical extendida
PAAF	Punción aspirativa con aguja fina
EUS-PAAF	Punción aspirativa con aguja fina transesofágica
RM	Resonancia Magnética
TEMLA	Linfadenectomía mediastínica transcervical extendida
VAMLA	Linfadenectomía mediastínica videoasistida

RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa – Transcriptasa reversa.
HSC	Células madre hematopoyéticas multipotentes
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
DAMPs	Patrones moleculares asociados al daño
DCs	Células Dendríticas
pDCs	Células Dendríticas Plasmáticas
IFN- γ	Interferon gamma
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
HIF1 α	Factor transcripcional inducible de hipoxia
COX2	Ciclooxigenasa 2
ARG1	Arginasa 1
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
GM-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos/macrófagos
G-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos
SCF	Factor de células madre
Bcl-XL	Linfoma de Células B-XL
STAT3	Transductor de Señal y Activador de la Transcripción 3
STAT1	Transductor de Señal y Activador de la Transcripción 1
STAT6	Transductor de Señal y Activador de la Transcripción 6
iNOS	Óxido Nítrico Sintasa inducida
NF- κ B	Factor Nuclear-kappa beta

PGE2	Prostagalndina 2
IMCs	Celulas Mieloides Inmaduras
HLA-DR	Antígeno Leucocitario Humano
MHC	Complejo Mayor de Histocampatibilidad
ROS	Especies Reactivas de Oxígenoo
NO	Oxido Nitrico
ODC	Ornitina Descarboxilasa
eNOS	Óxido Nítrico Sintasa inducida
nNOS	Óxido Nítrico Sintasa inducida
GC	Guanilato Ciclasa
PBMC	Células Mononucleares de Sangre Periférica
PBS	Solución Salina de Fosfatos
FACS	Separador Celular de Fluorescencia activada

ABBREVIATURE LIST

MDSCs	Myeloid-Derived Suppressor Cells
NK	Natural Killer Cell
TGF- β	Tumor Growth Factor-beta
Treg	Regulatory T Cell
CPM	Microcytic Lung Cancer
CPNM	Non-Microcytic Lung Cancer
IASLC	International Asociation for the Study of Lung Cancer
TC	Computarized Tomography
PET	Positron Emission Tomography
EBUS	Endobronchial ultrasound
EUS	Esophageal ultrasound
MED	Mediastinoscopy
MEDTM	Mediastinotomy
MEDCE	Extended cervical Mediastinoscopy
PAAF	Fine needle aspiration
EUS-PAAF	Endobronchial Fine needle aspiration
RM	Magnetic Resonance
TEMLA	Transcervical Extended Mediastinal Lymphadenectomy
VAMLA	Video-Assisted Mediastinoscopic Lymphadenectomy

RT-PCR	R everse T ranscriptase – P olimerase C hain R eaction
HSC	H ematopoietic S tem C ell
PAMPs	P athogen- a ssociated M olecular P atterns
DAMPs	D amage- a ssociated M olecular P atterns
DCs	D endritic C ells
pDCs	P lasmatic D endritic C ells
IFN-γ	γ amma I nterferon
VEGF	V ascular e ndothelial g rowth f actor
HIF1α	H ypoxia- I nducible T ranscriptional F actor α
COX2	Cyclooxygenase 2
ARG1	Arginase 1
PDGF	P latelet- D erived G rowth F actor
GM-CSF	G ranulocyte/ m acrophage c olony- s timulating f actor
G-CSF	G ranulocyte c olony- s timulating f actor
SCF	S tem C ells F actor
Bcl-XL	B -cell l ymphoma X L
STAT3	S ignal T ransducer and a ctivator of T ranscription 3
STAT1	S ignal T ransducer and a ctivator of T ranscription 1
STAT6	S ignal T ransducer and a ctivator of T ranscription 6
iNOS	inducible N itric O xide S intase
NF-κB	N uclear F actor- κ β

PGE2	Prostaglandin 2
IMCs	Immature M yeloid C ells
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen
MHC	Histocompatibility Major Complex
ROS	Reactive Oxide Species
NO	N itric O xide
ODC	O rnithine D escarboxylase
eNOS	e ndothelial N itric O xide S intase
nNOS	n euronal N itric O xide S intase
GC	G uanylate c yclase
PBMC	P eripheral b lood m ononuclear c ells
PBS	P hosphate B uffered S aline
FACS	F luorescence- a ctivated c ell s orting

RESUMEN

El cáncer de pulmón es el tipo de cáncer más extendido en ambos sexos a nivel mundial. En México representa la segunda causa de muerte por cáncer y a pesar de los esfuerzos por detectarlo tempranamente, generalmente éste se diagnostica en estadios avanzados y con un diagnóstico pobre para los pacientes. El cáncer de pulmón es el resultado del crecimiento anormal de células en el tejido pulmonar. Proveniente de células epiteliales, este crecimiento maligno puede derivar en metástasis e infiltrar a otros tejidos del cuerpo, teniendo por encima de otros tipos de cáncer, un alto grado de malignidad. En éste y en todos los tipos de cáncer en humano se activa una respuesta inmune antitumoral, sin embargo, de alguna manera no descrita por completo, el tumor puede evadir la destrucción inmune y como parte de este fenómeno existen evidencias que indican que algunas células accesorias del sistema inmune necesarias para una respuesta antitumoral efectiva son manipuladas por el tumor para participar en la inactivación de poblaciones efectoras encargadas de destruir células cancerosas. Las Células Supresoras de Origen Mieloide (MDSCs, por sus siglas en inglés: Myeloid Derived Suppressor Cells) constituyen una población heterogénea de células mieloides inmaduras compuesta por macrófagos, granulocitos, células dendríticas y otras poblaciones de origen mieloide en estadios tempranos de diferenciación que ejercen una actividad inmunosupresora en el microambiente de diversas patologías y en particular sobre el cáncer, en donde los efectos causados por su exacerbada activación y expansión, así como su inminente empleo como biomarcadores, las convierten en constante objeto de estudio. Con el fin de caracterizar fenotípicamente a las MDSCs provenientes de muestras sanguíneas de pacientes con adenocarcinoma pulmonar estadio IV libres de tratamiento, se analizaron los leucocitos provenientes de muestras sanguíneas de pacientes y de sujetos sanos. Los resultados obtenidos muestran un incremento de células mieloides con el fenotipo supresor $CD11b^+CD14^-CD66b^+CD15^+$ en los pacientes comparados con controles ($p < 0.0001$). Esta subpoblación, expresó altos niveles del Receptor del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial 1 (VEGFR-1, por sus siglas en inglés).

De manera simultánea se encontró que las subpoblaciones mieloides CD11b⁺, CD11b⁺CD15⁺ y CD11b⁺CD14⁻ también se encontraron incrementadas significativamente en pacientes con adenocarcinoma comparados con sujetos control ($p < 0.0001$).

Adicionalmente observamos una disminución en la frecuencia de linfocitos T totales ($p < 0.0001$), así como de las subpoblaciones CD4⁺ ($p < 0.0001$) y CD8⁺ ($p < 0.001$) en los pacientes con adenocarcinoma pulmonar. También se demuestra una disminución significativa en la expresión de la cadena ζ del receptor CD3 en la población de linfocitos totales y en las subpoblaciones de linfocitos colaboradores y citotóxicos, lo que indica una disminución en la señal de proliferación inducida por esta cadena en las pacientes con cáncer de pulmón. Finalmente encontramos correlaciones moderadas entre la disminución de linfocitos T totales y el aumento de las subpoblaciones mieloides CD11b⁺, CD11b⁺CD15⁺ y CD11b⁺CD14⁻. Estos datos sugieren que en los pacientes con adenocarcinoma pulmonar, al menos una subpoblación supresora de origen mielóide participa potencialmente en la supresión de la función de linfocitos T. Los bajos niveles circulantes de estos últimos sugieren al menos, la afectación de su proliferación y activación en pacientes con cáncer de pulmón en estadio IV.

SUMMARY

Lung cancer is the most widespread type of cancer in both sexes worldwide. In Mexico is the second cause of cancer death and despite efforts to detect it early; this is usually diagnosed in advanced stages with a poor prognosis for patients. This type of cancer results from abnormal cell growth in lung tissue. Derived from epithelial cells, the malignant growth may lead to metastasis and infiltration into other tissues, taking over other types of cancer, a high degree of malignancy. Although, in this and in all human cancers types antitumor immune response is not fully understand, the tumor can evade immune destruction and as a part of this phenomenon there is evidence indicating that immune accessory cells necessary for effective antitumor response are handled by tumor to involve in inactivation of effector populations responsible for cancer cells destruction. Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSCs) are a heterogeneous population of immature myeloid cells composed of macrophages, granulocytes, dendritic cells and other myeloid populations in early stages of differentiation that have an immunosuppressive activity in the microenvironment of different pathologies, particularly on cancer, where the effects caused by heightened activation and expansion, and their imminent use as biomarkers, makes them ever-studied object. In order to characterize phenotypically circulating MDSCs from patients with lung adenocarcinoma free of treatment in stage IV, leukocytes and granulocytes from blood samples were analyzed from patients and healthy subjects. The results showed an increase in myeloid cells with suppressor phenotype $CD11b^+ CD14^-CD66b^+CD15^+$ ($p < 0.0001$) compared to healthy controls and express high levels of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 (VEGFR-1). Simultaneously we found that myeloid subpopulations, $CD11b^+$, $CD11b^+CD15^+$ and $CD11b^+CD14^-$ were also increased in patients with adenocarcinoma ($p < 0.0001$). Additionally we observed a decrease in the frequency of total T lymphocytes ($p < 0.0001$), and subpopulations of $CD4^+$ ($p < 0.0001$) and $CD8^+$ ($p < 0.001$) in patients with pulmonary adenocarcinoma. We also demonstrated a significant decrease in expression of ζ chain CD3 receptor in total lymphocyte population and helpers and cytotoxic lymphocytes subpopulations, which denotes a downregulation of proliferation signal probably induced by MDSCs. Finally we found only moderate correlations between decrease in total T lymphocytes and increased myeloid subpopulations, $CD11b^+$, $CD11b^+CD15^+$, $CD11b^+CD14^-$.

These data suggest that in patients with pulmonary adenocarcinoma at least one myeloid suppressive subpopulation potentially participate in suppression of T cell function. Low circulating levels of T lymphocytes suggest at least, their involvement in altered proliferation and activation in lung cancer patients stage IV.

|

INTRODUCCIÓN

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por más de 100 diferentes tipos de tumores, originados por una serie de daños en el material genético que conlleva a una alteración en el ciclo celular, provocando como consecuencia que una célula se vuelva inmortal y empiece a replicarse de manera descontrolada [1]. Esta enfermedad es un problema de salud pública mundial por el número de muertes por los costos de la atención médica que demanda [2, 3]. El cáncer de pulmón es uno de los tipos de cáncer más extendido entre ambos sexos a nivel mundial. En México de acuerdo con las defunciones por tumores malignos en 2008, para los hombres, el mayor porcentaje de lesiones malignas fue en la próstata, seguido por los tumores de tráquea, bronquios y pulmón; y entre las mujeres, el cáncer de mama, seguido por los tumores malignos de ovarios. Estas frecuencias suelen cambiar pero el cáncer de pulmón ocupa generalmente los primeros lugares tanto en defunciones como en nuevos casos [4, 5].

El cáncer de pulmonar es una enfermedad resultante del crecimiento anormal de células en el tejido pulmonar. Proveniente de células epiteliales, este crecimiento maligno deriva generalmente en invasión y metástasis. El cáncer pulmonar se clasifica histopatológicamente en dos tipos: el cáncer pulmonar de células pequeñas (microcítico) y el de células no pequeñas (no microcítico). El grupo de carcinomas pulmonares de células no pequeñas representa a cerca del 80% de todos los casos de cáncer pulmonar, y está integrado a su vez por tres subtipos histopatológicos principales: carcinoma de células grandes, carcinoma epidermoide o carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma. Correspondiendo a este último la mayor parte los casos de cáncer pulmonar no microcítico [6]. A pesar de los intensos programas de concientización sobre el consumo del tabaco y de los constantes intentos por detectarlo en fases tempranas, éste se diagnostica generalmente en estadios avanzados y con un diagnóstico pobre para los pacientes.

En el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) y en el Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) el número de casos también va en aumento siendo el adenocarcinoma el tipo histológico predominante en los pacientes ingresados [4].

La etiología del cáncer de pulmón, así como del cáncer en general, incluye a la predisposición genética, la radiación ionizante y la exposición a agentes carcinógenos (en particular los productos de la combustión como el tabaco y el humo de leña). La exposición a estos agentes causa cambios acumulativos sobre el ADN de las células, induciendo alteraciones genéticas progresivas que al perpetuarse inician un evento carcinogénico que transformara el epitelio y reviste los bronquios del pulmón.

El proceso neoplásico está caracterizado por detonar una desregulación celular y molecular a distintos niveles. Desregula las señales de proliferación, induce un proceso de angiogénesis, hace a las células resistentes a la muerte celular programada, permite la replicación sin límite, activa mecanismos de invasión y metástasis, genera microambientes hipóxicos, así como la remodelación del metabolismo energético [7]. El trabajo conjunto de algunos ó todos estos mecanismos es necesario para los eventos de iniciación, progresión y metástasis. Particularmente la evasión de la respuesta antitumoral inducida por la progresión del cáncer ha sido estudiada intensamente durante las últimas dos décadas. Esta estrategia de evasión inmune está dirigida por factores secretados por el tumor que promueven la expansión y activación de células con potentes efectos inmunosupresores, que en vez de evitar la progresión, favorecen el desarrollo del cáncer. En este contexto, participan los linfocitos T reguladores (Treg) [8], los macrófagos asociados al tumor (TAMs) [9] y las MSCs entre otras subpoblaciones [10].

Las MDSCs constituyen una población mieloide heterogénea (granulocitos, células dendríticas y macrófagos) en un estado inmaduro con capacidad para suprimir la respuesta inmune del huésped [10, 11].

Estas células pueden considerarse un elemento basal de regulación inmune natural, ya que pueden evitar el daño e inflamación que causarían poblaciones citotóxicas, después de haber eliminado al agente extraño. Sin embargo, en algunos estados patológicos, traumas, inflamación, trasplantes y otras condiciones de estrés, estas células supresoras pueden expandirse en la medula y viajar al torrente sin haber madurado correctamente. Como resultado de esta liberación, las MDSCs se acumulan en órganos linfoides periféricos en donde pueden expandirse y migrar a sitios blanco y al torrente sanguíneo. Estas subpoblaciones ejercen su efecto supresor sobre las células y moléculas de la respuesta

inmune innata y adaptativa, en particular sobre los linfocitos T. Es importante destacar que los mecanismos por los cuales las MDSCs funcionan y se regulan en órganos linfoides secundarios, torrente sanguíneo y en el interior y periferia del microambiente tumoral, aún no están del todo claros. Sin embargo, algunas evidencias iniciales sugieren que la naturaleza de la supresión que las MDSCs ejercen en el sitio del tumor es diferente que en la periferia [11].

El objetivo de esta investigación fue caracterizar fenotípicamente a las células supresoras de origen mieloide provenientes de muestras sanguíneas de pacientes con adenocarcinoma pulmonar de células no pequeñas en estadio IV libres de tratamiento. Así mismo, se evaluó la expresión del receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR-1) en la población referida como supresora [12] con fenotipo: $CD11b^+ CD14^- CD15^+ CD66b^+ VEGFR^+$ y se determinó la frecuencia de linfocitos T totales y las subpoblaciones $CD4^+$ y $CD8^+$. Hasta el momento no se ha descrito el incremento de alguna población mieloide con fenotipo supresor en una cohorte de pacientes con estadios avanzados de cáncer en población mexicana. El presente estudio demostró dicho incremento en la frecuencia y actividad de la población con fenotipo supresor $CD11b^+CD14^-CD66b^+CD15^+VEGFR^+$ en pacientes con adenocarcinoma pulmonar comparados con un grupo control. Simultáneamente se identificó que las poblaciones mieloides con fenotipo $CD11b^+$, $CD11b^+CD15^+$ y $CD11b^+CD14^-$ descritas como supresoras [13, 14] también se encontraron incrementadas significativamente en las muestras de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar libres de tratamiento. De estas poblaciones, las correspondientes a la fracción granulocítica ($CD11b^+CD66b^+$) resultan de especial importancia por poseer la capacidad de infiltrar continuamente el tumor y regresar al torrente sanguíneo y ganglios linfáticos en donde ejercen su efecto supresor sobre linfocitos T vírgenes, maduros y/o diferencialmente inmaduros.

Acorde con esta hipótesis las poblaciones linfocitarias $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$ y $CD3^+CD8^+$ se encontraron disminuidos en la sangre circulante de los pacientes. También se demostró una disminución en la expresión de la cadena ζ del receptor CD3 de las poblaciones linfocitarias mencionadas en el grupo de pacientes. Es importante resaltar que aunque otras condiciones propias del desarrollo tumoral como la hipoxia y la circulación de factores

solubles derivados del tumor alteran la función de los linfocitos T, el incremento de las células supresoras de origen mieloide que se demostró puede potencialmente participar en la afectación de la actividad y expansión de los linfocitos T.

1. ANTECEDENTES

1.1 Cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades que agrupan más de 100 diferentes tipos de tumores, originados por una serie de daños en el material genético. La transformación provoca una alteración en el ciclo celular, lo que tiene como consecuencia que la célula se vuelva inmortal y se replique de manera descontrolada [1].

Se considera que el cáncer es la proliferación anormal de una sola célula que crece por miles, luego por millones y por billones, conformando una masa tumoral o neoformación, también conocida como neoplasia, que tiene la capacidad de invadir los tejidos vecinos, irrumpir en el torrente circulatorio y recorrer el organismo haciendo implantes de sí mismo [7]. Esta capacidad de infiltrar poco a poco los tejidos u órganos vecinos, hasta diseminarse hacia sitios distantes del organismo puede ser el atributo biológico más relevante del cáncer y se denomina metástasis, la cual representa cualquier nuevo foco cancerígeno que no mantiene una relación de contigüidad con el tumor original del que derivan las células cancerosas. La capacidad o no de generar metástasis de una neoplasia determina su tipificación como maligna o benigna. Los diferentes tipos de tumores sólidos reciben su nombre por el tipo de células que los forman. Los sarcomas, los carcinomas y los linfomas son ejemplos de tumores sólidos. Las leucemias son el tipo de cáncer que por lo general no forman tumores sólidos [1].

En síntesis, las investigaciones confirman que el cáncer es una enfermedad genética en la que se ocasionan daños en genes que regulan mecanismos moleculares muy precisos como la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. En consecuencia, una célula maligna se hace inmortal. Diversos agentes carcinógenos, infecciones por virus o herencia de un gen pueden ocasionar alteraciones en los genes encargados de la división celular; estos genes alterados reciben el nombre de *oncogenes*. Mientras que *los genes supresores de tumores* codifican para proteínas reguladoras que bloquean el ciclo celular en respuesta a algún daño del ADN [15]. Aunque las células pueden reparar los daños ocasionados en su información genética, si estos no se corrigen adecuadamente ocasionan que la célula se vuelva cancerosa e inicie un acelerado proceso de multiplicación [7].

El cáncer también está caracterizado por detonar una desregulación celular y molecular a distintos niveles y sus capacidades pueden resumirse bien en lo que hoy se conoce como “sellos” o “hallmarks” del cáncer [7]. El cáncer puede lograr su desarrollo manteniendo la señalización proliferativa, la evasión de moléculas supresoras de crecimiento, la inducción de la angiogénesis, la resistencia a la muerte celular, la replicación sin límite, la activación de invasión y metástasis, la generación de hipoxia, y la remodelación del metabolismo energético así como la evasión de la inhabilitación del sistema inmune. El trabajo conjunto de algunos ó todos estos eventos aportan información acerca de cómo podrían llevarse a cabo los eventos de iniciación, progresión y metástasis.

Particularmente la evasión de la respuesta antitumoral inducida por el mismo proceso neoplásico ha sido de gran interés científico durante las últimas dos décadas. La comprensión funcional y manejo terapéutico de poblaciones celulares del sistema inmune que se acumulan y se expanden durante el crecimiento tumoral en vez de contrarrestar su progresión, promueven el desarrollo del cáncer.

1.1.1 Epidemiología del Cáncer

El cáncer es un problema de salud pública mundial por el número de muertes, por la alteración en el estilo de vida de los pacientes y por los costos de la atención médica que demanda [2, 3]. Esta enfermedad es la segunda causa principal de muerte a nivel global, tan solo detrás de las enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, los fallecimientos por estas últimas tienden a disminuir, mientras que las muertes por cáncer están aumentando. Se estima que a lo largo del siglo XXI el cáncer será la principal causa de muerte en los países desarrollados y en vías de desarrollo[16]. A pesar de esto, los avances en la investigación de esta enfermedad han permitido un aumento en la supervivencia de los pacientes con cáncer. Los tumores malignos representan aproximadamente al 15% de las defunciones mundiales, correspondiendo a cerca de 8 millones de muertes por año, de las cuales más del 70% se registran en países en vías de desarrollo [17]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) prevé que entre 2007 y 2030, aumentará 45% la mortalidad por cáncer a nivel mundial, pues estima que pasara de 8 a más de 11 millones de defunciones por año. Esto como resultado

de crecimiento demográfico, el envejecimiento de la población y el incremento de agentes cancerígenos en el ambiente, entre otros. Además, se estima que durante el mismo periodo, el número de casos nuevos de cáncer aumentará de los cerca de 11 a más de 15 millones [16].

El cáncer de pulmón es uno de los tipos de cáncer más extendido entre ambos sexos en países desarrollados y en vías de desarrollo. Para el caso del sector femenino también sobresalen el cáncer de mama y cérvico-uterino. Mientras que en los hombres también sobresalen los de próstata y colon [2]. La OMS estima que el cáncer podría cobrar la vida de 10.3 millones de personas en el mundo para 2020, afectando a 6.7 millones de personas cada año [18] (Figura 1).

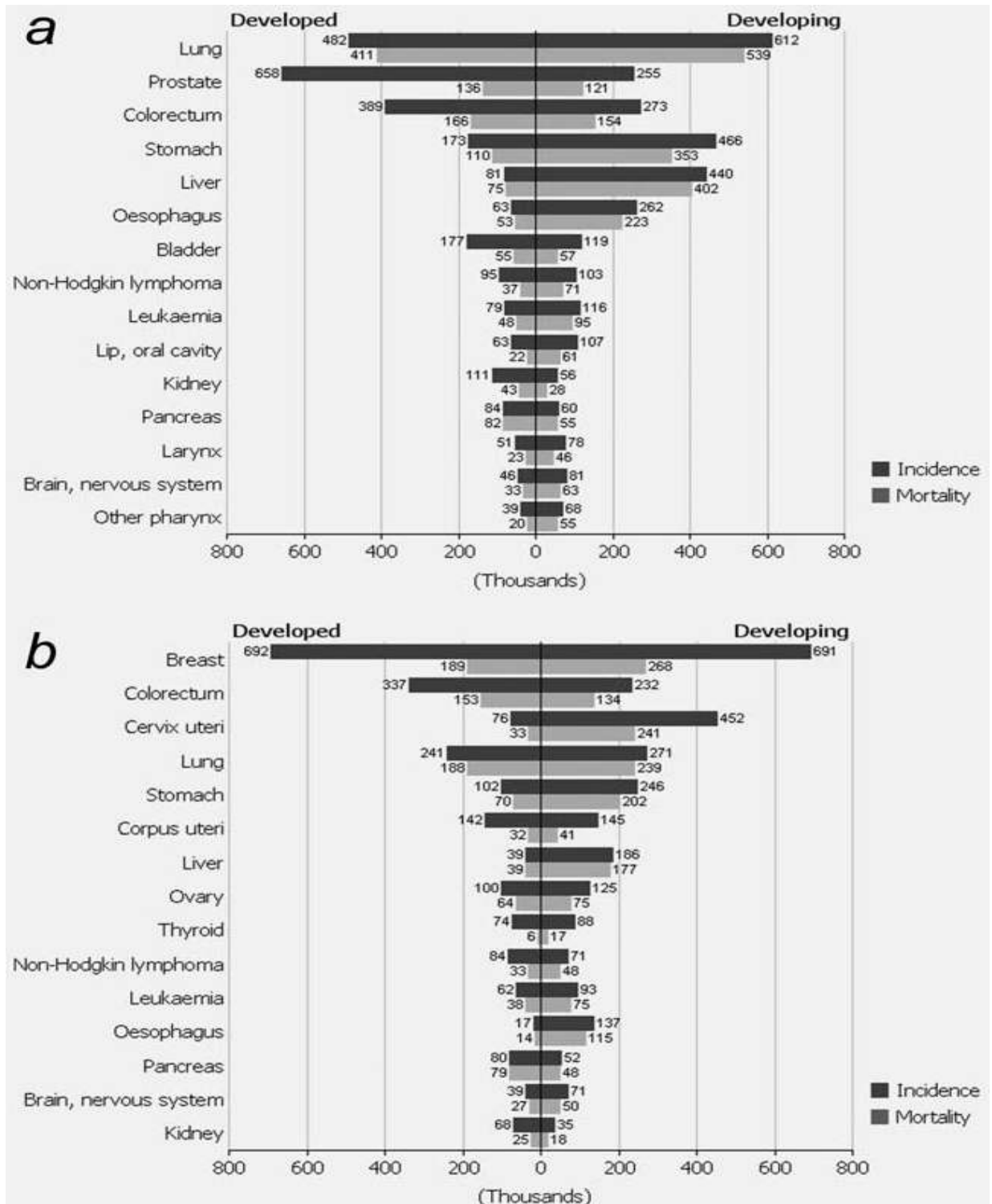


Figura 1. Incidencia y mortalidad por cáncer en el mundo. a) Casos estimados de incidencia de cáncer y muertes por cáncer (miles) en hombres de países desarrollados y en vías de desarrollo en 2008. b) Casos estimados de incidencia de cáncer y muertes por cáncer (miles) en mujeres de países desarrollados y en vías de desarrollo en 2008. (Imagen desde Ferlay, J., et al., *International Journal of Cancer*. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008.)

En México mueren diariamente decenas de personas a causa del cáncer y muchas más reciben la noticia de que padecen esta enfermedad. Cada año se diagnostican en el país cerca de 100 mil nuevos casos, de los cuales aproximadamente dos tercios fallecen debido a una detección tardía o al fracaso del tratamiento [5]. Las cifras convierten a este padecimiento en una de las principales causas de muerte en la población mexicana. La tendencia actual indica que esta enfermedad incide aproximadamente en un 55% sobre las mujeres por un 45% de hombres [5]. Además en nuestro país, la tasa de defunción por tumores tiende a aumentar (Figura 2). De 1998 a 2008, la tasa de mortalidad por cáncer se incrementó, pasando de 57.7 a 66.6 por cada 100 mil habitantes; entre las mujeres, el crecimiento fue de 59.6 a 66.7 por cada 100 mil habitantes, mientras que entre los hombres, de 55.6 a 66.5 cada 100 mil habitantes. En 2008, el cáncer de tráquea, bronquios y pulmón presentan la tasa más alta para tumores malignos en población de 60 años o más (60.19 por cada 100 mil habitantes) [5].

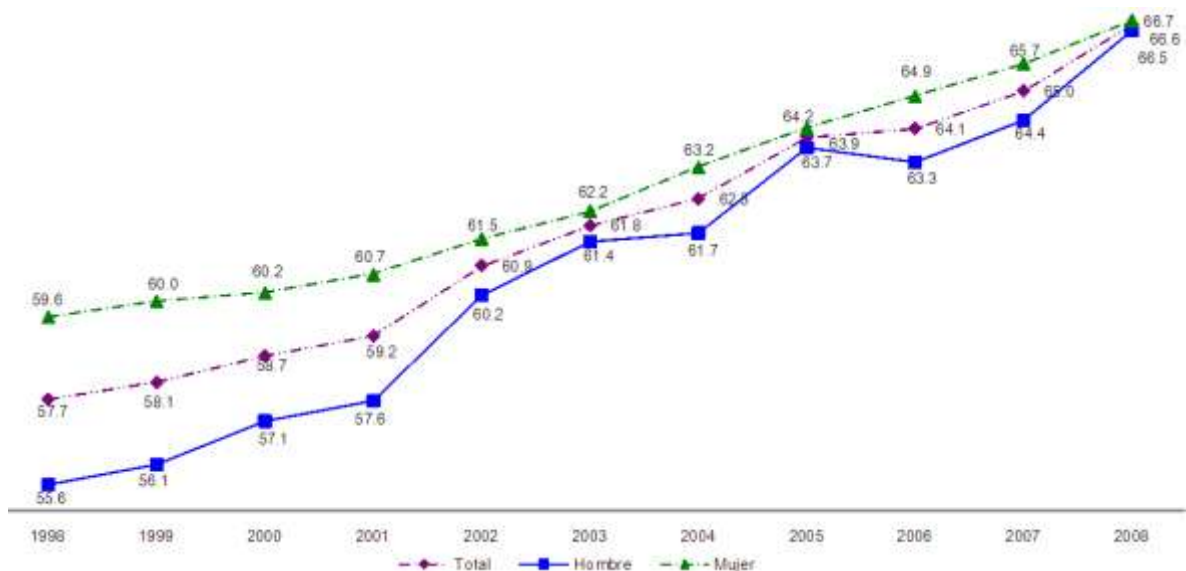


Figura 2. Incremento de la tasa de mortalidad por cáncer en México. Cifras por cada 100,000 habitantes. (Secretaría de Salud 2008)

1.1.2 Inmunología del cáncer

El sistema inmune es sumamente complejo y se compone de elementos que mantienen una relación estrecha para el correcto cumplimiento de sus funciones. Los componentes de la inmunidad celular (linfocitos, células fagocíticas y células presentadoras de antígenos) y de la inmunidad humoral (inmunoglobulinas y citocinas) colaboran en conjunto para poder establecer una respuesta contra agentes extraños.

La vigilancia inmunológica comprende un sistema de monitoreo constante de células y tejidos. Ésta es responsable de reconocer y eliminar la gran mayoría de células cancerosas. De alguna manera no del todo clara, los tumores logran evitar ser eliminados por las distintas defensas del sistema inmune.

Factores derivados del tumor y citocinas producidas por linfocitos activados reclutan a muchos componentes del sistema inmune como parte de una respuesta antitumoral. Los antígenos tumorales y factores derivados del tumor atraen a células mieloides y linfoides que se infiltran en ganglios linfáticos para la presentación de antígenos a linfocitos T vírgenes, promoviendo la activación de linfocitos T colaboradores con perfil de tipo 1 que inducen la activación y expansión de linfocitos T citotóxicos. Estos linfocitos maduros son capaces de destruir células cancerosas a través de moléculas efectoras como la granzima B y la perforina[19].

Es evidente la existencia de una respuesta inmune antitumoral en algunas formas de cáncer humano [20-22]. Se ha descrito que pacientes con tumores en colon y ovario que están fuertemente infiltrados con linfocitos T citotóxicos y células NK (NK; natural killers, asesinas naturales, por sus siglas en inglés) tienen un mejor pronóstico que aquellos que carecen de estos abundantes linfocitos [23].

Sin embargo, se ha observado que la respuesta que se establece durante el desarrollo del cáncer puede estar sujeta a la inactivación de componentes del sistema inmune que se encargan de destruir células cancerosas. Por ejemplo, el complejo microambiente tumoral puede paralizar la infiltración de linfocitos T citotóxicos y células NK, mediante la secreción de TGF- β y de otros factores inmunosupresores [24, 25]. Se han descrito ampliamente también mecanismos más sutiles que operan a través del reclutamiento y acumulación de

células inflamatorias inmunosupresoras, incluyendo las células T reguladoras (Treg) y MDSCs que pueden suprimir la acción de los linfocitos T citotóxicos [8, 26] (Figura 3).

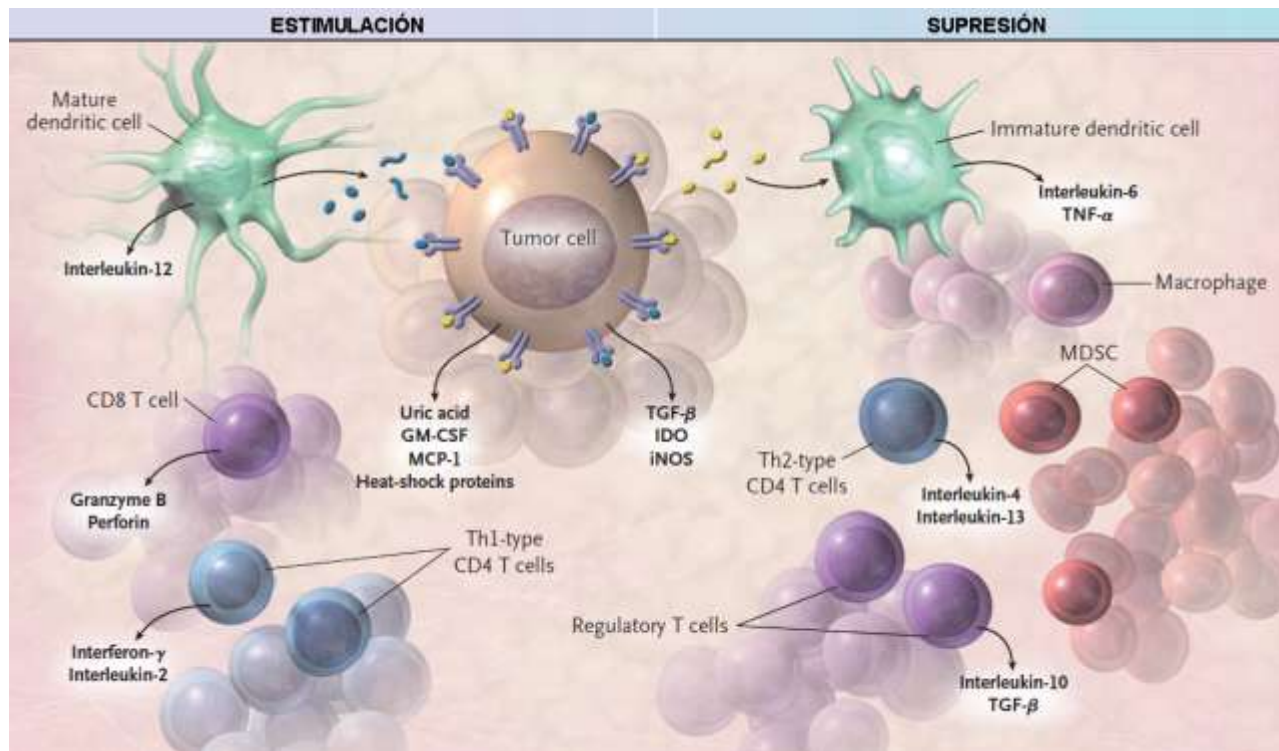


Figura 3. Células inmunoestimuladoras e inmunosupresoras presentes en el microambiente tumoral. (Imagen desde Finn, O.J., N Engl. J. Med. Cancer immunology 2008)

1.2 Cáncer Pulmonar

El cáncer pulmonar es una de las enfermedades más graves y uno de los cánceres con mayor incidencia en el ser humano, responsable de los mayores índices de mortalidad oncológica a escala mundial [2]. Este cáncer es el resultado del crecimiento anormal de células en el tejido pulmonar. Proveniente de células epiteliales, este crecimiento maligno puede derivar en invasión y metástasis.

La sintomatología del cáncer de pulmón suele confundirse en estadios iniciales con la de otras enfermedades graves de las vías respiratorias. Sin embargo, las personas con este tipo de cáncer presentan tos muy frecuente (especialmente tos con sangre), ronquera frecuente, hinchazón del cuello y cara, respiración corta y silbante dolor de pecho y pérdida de apetito o fatiga.

Desde el punto de vista topográfico predomina la localización en el pulmón derecho. Principalmente en los lóbulos superiores y dentro de éstos en el segmento anterior. Con menor frecuencia se localiza en los lóbulos inferiores y rara vez en el lóbulo medio y língula.

Por otra parte, el pulmón es un sitio común para la metástasis diseminada de tumores que comienzan en alguna otra parte del cuerpo. Esto es debido a que los pulmones reciben todo el flujo linfático y sanguíneo y contienen la red capilar más densa de todo el organismo. Por tanto, la heterogeneidad morfológica de las metástasis pulmonares es enorme, Los tumores más comunes que se propagan a los pulmones son los provenientes del cáncer de vejiga, mama, colon, próstata, estómago, páncreas, riñón, hígado, melanoma y neuroblastomas [27]. Por otro lado, los tumores primarios del pulmón hacen metástasis especialmente en las glándulas suprarrenales, hígado, cerebro, y hueso.

1.2.1 Epidemiología del cáncer pulmonar

El cáncer de pulmón es una neoplasia muy agresiva y mortal dado que gran parte de los pacientes mueren antes del primer año después del diagnóstico, dependiendo del estado de sus pulmones, su capacidad para generar defensas y la tolerancia ante la radioterapia y/o quimioterapia. A nivel mundial, el cáncer de pulmón es la forma más frecuente de cáncer en términos de incidencia y mortalidad causando miles de muertes cada año, con las tasas más elevadas en países desarrollados [2, 28]. Además, es el cáncer más frecuente en varones de más de 35 países industrializados, siendo la primera causa de muerte por cáncer tanto en hombres como en mujeres. Más personas mueren de cáncer del pulmón que de cáncer de colon, de mama y de próstata juntos. De acuerdo a las defunciones por tumores malignos en el año 2008 en México, el mayor porcentaje de lesiones malignas en los hombres fue en la próstata (8.1%), seguido por los tumores de tráquea, bronquios y pulmón (7.0%) y entre las mujeres, el cáncer de mama (7.6%), seguido por los tumores malignos de ovarios (6.4 por ciento), siendo el cáncer de pulmón, la tercera causa de defunciones (Figura 4).

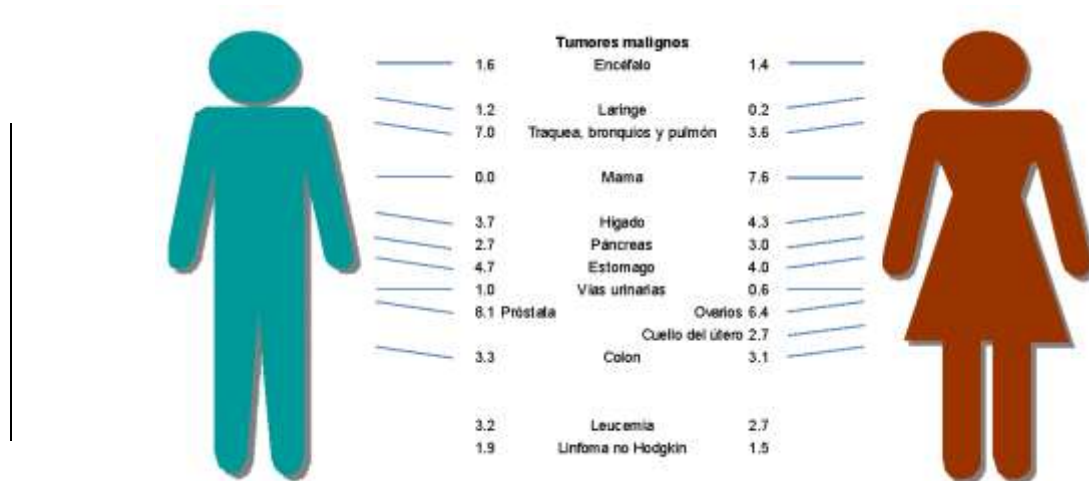


Figura 4. Porcentaje de defunciones por tumores malignos entre hombres y mujeres en México. (Secretaría de Salud 2008)

El segmento poblacional más afectado con esta enfermedad, son los pacientes mayores de 50 años de edad que tienen antecedentes de tabaquismo. Mientras que menos de la sexta parte de los casos ocurren en pacientes menores de 30 años de edad. La edad promedio de las personas diagnosticadas cáncer del pulmón es cercana a los 60 años. Sin embargo, esta tendencia se modifica conforme aumenta la cantidad de fumadores jóvenes [6].

1.2.2 Etiología del cáncer de pulmón

La susceptibilidad genética y el medio ambiente, incluido el humo del tabaco, interactúan para influenciar la carcinogénesis. El cáncer no asociado al tabaquismo puede ser inducido por factores genéticos, hormonales, o ambientales. Mientras que el daño al tejido que causa el humo del tabaco se refleja en pulmones con coloración oscura y cambios que ocurren a nivel genético y epigenético (como mutaciones, pérdida de heterocigocidad, y metilación de promotores) y a nivel del transcriptoma (inflamación y vías apoptóticas). Si los cambios se perpetúan desembocan en la activación de vías aberrantes para la función celular como la proliferación y apoptosis, dando lugar al inicio de la malignidad. Los cambios moleculares que promueven la angiogenesis, invasión y metástasis, seguirán apareciendo conforme avanza la enfermedad (Figura 5).

Unas de las principales causas del cáncer de pulmón, así como del cáncer en general, incluyen a carcinógenos tales como los productos de la combustión y la radiación ionizante.

La exposición a estos agentes causa cambios acumulativos sobre el ADN de las células, induciendo progresivamente alteraciones genéticas que transforman el epitelio que reviste los bronquios del pulmón [19]. A medida que el daño es más extenso, se desarrolla un cáncer.

La causa más común de cáncer de pulmón es el tabaquismo, correspondiendo a la mayor parte de los sujetos diagnosticados, aquellos que son fumadores o ex fumadores. La demostración de que existe una relación directa entre el consumo del tabaco y la aparición del cáncer de pulmón está bien establecida, y se considera más un factor causal que un factor de riesgo [19]. Según el número de cigarrillos fumados al día, las personas tienen un riesgo de 10 a 20 veces mayor de desarrollar cáncer de pulmón que aquellas que no fuman [29].

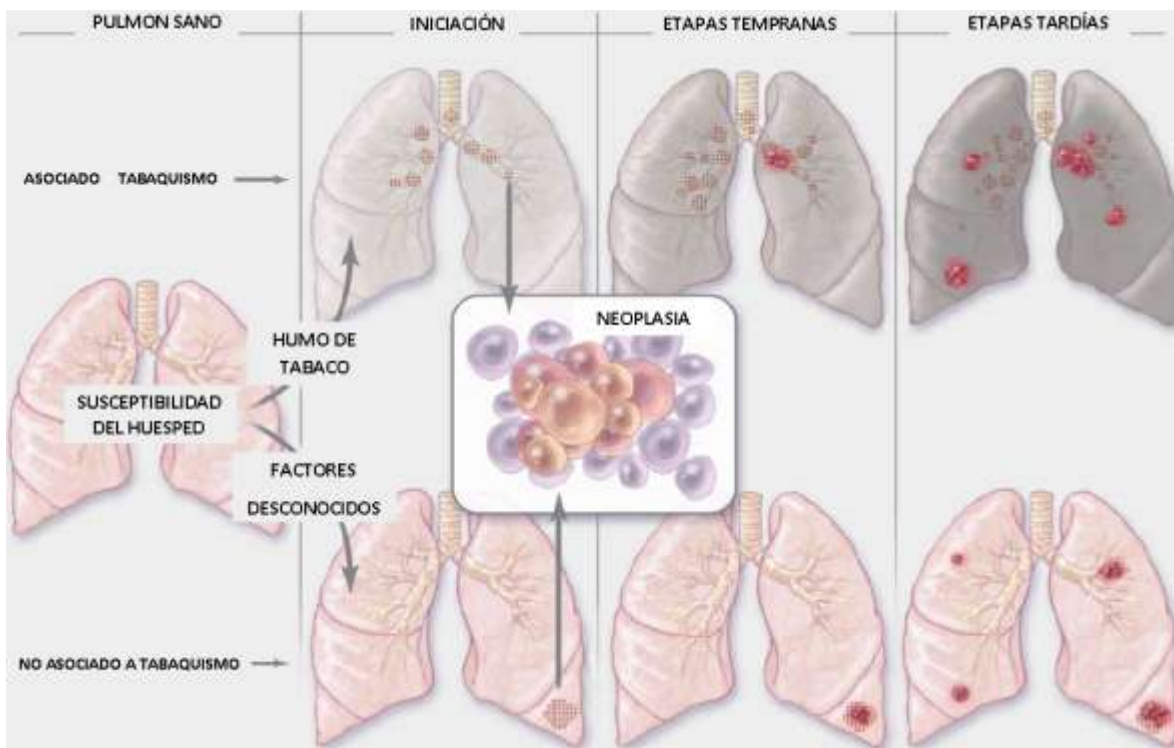


Figura 5. Evolución del Cáncer de Pulmón. En el cáncer de pulmón asociado al tabaco existe una ruta de evolución distinta a la que sigue el cáncer asociado a otros factores. En ambos casos la susceptibilidad del huésped influirá en el proceso neoplásico. (Imagen modificada desde Herbst RS, N. Engl. J. Med. Lung cancer. 2008.)

En las distintas fases del humo de tabaco (gaseosa y sólida o de partículas) se encuentran al menos 4.000 compuestos químicos, de los cuales alrededor de 50 se han asociado a una capacidad para generar cáncer, destacando el benceno y cloruro de vinilo, benzopireno,

formaldehído, hidrazina, nitropropano, nitrosaminas, uretano, etc. El efecto individual de los carcinógenos es difícil de estudiar a nivel molecular, ya que en la práctica, lo que se produce es una exposición crónica a una mezcla compleja de moléculas consideradas carcinógenas o procarcinógenas. La combustión del humo de tabaco genera además, grandes cantidades de radicales libres, derivados del oxígeno, nitrógeno, etc., altamente reactivos y con gran capacidad de dañar macromoléculas, incluido el DNA. Estos agentes también pueden activar a macrófagos alveolares, los cuales dan lugar a una inflamación crónica capaz de favorecer la transformación tumoral. Cuantos más años de vida haya fumado una persona y sobre todo en edad temprana, ésta puede ser susceptible a desarrollar cáncer, debido a que la dosis de sustancias carcinógenas se vuelven acumulativas. Aunque el abandono del tabaquismo reduce el riesgo de contraer cáncer de pulmón, no lo reduce a los niveles de quienes nunca fumaron. En los fumadores se producen alteraciones estructurales y funcionales en el epitelio bronquial (alteración de los cilios, hiperplasia mucosa con metaplasia escamosa, etc.) que pueden tardar años en desaparecer una vez que se ha abandonado el hábito, inclusive, hasta más de 10 años [29].

Se considera que los fumadores pasivos, son aquellas personas expuestas al humo de tabaco del ambiente y/o al humo exhalado por un fumador activo. Para que tal exposición resulte significativa, es necesario generalmente, que ésta tenga lugar en espacios cerrados. Se sabe que las personas fumadoras pasivas presentan alteraciones genéticas similares a las encontradas en los fumadores activos y que los llamados marcadores biológicos de exposición al humo de tabaco ambiental como la cotinina, se pueden encontrar en esas personas a concentraciones más altas que en la población no expuesta [30]. Cerca del 40% de niños y adultos inhalan involuntariamente humo de tabaco en su domicilio, centro de trabajo o lugares públicos [30, 31]. Algunos autores indican que casi la cuarta parte de los casos de cáncer de pulmón que tienen lugar en no fumadores pueden ser atribuidos al tabaquismo pasivo [32].

En las personas no expuestas al humo del tabaco, la aparición del cáncer de pulmón es el resultado de una combinación de factores genéticos y la exposición a carcinógenos del entorno, los cuales, que pueden dar origen a este tipo de malignidad [33]. El grupo de agentes carcinógenos que se pueden encontrar en el ambiente son de diversa naturaleza y

se pueden asociar a la carcinogénesis del cáncer pulmonar. (Tabla 1). El incremento de riesgo a padecer cáncer se incrementa en la medida que aumenten los años de exposición a éstos agentes, y de manera especial cuando coexiste el tabaquismo.

Sobre el riesgo y población expuesta, parece muy probable que el asbesto, las radiaciones ionizantes y el humo de tabaco ambiental, sean los agentes que en mayor medida puedan inducir la aparición de esta neoplasia en los trabajadores[34]. Estos y otros agentes nocivos se han asociado al desarrollo de aproximadamente al 10% de los tumores diagnosticados en hombres y mujeres [32]

Tabla 1- *Agentes nocivos del medio ambiente y laboral asociados a cáncer pulmonar.*

Arsénico
Asbesto
Berilio
Eter clorometílico
Eter bisclorometílico
Cadmio
Cromo
Gas mostaza
Humo de tabaco ambiental
Níquel
Radón
Sílice cristalina
2,3,7,8- Tetraclorodibenzo-para-diosina
Carbón bituminoso, alquitranes (H. A. Policíclicos)
Aceites minerales
Hollín
Ácidos inorgánicos fuertes conteniendo ácido sulfúrico

**H. A. Policíclicos: hidrocarburos aromáticos policíclicos*

En la práctica sin embargo, no resulta sencillo conocer de una manera precisa cuál es el papel que juega cada uno de los carcinógenos, dado que los estudios que lo evalúan presentan con relativa frecuencia diversas limitaciones, entre las que destacan:

- a) La dificultad para diferenciar los efectos de los carcinógenos a los que están expuestos simultáneamente y para medir la intensidad y duración de la exposición a lo largo de la vida laboral.
- b) La combinación de riesgos cuando se añade el consumo de tabaco.
- c) El largo periodo que transcurre entre la exposición y la aparición del tumor, y
- d) La escasez de información, en general, por parte de las empresas, de los riesgos a los que los trabajadores están sometidos.

Tales limitaciones indican el cuidado que se debe tener a la hora de comparar los índices de riesgo que puedan presentar estudios distintos. Conviene en cualquier caso, tratar de resolver estas dificultades, ya que la identificación de los agentes carcinogénicos permitirá llevar a cabo las necesarias medidas preventivas y/o compensatorias correspondientes.

1.2.3 Clasificación de Cáncer de Pulmón

Según la localización, el cáncer de pulmón puede dividirse en *Cáncer de pulmón central* para aquellos tumores que aparece a nivel de bronquios principales, lobares y segmentarios correspondiendo a la primera, segunda y tercera generación respectivamente, hasta los de cuarta generación, es decir, preferentemente en y alrededor del hilio pulmonar. El origen traqueal es raro y prácticamente no presenta sintomatología bronquial y son accesibles con el broncoscopio. Cerca del 75% de los casos en este tipo de cáncer incluye a lo subtipos epidermoide y carcinoma indiferenciado de células pequeñas.

Y como *Cáncer de pulmón periférico*, aquel que aparece a partir de los bronquios de quinta generación, los cuales no son accesibles con el broncoscopio y principalmente se presentan en forma de adenocarcinoma. Este tipo de cáncer pulmonar rara vez llega a localizarse en áreas muy alejadas, junto a la pleura.

1.2.3.1 Clasificación histopatológica

El cáncer de pulmón se clasifica según su función y apariencia en dos tipos principales: el cáncer pulmonar de células pequeñas (microcítico) y el de células no pequeñas (no microcítico) [35]. Esta clasificación está basada en criterios histológicos y tiene importantes implicaciones para el tratamiento y el pronóstico de la enfermedad. El diagnóstico temprano del cáncer de pulmón es la condición principal para el éxito en su tratamiento. En estadios tempranos éste puede ser tratado en alrededor del 20% de los casos, mediante resección quirúrgica con éxito de curación. Sin embargo, debido a su invasividad y a la dificultad para su detección precoz, en la mayoría de los casos diagnosticados ya se ha presentado metástasis; el cáncer de pulmón presenta, junto con el cáncer de hígado, páncreas y esófago, los pronósticos peores, con una esperanza de vida promedio de aproximadamente 8 meses [6].

1.2.3.1.1 Cáncer pulmonar de células no-pequeñas. (CPNM)

Los carcinomas pulmonares de células no-pequeñas se agrupan debido a que su pronóstico y tratamiento son muy similares. Existen tres subtipos principales: el carcinoma de células escamosas, los adenocarcinomas y el carcinoma de células grandes. Menos de la tercera parte de todos los carcinomas de pulmón corresponde con un carcinoma de células escamosas y por lo general éstos comienzan cerca de un bronquio central. Aquellos tumores de células escamosas bien diferenciadas suelen crecer más lentamente que los otros tipos de cáncer.

Los adenocarcinomas representan el principal de todos los tipos de cáncer de pulmón. Por lo general se originan del tejido pulmonar periférico y la mayoría de los casos de adenocarcinoma de pulmón están asociados a los productos de combustión.

También en aquellos sujetos que nunca han fumado, el adenocarcinoma es la forma más frecuente de cáncer de pulmón [33]. Uno de los subtipos de adenocarcinomas, el carcinoma bronquioloalveolar, se ve con más frecuencia entre mujeres que nunca han fumado y generalmente muestra respuestas diferentes al tratamiento de un individuo al otro. Los carcinomas de células gigantes representan aproximadamente una décima parte de todas las formas de cáncer de pulmón. Son tumores que crecen con rapidez cercanos a la

superficie del pulmón. A menudo son células pobremente diferenciadas y tienden a invadir y provocar metástasis de manera rápida [33].

1.2.3.1.2 Carcinoma de células pequeñas (CPM)

El cáncer de pulmón de células pequeñas es mucho menos frecuente y tiende a aparecer en las vías aéreas de mayor calibre como en los bronquios primarios y secundarios, llegando a formar rápidamente un gran tamaño. Estos tumores malignos están constituidos por células pequeñas, con escaso citoplasma y cromatina finamente granular, con nucléolo pequeño o poco aparente. La necrosis es extensa y los eventos de mitosis son altamente frecuentes. Además suele presentar adenopatías mediastínicas y colapso lobar. En la mayoría de las ocasiones se observan masas perihiliares blandas de color blanco-marrón. Tan solo un 5% de este tipo de cáncer pulmonar es de carácter periférico [36].

El carcinoma de células pequeñas se caracteriza por presentar células en forma de hojuelas de avena que contienen gránulos neurosecretorios densos, es decir, vesículas con hormonas neuroendocrinas y que se asocian con un síndrome endocrino o paraneoplásico. Como una neoplasia de carácter neuroendocrino el CPM puede mostrar crecimiento en nidos o trabéculas, con formación de rosetas, no obstante, también es frecuente el crecimiento difuso. Las células tumorales tienen núcleos de formas variadas con escaso citoplasma y con tendencia al moldeamiento. La excesiva tendencia a estar diseminado en el momento del diagnóstico solía limitar la utilidad del sistema TNM para su estadificación y se definía como enfermedad limitada versus enfermedad diseminada [36], sin embargo en la actualidad este sistema ya es empleado para estadificar también a este tipo de cáncer pulmonar[37].

1.2.4 Estadificación y Diagnóstico

El objetivo de la estadificación es determinar el tipo y estado de avance de la enfermedad así como el grado de diseminación. La clasificación anatómica TNM-estadios permite una descripción estandarizada de los tumores pulmonares, una comparación de resultados entre distintos estudios clínicos y la ubicación de los pacientes en estadios clínicos específicos. Este sistema determina el tamaño del tumor primario (T), la afectación de ganglios linfáticos (N) y la presencia de metástasis a distancia (M) [37].

Para alcanzar el éxito en esta estrategia, la estadificación TNM que sugiere la IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer) es el modelo común que se aplica a nivel global hoy en día. Este comité internacional de estadificación creado por el International Union Against Cancer (UICC) y el American Joint Committee on Cancer (AJCC) reúne y actualiza los datos de diversos centros en el mundo que comparten sus estadísticas regionales. Así, la séptima y última edición TNM de la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón IASLC comprende la información retrospectiva de 100,869 pacientes diagnosticados entre 1990 y 2000, seguidos clínicamente por 5 años y provenientes de 45 fuentes distintas en 20 países, incluido México. De estos pacientes 68,463 cumplieron con los criterios de calidad suficientes para ser analizados como cáncer pulmonar no microcítico y 13,032 como cáncer pulmonar microcítico. En total 81,495 pacientes recibieron los siguientes tratamientos: cirugía 41%, quimioterapia 23%, radioterapia 11%, y el 25%, combinaciones de los anteriores [37].

Los hallazgos del estudio que pudieran constituir recomendaciones para cambiar algún componente T, N o M fueron validados internamente (por región geográfica y tipo de base de datos) y externamente con enfermos del registro Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) estadounidense. Estas actualizaciones de la última edición se describen a continuación.

➤ Componente T

Este componente hace referencia a la extensión y tamaño del tumor primario. En el cual se comparó la supervivencia a 5 años de los pacientes con tumores T2 >7cm frente a la de los de tumores T3. Se encontraron cifras similares en las diferentes poblaciones, excepto en los casos N0 con resección completa, en los cuales se comprobó que la supervivencia era incluso superior en los T3 (41%) que en los T2 >7cm (35%), por lo que se decidió reclasificar a estos últimos como T3 (tabla 2). Cuando se analizaron los tumores que, con estadificación patológica, presentaban nódulos adicionales pudo apreciarse que: la supervivencia a los 5 años era en los T3 (31%) similar a la de los T4 clasificados como tal por la existencia de nódulos adicionales en el mismo lóbulo del tumor primario (28%), que los T4 por diseminación pleural que tienen un pronóstico claramente peor (11% de supervivencia a los

5 años). Se aconsejó, por tanto, para la nueva clasificación, considerar T3 a los tumores con nódulo/s adicional/es en el mismo lóbulo del tumor primario, considerar T4 a los tumores con nódulo/os adicional/es en un lóbulo homolateral diferente al del tumor primario, e incluir en la categoría M a los tumores con diseminación pleural (tabla 2).

➤ Componente N

En el componente N que refiere a la afectación de ganglios linfáticos regionales se confirmó la disminución de la supervivencia a medida que aumentaba la afectación ganglionar, encontrando diferencias significativas en la supervivencia a los 5 años, sin embargo, estos hallazgos no pudieron ser validados por áreas geográficas ni categorías T, por lo que no se recomendaron cambios relativos al componente N para la nueva clasificación[38].

➤ Componente M

Este componente hace referencia a la presencia o ausencia de metástasis a distancia. En este sentido, las metástasis hepáticas aisladas no son frecuentes en el CPNM, pero sí en el CPM. Las glándulas suprarrenales son lugares frecuentes de metástasis, aunque su diferenciación con adenomas benignos a menudo exige la obtención de muestra citohistológica. Por ello, se suelen realizar en una misma exploración la tomografía computarizada (TC) de tórax y de abdomen superior. Los pacientes estudiados presentaron las siguientes tasas de supervivencia respectivamente a 1 y 5 años: T4 cualquier NM0, 53 y 16%; diseminación pleural, 45 y 6%; nódulos pulmonares contralaterales, 46 y 3%, y metástasis a distancia, 22 y 1%. Con tales referencias se decidió subdividir el componente M en M1a (presencia de diseminación pleural o nódulos pulmonares contralaterales) y M1b (metástasis a distancia) (tabla 2).

Tabla 2.- Sistema internacional de estadificación TNM-estadios

DESCRIPTORES TNM
<p>T (Tumor Primario)</p> <ul style="list-style-type: none"> • TX Tumor primario que no puede ser evaluado, o tumor probado por la existencia de células tumorales malignas en esputo o lavados bronquiales pero no visualizado por métodos de imagen o broncoscopia • T0 Sin evidencia de tumor primario • Tis Carcinoma <i>in situ</i> • T1 Tumor ≤3 cm en su mayor diámetro, rodeado por pulmón o pleura visceral, sin evidencia broncoscópica de invasión más proximal del bronquio lobar (es decir: no hay invasión en el bronquio principal)^a • T1a Tumor ≤2 cm en su mayor diámetro • T1b Tumor >2cm pero ≤3 cm en su mayor diámetro • T2 Tumor >3cm pero ≤7 cm en su mayor diámetro o tumor con cualquiera de las siguientes características (Los tumores T2 con estas características se clasificarán como T2a si su diámetro es ≤5cm): afecta al bronquio principal, distante 2 cm o más de la carina principal; invade la pleura visceral; asociado con atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende hasta la región hiliar pero no afecta al pulmón entero • T2a Tumor >3cm pero ≤5 cm en su mayor diámetro • T2b Tumor >5cm pero ≤7 cm en su mayor diámetro • T3 Tumor >7cm o de cualquier tamaño que invada directamente cualquiera de las siguientes estructuras: pared torácica (incluyendo los tumores del sulcus superior), diafragma, nervio frénico, pleura mediastínica, pericardio parietal; o un tumor a menos de 2 cm de la carina principal pero sin invadirla; o asociado a atelectasia o neumonitis obstructiva del pulmón entero o existencia de nódulo(s) tumoral(es) separado(s) del tumor primario, en su mismo lóbulo • T4 Tumor de cualquier tamaño que invade cualquiera de las siguientes estructuras: mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio recurrente laríngeo, esófago, cuerpo vertebral, carina; o existencia de nódulo(s) tumoral(es) separado(s) del tumor primario, en un lóbulo diferente del pulmón homolateral
<p>N (ganglios linfáticos regionales)</p> <ul style="list-style-type: none"> • NX Los ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados • N0 No existen metástasis ganglionares linfáticas regionales • N1 Metástasis en ganglios linfáticos peribronquiales homolaterales y/o hiliares homolaterales e intrapulmonares, incluyendo la afectación por extensión directa • N2 Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos homolaterales y/o subcarinales • N3 Metástasis ganglionares linfáticas mediastínicas contralaterales, hiliares contralaterales, escalénicas homolaterales o contralaterales, o supraclaviculares
<p>M (metástasis a distancia)</p> <ul style="list-style-type: none"> • MX Las metástasis a distancia no pueden ser evaluadas • M0 No existen metástasis a distancia • M1 Existen metástasis a distancia • M1a Existencia de nódulo(s) tumoral(es) separado(s) del tumor primario, en un lóbulo del pulmón contralateral; tumor con nódulos pleurales o derrame pleural (o pericárdico) malignos. • M1b Existen metástasis a distancia

Continuación Tabla 2

Estadios			
Carcinoma Oculto	TX	N0	M0
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA	T1 a,b	N0	M0
Estadio IB	T2 a	N0	M0
Estadio IIA	T1 a,b	N1	M0
	T2 a	N1	M0
	T2 b	N0	M0
Estadio IIB	T2 b	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadio IIIA	T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
	T4	N0, N1	M0
Estadio IIIB	T4	N2	M0
	Cualquier T	N3	M0
Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M1a, b

(Tabla desde Groome, P.A., et al., J. Thorac. Oncol. The IASLC Lung Cancer Staging Project: validation of the proposals for revision of the T, N, and M descriptors and consequent stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours. 2007)

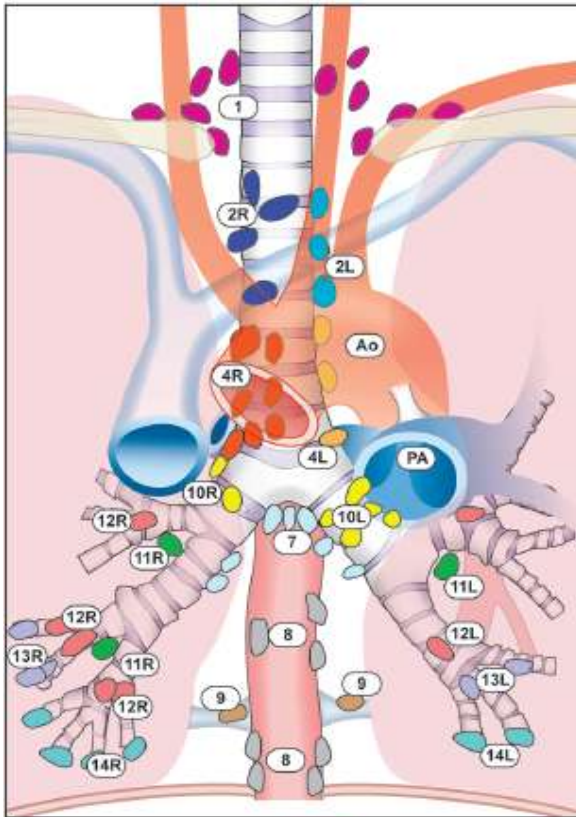
Para la agrupación de estadios en esta nueva versión de la AISLC también se llevó a cabo un sofisticado estudio estadístico con los 17,726 pacientes cuyos tumores estaban mejor estadificados [39]. Se obtuvieron las diferentes curvas de supervivencia de cada estadio, que sin solaparse entre ellas, presentaban peores cifras a medida que aumentaba la extensión tumoral.

El Comité Internacional de Estadificación ha constatado que la supervivencia de los pacientes con carcinomas de células pequeñas y tumores carcinoides empeoraba a medida que las categorías T y N son más altas [40]. También se comprobó que excepto en el estadio IIA, que contaba solo con 55 pacientes para analizar, la supervivencia a 5 años empeoraba cuando progresaba el estadio. En base a esto se ha confirmado la propuesta para emplear el sistema TNM con el fin de estadificar al cáncer pulmonar microcítico. A pesar de que la anterior clasificación TNM especificaba que no era aplicable a los tumores

carcinoides, diversos estudios la han empleado, encontrando diferencias pronósticas entre los estadios. También la IASLC ha comprobado que los sujetos clasificados en el estadio I vivían significativamente más que los del estadio II, y estos, significativamente más que los de los estadios III/IV, por lo que se recomienda la nueva clasificación TNM de 2009 para describir la extensión de estos tumores [41].

La IASLC también ha propuesto un nuevo mapa ganglionar consensuado internacionalmente y de forma multidisciplinar en el que se mantienen las estaciones ganglionares de los otros mapas, pero también agrupa anatómicamente a las zonas ganglionares próximas para facilitar la clasificación ganglionar, especialmente en los pacientes que no serán intervenidos [37]. En este mapa, todas las estaciones ganglionares están definidas por límites anatómicos precisos, fáciles de reconocer por técnicas de imagen y por inspección durante las exploraciones invasivas o la toracotomía. Las innovaciones de este mapa ganglionar son: • La creación de una zona ganglionar supraclavicular, • La ampliación de la estación ganglionar subcarínica. • La incorporación de límites precisos para la estación número 10, la hiliar, • La traslación de la línea media del mediastino superior desde la línea media anatómica traqueal al margen paratraqueal izquierdo (Figura 6).

Durante los últimos años se han incorporado a la práctica clínica nuevos procedimientos, entre los que cabe destacar la tomografía de emisión de positrones aislada (PET por sus siglas en ingles) o integrada con la tomografía computarizada (PET/TC), y los nuevos métodos endoscópicos para la obtención de muestras ganglionares o de otros órganos: ultrasonografía endobronquial (EBUS por sus siglas en ingles) y esofágica (EUS por sus siglas en ingles) [42].



Supraclavicular zone

- 1 Low cervical, supraclavicular, and sternal notch nodes

Superior Mediastinal Nodes

Upper zone

- 2R Upper Paratracheal (right)
- 2L Upper Paratracheal (left)
- 3a Pre-vascular
- 3p Retrotracheal
- 4R Lower Paratracheal (right)
- 4L Lower Paratracheal (left)

Aortic Nodes

AP zone

- 5 Subaortic
- 6 Para-aortic (ascending aorta or phrenic)

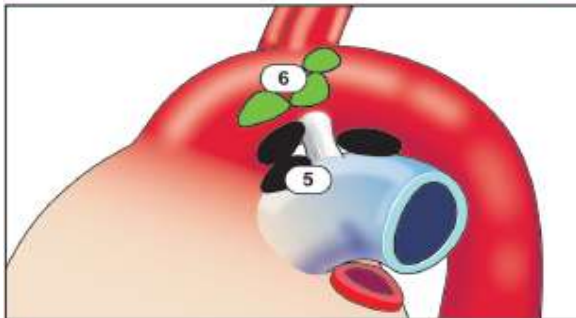
Inferior Mediastinal Nodes

Subcarinal zone

- 7 Subcarinal

Lower zone

- 8 Paraesophageal (below carina)
- 9 Pulmonary ligament



N₁ Nodes

Hilar/Interlobar zone

- 10 Hilar
- 11 Interlobar

Peripheral zone

- 12 Lobar
- 13 Segmental
- 14 Subsegmental

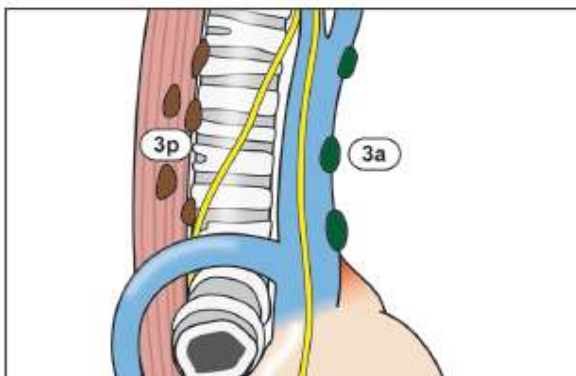


Figura 6. Mapa de invasión ganglionar recomendado por la "American Cancer Society". (Imagen desde Rusch, V.W., et al., J. Thorac. Oncol. The IASLC lung cancer staging project: a proposal for a new international lymph node map in the forthcoming seventh edition of the TNM classification for lung cancer. 2009.)

1.2.4.1 Procedimientos de estadificación.

Dentro de los procedimientos no invasivos, los síntomas y signos clínicos, la radiografía de tórax, la anamnesis y la exploración física detalladas pueden aportar datos de gran valor sobre el grado de extensión de la enfermedad, que permitirían una simplificación sustancial de las pruebas a realizar posteriormente: así, la disfonía, el síndrome compresivo de la vena cava superior, el síndrome de Horner o el dolor torácico a menudo reflejan la invasión de estructuras anatómicas adyacentes al pulmón que suelen contraindicar un tratamiento quirúrgico. Igualmente, los síntomas neurológicos o el dolor óseo intenso y persistente deben hacer sospechar la existencia de metástasis a distancia, que tendrían implicaciones pronósticas y terapéuticas relevantes.

La radiografía de tórax es habitualmente la primera prueba que permite sospechar con alta probabilidad la existencia de cáncer pulmonar. Esta prueba puede detectar derrame pleural y la destrucción de vértebras o costillas, lo que permite aproximar el grado de extensión y simplificar notablemente el proceso de estadificación.

La tomografía computarizada (TC) de tórax después de la radiografía, suele ser la prueba de imagen que proporciona la información necesaria en el proceso de estadificación. Su rendimiento y limitaciones en el diagnóstico del cáncer pulmonar es ampliamente conocido [43]. En relación con el tumor primario (T), la TC sigue siendo el mejor método para el estudio anatómico global del tórax. Permite obtener una información detallada sobre el tamaño, la localización, las relaciones anatómicas con estructuras vecinas y puede detectar nódulos de tamaño muy pequeño, habitualmente no detectables mediante radiografía de tórax. Sin embargo, las limitaciones en el rendimiento diagnóstico de la (TC) dificultan una correcta estadificación, obligando a confirmar los hallazgos mediante otras pruebas más fiables (Figura 7).

La Tomografía por Emisión de Positrones PET en su modalidad diagnóstica, se basa en la identificación de una mayor actividad metabólica característica de las células neoplásicas, la cual, aporta información relevante sobre la biología del tumor, pero su capacidad de resolución espacial es menor que la de la TC. El desarrollo de la PET/TC, que integra en una única exploración las imágenes de ambos procedimientos, mejora la eficacia diagnóstica[44].

En la búsqueda de metástasis extratorácica una evaluación clínica cuidadosa continúa siendo el mejor método para la predicción de metástasis. Síntomas inespecíficos, como pérdida de peso, astenia, dolores osteomusculares u otros más específicos, como cambios sutiles del humor o leve pérdida de fuerza en un miembro, así como alteraciones bioquímicas o hematológicas no explicadas por otro motivo (hipercalcemia, hipoalbuminemia, anemia, etc.), se asocian con la presencia de metástasis. Las pruebas de imagen para diagnóstico estarán dirigidas por la localización de los síntomas o signos presentes. En cuanto al diagnóstico de metástasis cerebrales, se realiza una TC o resonancia magnética (RM) craneal ante cualquier síntoma o signo neurológico sospechoso, así como en pacientes con estadio III asintomáticos en los que se considere la posibilidad de tratamiento agresivo (cirugía o radioterapia torácica)[45].

Se recomienda el uso de RM torácica en algunas circunstancias debido a su superioridad sobre la TC para evaluar la invasión del plexo braquial, los vasos mediastínicos o el cuerpo vertebral, de modo que la exactitud diagnóstica para evaluar la extensión del tumor puede llegar hasta el 94%, frente al 63% de la TC [43] (Figura 7).

Los procedimientos de estadificación invasivos no quirúrgicos son la exploración endoscópica, tanto digestiva como respiratoria, que permite obtener una muestra citohistológica de los ganglios mediastínicos a partir de la punción aspirativa con aguja fina (PAAF por sus siglas en ingles). La punción transbronquial puede realizarse de dos formas: a ciegas ó ecodirigida en tiempo real (EBUS, por sus siglas en ingles). La punción transbronquial a ciegas suele presentar los rendimientos diagnósticos más bajos, dentro de estos procedimientos de estadificación, ya que en base a criterios de costo-efectividad, esta punción es menos recomendable que las técnicas ecoendoscópicas y la mediastinoscopia (MED) [42]. La PAAF transesofágica (EUS-PAAF) se realiza con control ultrasonográfico en tiempo real. En un estudio aleatorizado comparativo entre MED y EUS- PAAF, se demuestra que esta última alternativa reduce significativamente el número de toracotomías innecesarias [46]. La combinación de EUS-PAAF y EBUS-PAAF permite un acceso complementario a todas las estaciones ganglionares mediastínicas y ha demostrado ser mejor opción costo-efectiva (Figura 7). Los estudios indican que se debe considerar negativo el resultado de la ecoendoscopia cuando no se evidencie malignidad después de 3

punciones con presencia de linfocitos en el examen citológico peroperatorio. Asimismo, si la muestra está contaminada, es necrótica, insuficiente o hemática, debería considerarse como indeterminada, y la negatividad para células malignas habría de confirmarse mediante técnicas quirúrgicas. Finalmente los procedimientos de estadificación mediante técnicas quirúrgicas incluyen la mediastinoscopia (MED), la mediastinotomía (MEDTM), la mediastinoscopia cervical extendida (MEDCE) y videotoracoscopia.

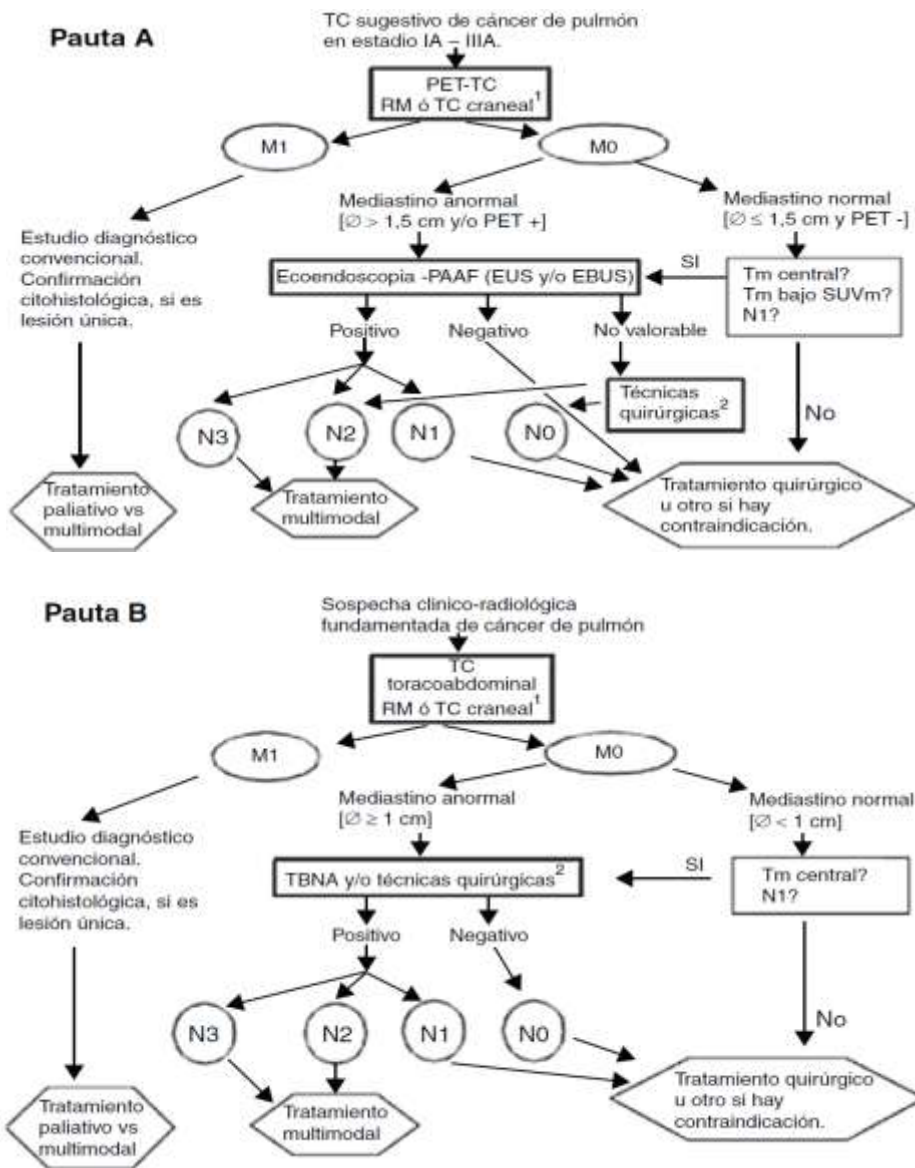


Figura 7. Pautas de estadificación del cáncer de pulmón. A) RM craneal para pacientes candidatos a tratamiento radical en estadio III. B) Técnicas quirúrgicas: se incluyen mediastinoscopia, mediastinotomía, mediastinoscopia cervical extendida, toracoscopia, linfadenectomía mediastínica transcervical extendida (TEMLA) y linfadenectomía mediastínica videoasistida (VAMLA). Notas: a) Se considerará negativo el resultado de la EBUS solo si, después de al menos tres punciones con presencia de linfocitos, no se observan células malignas. b) La pauta B puede ser aceptable en los centros sin accesibilidad a PET, EBUS ni EUS. c) El límite de 1 cm (pauta B) es el empleado tradicionalmente.

1.2.4.2 Estadificación patológica

Por otra parte una correcta clasificación patológica tumoral y ganglionar es muy importante para proporcionar un pronóstico, indicar el tratamiento adyuvante y llevar a cabo comparaciones en estudios clínicos. Es por eso que la estadificación patológica quirúrgica debe valorar de manera definitiva la afectación tumoral y ganglionar. En donde para la primera se deben incluir la localización parenquimatosa o endobronquial (si el bronquio es principal, lobar o segmentario) y su relación con la pleura, el diámetro mayor, la descripción (forma, color, delimitación, cavitación), la extensión anatómica: afectación bronquial, invasión vascular, invasión pleural visceral o la menor distancia a la pleura visceral, relación con márgenes, especificando la distancia menor (bronquial, vascular, superficie del parénquima resecado, tejidos adheridos), y la presencia de otros nódulos tumorales [47].

Mientras que para la estadificación ganglionar intraoperatoria impacta directamente en el pronóstico del tratamiento adyuvante, también se considera un elemento clave para considerar una cirugía completa y un requerimiento esencial en el control de calidad de la cirugía. Las técnicas utilizadas para clasificar esta afectación durante la cirugía van desde la simple inspección hasta la linfadenectomía bilateral en bloque [48].

1.2.4.3 Estadificación molecular del cáncer de pulmón

La presencia de metástasis ganglionares es uno de los factores pronósticos más importantes en el cáncer de pulmón no microcítico. Dentro del 30 al 40 % de los pacientes sin afectación ganglionar aparente, en el momento de la cirugía presentan enfermedad recurrente y fallecen por este motivo [49]. Esta subestadificación probablemente resulta de la existencia de células tumorales ocultas imposibles de detectar por los métodos de imagen o histopatológicos habituales, así, se acepta el término micrometástasis como un foco de células tumorales entre 0,2 y 2 mm de diámetro, siendo habitualmente detectable mediante inmunohistoquímica [49].

La introducción de nuevas tecnologías como la RT-PCR, los microarreglos, la inmunoprecipitación de la cromatina, entre otros, hacen posible analizar mutaciones específicas o alteraciones epigenéticas que pueden establecer biomarcadores que permitan identificar la presencia y comportamiento de células neoplásicas [49].

Un ejemplo son los análisis sobre el ADN extraído del ganglio linfático en donde la mínima cantidad de tejido, una mayor sensibilidad de detección y menores costos son algunas de las ventajas del uso de RT-PCR frente a la inmunohistoquímica. En diversos estudios se han analizado los valores de distintos biomarcadores en muestras de ganglios extraídos quirúrgicamente [50, 51]. La presencia de metilación o de ciertas mutaciones en los genes estudiados está relacionada con mayor frecuencia de recurrencia tumoral y con menor supervivencia global. Desafortunadamente no existe por el momento una organización internacional que establezca los parámetros adecuados para clasificar molecularmente al cáncer pulmonar debido a que no existen series largas de pacientes con seguimientos prolongados, ni estudios aleatorios que permitan afirmar con certeza que esta estadificación tenga relevancia clínica y pronóstica a escala global.

1.2.5 Tratamiento

El tratamiento del cáncer de pulmón está determinado por un grupo de médicos especializado que dependiendo del estadio y clasificación de la enfermedad diseñan una estrategia terapéutica adecuada. La resección quirúrgica (generalmente lobectomía) se considera el tratamiento de elección y la mejor esperanza para los individuos con cáncer de pulmón (Tabla 3).

Tabla 3. Procedimientos quirúrgicos en cáncer pulmonar.

SEGMENTECTOMIA	Recomendada únicamente en pacientes que se encuentran en estadios I y II médicamente no competentes para una resección mayor.
LOBECTOMIA	Cirugía mínima recomendada en cáncer pulmonar
RESECCION EN MANGUITO	Recomendada en pacientes con lesiones centrales susceptibles de conservar parénquima distal.
NEUMONECTOMIA	Se realiza en pacientes, con lesión central o localmente avanzado y con adecuada reserva pulmonar.
DISECCION GANGLIONAR OMUESTREO GANGLIONAR	Recomendada en pacientes con cáncer pulmonar como parte de la estadificación y tratamiento.

De manera general los pacientes con cáncer de pulmón pueden recibir cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia dirigida o una combinación de tratamientos (Tabla 4). La terapia contra el cáncer puede ser local, es decir, cirugía y/o radioterapia, en donde extirpan o destruyen el cáncer en el pecho. Cuando el cáncer de pulmón se ha diseminado a otras partes del cuerpo, la terapia local puede usarse para controlar la enfermedad en áreas específicas, o bien puede ser sistémica en donde se utiliza la quimioterapia y la terapia dirigida.

Sin embargo, para ser candidato viable para una resección quirúrgica, la enfermedad debe estar limitada y el individuo debe tener adecuadas reservas fisiológicas cardiacas y pulmonares.

La quimioterapia representa la medicación con fármacos potentes que circulan por todo el cuerpo para atacar a las células cancerosas. Estos fármacos pueden destruir cualquier célula de crecimiento rápido, entre ellas las células de cáncer y algunas células sanas. Los agentes quimioterapéuticos se controlan minuciosamente tanto en las dosis como en la frecuencia, de modo que se destruyan las células de cáncer con un mínimo de riesgo para las células sanas.

Tabla 4. Tratamiento sugerido para el cáncer pulmonar

	ESTADIO I	ESTADIO II	ESTADIO IIIA	ESTADIO IIIB	ESTADIO IV	ESTADIO IV	ESTADIO IV
CIRUGIA							
RADIOTERAPIA SEGUIDA DE CIRUGIA							
CIRUGIA SEGUIDA DE RADIOTERAPIA							
QUIMIOTERAPIA PREOPERATIVA Y CIRUGIA							
CIRUGIA SEGUIDA DE QUIMIOTERAPIA							
CIRUGIA CON QUIMIO Y RADIOTERAPIA							
RADIOTERAPIA RADICAL							
QUIMIOTERAPIA Y RADIOTERAPIA RADICAL							
QUIMIOTERAPIA RADICAL							
TRATAMIENTO SINTOMATICO INCLUYENDO RADIOTERAPIA PALIATIVA							

DE PRIMERA ELECCION
OPCIONAL EN ALGUNOS PACIENTES
NO RECOMENDADO

En estadios precoces, cuando el tumor no está extendido a los ganglios linfáticos ni ha producido metástasis en otros órganos, el tratamiento de elección es la resección quirúrgica del lóbulo pulmonar donde se encuentra el tumor.

En ocasiones es necesaria la (neumonectomía), lo cual suele ser bien tolerada y no produce limitaciones significativas en cuanto a la calidad de vida del paciente. El pronóstico en

estadios precoces, cuando puede resecarse todo el tumor y no hay invasión de ganglio, es muy bueno. En estos casos se puede conseguir la cura total hasta en 80% de los pacientes. En estadios avanzados III depende del equipo de oncología la conveniente intervención para disminuir el avance de la enfermedad con una calidad de vida aceptable. Para el estadio IV es preferible el optar por el tratamiento del dolor frente al avance o complicaciones en la enfermedad.

Es importante mencionar que los tratamientos sistémicos para todos los tipos de cáncer pulmonar a menudo causan daño a células y tejidos sanos. Los efectos secundarios dependen principalmente del tipo y extensión del tratamiento. Los efectos secundarios pueden no ser los mismos para cada paciente y pueden cambiar durante el tratamiento que satisfaga sus necesidades médicas y personales.

Adicionalmente la TC puede detectar cambios en el tamaño tumoral que tienen lugar después del tratamiento. A este respecto, la PET y la PET/TC han demostrado recientemente mayor exactitud en la evaluación de la respuesta al tratamiento. Sin embargo, se considera esencial obtener una muestra cito-histológica de los ganglios mediastínicos después del tratamiento de inducción.

Por otra parte en la actualidad existen centros hospitalarios en el mundo que practican la medicina personalizada y que permite identificar biomarcadores moleculares y celulares para determinar con mayor efectividad el esquema de quimioterapia (Tabla 4) y el riesgo de recurrencia tumoral.

1.2.6 Inmunología del cáncer de pulmón

Como se describió en un principio el cáncer de pulmón es uno de los tipos de cáncer más agresivo y letal. Esto puede deberse en parte a una mayor efectividad del tumor para evadir la destrucción inmune y crecer rápidamente. En cáncer pulmonar de células no pequeñas se han identificado poblaciones celulares inmunes que participan en el microambiente y a nivel sistémico de gran importancia para el cuadro clínico de los pacientes. Dichas subpoblaciones suelen estar presentes en niveles variables respecto al estadio de la enfermedad y al subtipo histopatológico correspondiente. El empleo de marcadores inmunes en la estadificación y pronóstico de pacientes con cáncer, manifiesta su importancia clínica

en la actualidad involucrándose en el manejo de cáncer colorrectal y de ovario. [52] [53]. Si bien la participación de poblaciones inmunes no está bien definida en cáncer de pulmón, las evidencias indican que tienen un papel importante y han sido sugeridas para ser empleadas como biomarcadores pronósticos de invasividad, sobrevida y respuesta al tratamiento, entre otros.

Se ha descrito con anterioridad la presencia e influencia que ejercen en el microambiente tumoral las poblaciones de macrófagos asociados al tumor (TAMs; tumor associated macrophages, por sus siglas en inglés), células dendríticas inmaduras, neutrófilos asociados al tumor, linfocitos T reguladores que infiltran tumores, células supresoras de origen mieloide, entre otros. En diversos estudios estas células se asocian generalmente a un peor estado de la enfermedad y un pronóstico pobre para los [8, 54, 55]. Por otra parte, la participación predominante de poblaciones efectoras, células NK, linfocitos y células mieloides maduras con fenotipos tumoricidas pueden asociarse a mejores estados, pronósticos y respuestas [56] (figura 8).

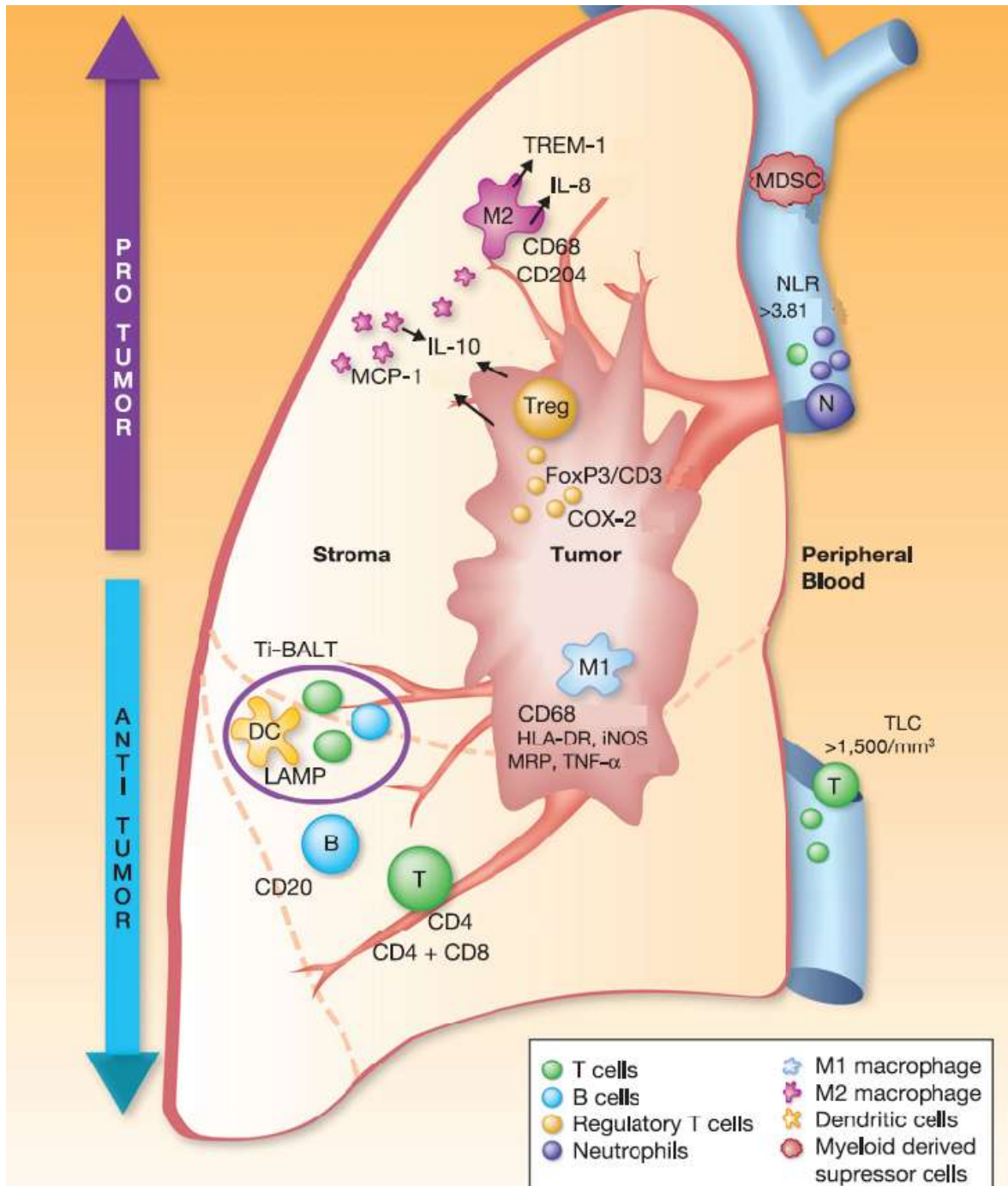


Figura 8. Eventos inmunes en Cáncer de Pulmón de Células no Pequeñas Células B y T en compañía de células dendríticas y otras poblaciones efectoras se asocian a mejores niveles de supervivencia. De manera opuesta, linfocitos Tregs, poblaciones mieloides asociadas al tumor, Células Supresoras de Origen Mielode y poblaciones inmunes maduras direccionadas a un perfil de tipo 2 promueven bajos niveles de supervivencia.

No se ha logrado establecer por completo que altos niveles de linfocitos T en el microambiente tumoral corresponden a un mejor pronóstico, ya que observaciones aisladas han sugerido la participación de éstos en la promoción del crecimiento tumoral [57] [58]. Sin embargo, se han asociado altos niveles de linfocitos a un mejor pronóstico.

Las poblaciones linfocitarias y otras poblaciones con capacidades tumoricidas se encuentran inactivadas para una destrucción potencial de células cancerosas [59], además estas células son vulnerables a los efectos adversos propios del desarrollo tumoral como la hipoxia, la manipulación vía factores solubles y a la supresión que establecen poblaciones supresoras, entre otros.

1.3 Células mieloides

Las células mieloides representan las células hematopoyéticas más abundantes en el cuerpo humano con gran variedad de funciones y fenotipos.

Estas células vigilan en todo momento el correcto funcionamiento del sistema inmune innato y adaptativo, participan en la remodelación tisular y eliminación de células muertas. Todas las células mieloides se derivan de las células madre hematopoyéticas multipotenciales (HSC) y, a través de pasos secuenciales de diferenciación se convierten en células mieloides maduras. Sin embargo, los progenitores mieloides no forman un sistema jerárquico único sino que son consideradas como una red de células que pueden diferenciarse en varios subconjuntos de células mieloides más especializadas [10] (Figura 9). Los tres grupos de células mieloides diferenciadas granulocitos, macrófagos y células dendríticas, juegan un papel crucial en el manejo de agentes patógenos que ingresan a nuestro cuerpo.

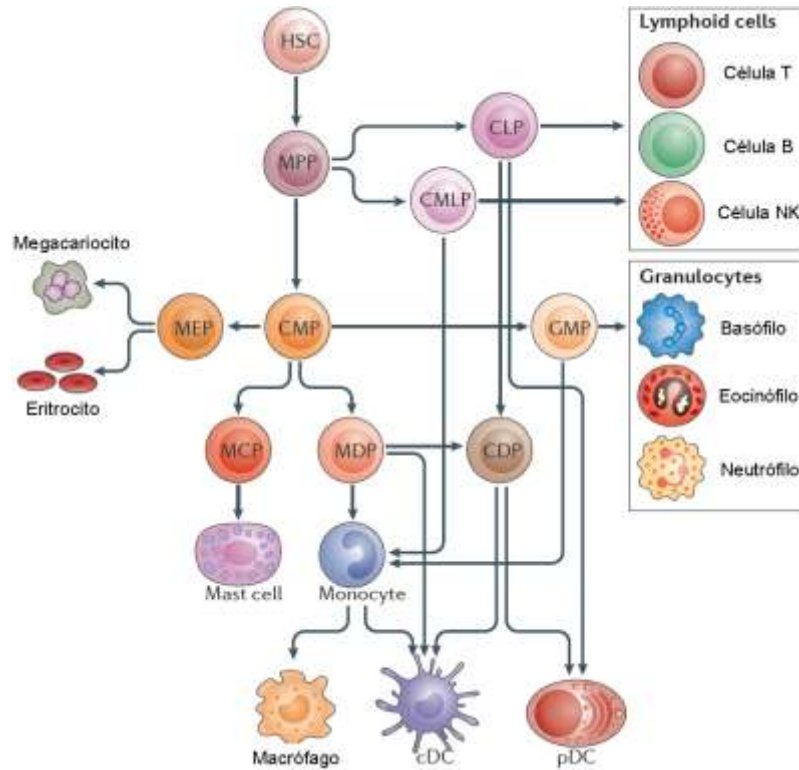


Figura 9. Diferenciación de poblaciones del sistema inmune bajo condiciones normales.

Los granulocitos son las células mieloides que se caracterizan por la presencia de gránulos citoplásmicos y una morfología nuclear específica. Éstos se clasifican en neutrófilos, eosinófilos y basófilos, teniendo los dos primeros la capacidad de fagocitar. Los neutrófilos representan la población leucocitaria más abundante del cuerpo, la cual posee una maquinaria compleja para fagocitar y destruir bacterias y ésta se conoce comúnmente como leucocitos polimorfonucleares debido a sus núcleos multilobulados. Los neutrófilos no son liberados de la médula ósea hasta que alcanzan su madurez, circulan de 7 a 10 días y migran a tejidos en donde residen por unos cuantos días. Sin embargo, se liberan precursores de neutrófilos (mielocitos y pro-mielocitos) de la medula en respuesta a muchos tipos de infecciones e inflamación.

Las células dendríticas son células mieloides diferenciadas que se especializan en el procesamiento y presentación de antígenos. Éstas se diferencian en la médula ósea a partir de diversos progenitores, en humanos los monocitos son los precursores más importantes de las DCs. Existen dos subgrupos principales de células dendríticas: las DCs convencionales y las DCs plasmocitoides (pDCs). Aunque éstas células comparten algunos

de sus progenitores comunes, su diferenciación está controlada por distintos programas genéticos y tienen diferente morfología, marcadores y funciones. Cuando las DCs se encuentran funcionalmente activas pueden estimular efectivamente la respuesta inmune debido a que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados al daño (DAMPs). Éstas se activan y responden a estímulos asociados con bacterias, virus o tejidos dañados. La activación de DCs da lugar a profundos cambios en su expresión génica, lo que resulta en una mayor expresión de moléculas co-estimuladoras y citocinas que promueven la activación de las células T así como en la sobre-regulación de los receptores de quimiocinas que impulsan la migración de las DCs a los tejidos linfoides [60]. Por otra parte las pDCs constituyen una población menor de DCs, tienen una morfología similar a la de las células plasmáticas y produce grandes cantidades de interferón gamma (IFN- γ) en respuesta a la activación de sus receptores de tipo T por ácidos nucleicos virales o ADN [61].

Los macrófagos pertenecen a un grupo de células mieloides diferenciadas que se comunican constantemente con gran variedad de células inmunes y no inmunes y su correcto funcionamiento representa una pieza clave en el establecimiento de una respuesta inmune efectiva. En humanos, los macrófagos son residentes de tejidos celulares derivados principalmente de monocitos circulantes en la sangre periférica. La población de macrófagos incluye una amplia gama de células, marcadores y funciones que son reflejo de su microambiente tisular. Su función en individuos sanos es eliminar los agentes infecciosos, promover la cicatrización de heridas y regular la inmunidad adaptativa. Aunque hay algunas diferencias entre los macrófagos de ratón y los humanos, fenotípica y funcionalmente, los macrófagos en estas dos especies son muy similares facilitando que en la actualidad se presenten grandes avances en la descripción de la biología de estas poblaciones. Se han descrito dos tipos funcionales de macrófagos, los activados clásicamente (M1) que se activan por IFN- γ y productos bacterianos y que expresan bajos niveles de IL-10 y altos de IL-12, considerándolos tumorocidas [62]. Por otra parte, los macrófagos activados por la vía alterna (M2) estimulados por las citocinas IL-4, IL-10, IL-13 y hormonas glucocorticoides, expresan altos niveles de IL-10 y bajos de IL-12; relacionándose en gran medida a la inflamación y progresión del tumoral [63].

1.3.1 Regulación de las células mieloides durante el desarrollo del tumor

Si bien la contribución de las células mieloides en la patogénesis del cáncer ha sido reconocida desde el siglo pasado, sólo durante las últimas dos décadas se ha demostrado su papel crucial en la promoción, angiogénesis tumoral, metástasis, invasión celular y alteración de la respuesta inmune [64-66]. Las evidencias indican que el microambiente tumoral altera diversas poblaciones de células mieloides y puede convertirlas en potentes células inmunosupresoras [10]. Las células mieloides están íntimamente relacionadas y funcionan como un sistema único y complejo el cual interactúa con el entorno y responde a estímulos tanto en condiciones fisiológicas como patológicas por ejemplo, la manipulación a la que se someten durante el desarrollo tumoral (Figura 10).

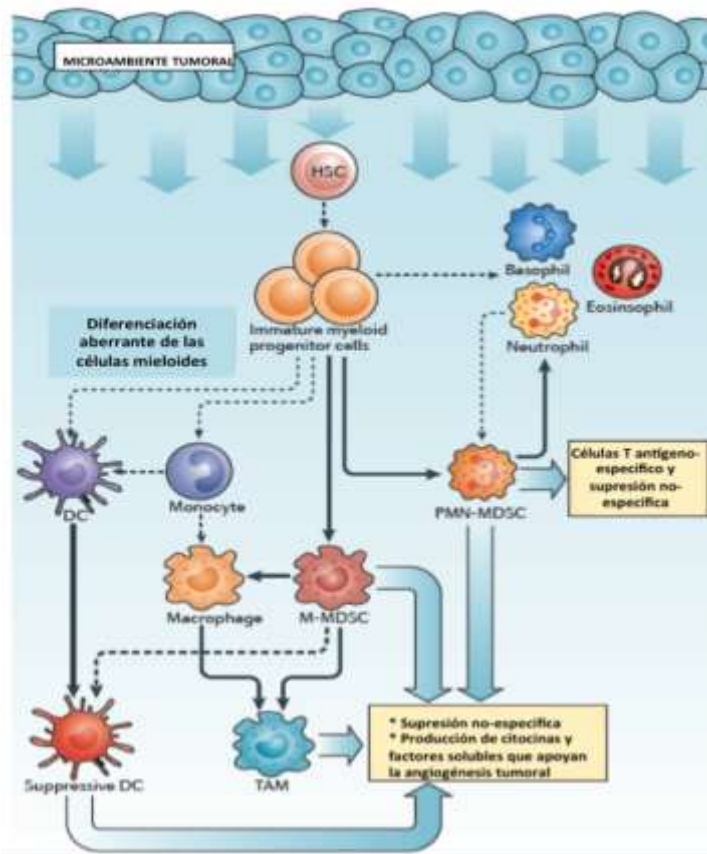


Figura 10. Cambios que ocurren en las células mieloides en cáncer. Los factores producidos en el microambiente tumoral por células tumorales y células del estroma promueven la diferenciación aberrante de las células del linaje mieloides. Las líneas punteadas muestran las vías normales de diferenciación que siguen las células mieloides a partir de un precursor mieloides inmaduro. Las líneas continuas indican las vías de diferenciación aberrantes que siguen las células mieloides durante el cáncer en las cuales el microambiente tumoral puede promover el desarrollo de poblaciones inmunosupresoras, incluidas las células supresoras de origen mieloides monocíticas M-MDSCs, células supresoras de origen mieloides polimorfonucleares PMN-MDSCs, células dendríticas supresoras DCs y macrófagos asociados a tumores TAMs. Las líneas punteadas claras ilustran vías de diferenciación sugeridas pero no confirmadas aún.

1.3.1.1 Las Células Dendríticas en el desarrollo del cáncer.

El desarrollo del cáncer afecta la función de las DCs de manera importante. Induce entre otras condiciones, la falta de estimulación adecuada para el establecimiento de una respuesta inmune, lo que contribuye potencialmente a la evasión tumoral del reconocimiento inmunológico. La mielopoyesis anormal es el mecanismo dominante responsable de las alteraciones funcionales defectos de las DCs en el desarrollo del cáncer [10].

Los resultados de una diferenciación anormal en estas células suelen ser la disminución en la producción de las DCs maduras funcionalmente competentes; aumento en la acumulación de DCs inmaduras en el sitio del tumor y aumento de la producción de las células mieloides inmaduras [67]. Se ha observado una presencia menor y función deficiente de las DCs maduras en pacientes con cáncer de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas, de páncreas, cervicouterino, hepático, prostático y glioma [68-70].

Se han asociado diversos factores solubles derivados del tumor en la diferenciación anormal de las DCs, como el VEGF, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, por sus siglas en ingles) y la interleucina-6 (IL-6), entre otros dentro del microambiente tumoral que limitan el funcionamiento normal de las DCs [55].

Dado que el microambiente tumoral se caracteriza por un estado de hipoxia, la acumulación extracelular de adenosina, el aumento en los niveles de lactato y la disminución del pH; la migración y función de las DCs resultan afectadas. El factor transcripcional inducible de hipoxia HIF-1 α (HIF1 α , por sus siglas en ingles) está sobre-regulado por las DCs en el microambiente tumoral hipóxico y se ha demostrado que induce la expresión de receptores de adenosina A2B por las DCs en humano, haciendo que éstas impulsen el desarrollo de células T colaboradoras tipo TH2, en lugar de células tipo 1. Al diferenciarse las DCs en presencia de adenosina afectan la actividad aloestimulatoria en una reacción mixta de leucocitos, expresando niveles más altos de citocinas pro-angiogénicas, pro-inflamatorias IL-6 e IL-8, el mediador inmunosupresor IL -10 y ciclooxigenasa 2 (COX2, por sus siglas en ingles), entre otras [71].

Algunas DCs en huéspedes portadores del tumor suprimen las funciones de células T fenotípicamente inmaduras y maduras [72]. Las evidencias indican que poblaciones

inmaduras de DCs que sufren alteraciones en su programa de diferenciación y que se encuentran condicionadas por el microambiente, pueden promover una tolerancia inmunológica.

De manera relevante, se ha descrito que las DCs infiltradas en tumores de próstata alteran las funciones de las células T CD8⁺ intratumorales, utilizando mecanismos inmunosupresores atribuidos anteriormente sólo a células supresoras como los TAMs y MDSCs, como la sobre expresión de arginasa-1 (ARG1) [73]. Esta clase de evidencias sugieren que los programas de inmunosupresión pueden ser compartidos por diferentes células mieloides en el cáncer.

1.3.1.2 Macrófagos en la promoción del tumor.

Se ha descrito con anterioridad que los macrófagos humanos se organizan durante el cáncer para facilitar el crecimiento tumoral. Su presencia se asocia con un peor pronóstico clínico [74], y recientemente se demostró que TAMs con genes específicos se asocian al fracaso del tratamiento primario en pacientes con linfoma de Hodgkin [75]. Estas poblaciones mieloides son similares a los macrófagos M2 y median sus efectos a través de mecanismos inmunes y no inmunes. Los mecanismos no inmunes incluyen la promoción de la angiogénesis, el facilitar la invasión de células tumorales, su participación en la metástasis, y la protección de células tumorales a la quimioterapia inducida por apoptosis [76]. Los mecanismos inmunes propios de un macrófago M1 resultan afectados por la actividad de TAMs ya que éstos eliminan a los primeros mediante el bloqueo de su activación. Acorde a esto, se ha observado que los TAMs son ineficientes como células presentadoras de antígeno y que producen quimiocinas como el ligando CC-22 (CCL22), que atraen a las células Treg inhibiendo la activación de las células T [76]. De manera similar a lo que sucede con las DCs inmaduras y las MDSCs, los TAMs tienen la capacidad de sobre expresar ARG1 [77] y más que cualquier célula mioide, privan a las células T de L-arginina necesaria para su proliferación y correcto funcionamiento.

Los microambientes presentes en las diversas áreas de los tumores humanos contienen TAMs que varían en fenotipo y función. Se han identificado diversos subconjuntos de TAMs en carcinomas, los cuales, tienen diferentes vidas medias y frecuencias relativas que varían

a medida que el microambiente tumoral evoluciona [78]. Adicionalmente los TAMs Pro-angiogénicos pueden expresar el receptor de angiopoyetina TIE2 y tienen bajos niveles de expresión de moléculas MHC de clase II, localizándose principalmente en regiones hipóxicas [79]. En humanos la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo tipo M2 está mediada directamente por el desarrollo del tumor y se sabe que el TNF (Factor de necrosis tumoral, por sus siglas en inglés) derivado de células tumorales participa parcialmente en la polarización a M2 a través de la inducción del receptor scavenger en macrófagos tipo I y II [80]. Es importante señalar que todos los subconjuntos de TAMs al igual que las DCs y granulocitos supresores que se encuentran estrechamente relacionados con el tumor comparten mecanismos biológicos que son producto del constante direccionamiento que ejerce el tumor mediante la liberación de factores solubles.

1.3.1.3 Granulocitos en la progresión del Cáncer.

Los tumores humanos se infiltran constantemente con distintos granulocitos que en la actualidad pueden ser utilizados como factores pronósticos y predictivos en la práctica clínica [12] [81]. Adicionalmente las evidencias vinculan a los granulocitos, en particular a los neutrófilos, con procesos que promueven el desarrollo tumoral como la angiogénesis, la metástasis e invasión y la supresión de la respuesta inmune [23, 54, 66].

Las células tumorales y asociadas al estroma celular atraen fuertemente a neutrófilos maduros e inmaduros mediante la expresión de quimiocinas tipo CXC y procineticina 2. En cáncer pulmonar el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, por sus siglas en inglés) producido en exceso por el tumor también recluta granulocitos pre-metastáticos hacia nichos particulares, en donde promueven la iniciación de la metástasis subsecuente [54].

Es probable que los granulocitos promuevan la angiogénesis mediante la expresión de MMP9 que induce de la sobreexpresión del factor del VEGF en tejidos neoplásicos [82]. Adicionalmente, algunos granulocitos reclutados al tumor liberan elastasa, que penetra en el compartimento endosomal de las células neoplásicas y degrada el sustrato del receptor de insulina 1 (IRS1). Esta degradación facilita la interacción entre fosfoinositol cinasa-3 (PI3K) y

el receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), promoviendo así la proliferación de células tumorales [83].

Como sucede en otras poblaciones mieloides los neutrófilos pueden presentar un fenotipo antitumoral tipo (N1) ó un fenotipo pro-tumoral (N2). En el entorno del desarrollo tumoral se ha observado un direccionamiento y reversión hacia el fenotipo N2. El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , por sus siglas en inglés), impulsa el fenotipo N2, y su bloqueo promueve un fenotipo N1 con actividad antitumoral [84].

También la proteína sérica amiloide A1 induce la expansión de poblaciones de neutrófilos secretores de IL-10 que demostraron ser capaces de suprimir la proliferación de linfocitos T CD8+ antígenos específicos en melanomas humanos [85].

1.3.2 Impacto de los mecanismos tumorales sobre las células mieloides

Las células neoplásicas y las células del estroma asociadas al tumor liberan múltiples factores solubles que perturban a las poblaciones de células mieloides. Las citocinas tales como el factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), granulocitos G-CSF y macrófagos M-CSF, el factor de células madre (SCF, también conocido como ligando KIT), el VEGF e IL-3 promueven la mielopoyesis y contribuyen en parte, a un bloqueo en la maduración de estas células [86] (Figura 11). Los factores solubles pro-inflamatorios derivados del tumor tales como la IL-1 β , IL-6, S100A8 y S100A9, así como citocinas liberadas por las células T activadas como el IFN- γ , IL-4, IL-10 y IL-13 [87] [88], inician vías inmunosupresoras que comprometen a células mieloides inmaduras a convertirse en MDSCs y a promover aún más la diferenciación de las MDSC hacia DCs y macrófagos inmunosupresores.

En este sentido, se ha demostrado que los factores derivados del tumor CCL12, ligando de quimiocina CXC5 (CXCL5), procineticina 2, S100A8 y S100A9 reclutan células mieloides inmaduras en el estroma tumoral [89] [90].

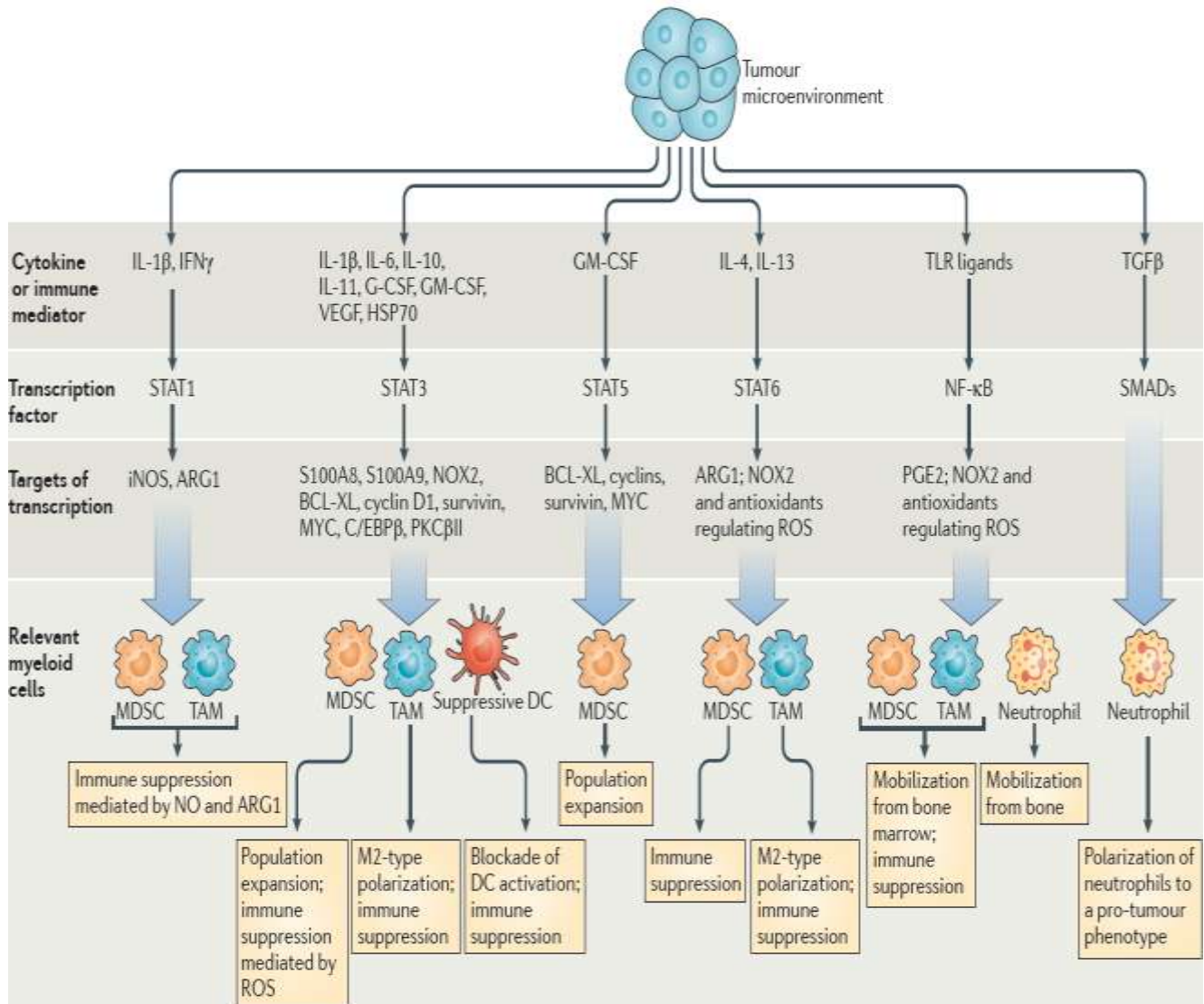


Figura 11.- Mecanismos moleculares de células mieloides afectados en cáncer. El microambiente tumoral secreta diferentes citocinas y mediadores inmunes que regulan la actividad de múltiples factores de transcripción que afectan tanto a precursores mieloides como a células mieloides maduras. Estos factores de transcripción, a su vez, regulan la síntesis de sus proteínas blanco afectando así funciones de las células mieloides. ARG1, arginasa 1; BCL-XL, linfoma XL de células B; C/EBP β , proteína de unión al enhancer CCAAT; DC, célula dendrítica; G-CSF, factor estimulador de colonias de granulocitos; GM-CSF, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos. IFN γ , interferon- γ entre otros.

Las células mieloides inmaduras también son atraídas por CCL2 nitrado o nitroacetilado por el microambiente tumoral, mientras que los linfocitos T CD8⁺ efectores no son reclutadas por CCL2 modificado, lo que puede explicar el enriquecimiento selectivo de células mielomonocíticas dentro de tumores humanos [91]. Por otra parte el TGF- β derivado del

tumor, también regula la acumulación de MDSC y promueve la polarización hacia neutrófilos supresores [92]. De manera similar la liberación al torrente sanguíneo de exosomas que contienen péptidos señal, mRNAs, microARNs y lípidos por parte de células neoplásicas y células del estroma asociadas al tumor, promueve la expansión de MDSCs [93].

Los factores solubles derivados del tumor regulan linajes celulares mieloides en múltiples niveles a través de una variedad de factores de transcripción como el transductor de señales activadoras de la transcripción 3 (STAT3, por sus siglas en inglés) que desempeña un papel importante en la regulación de las DCs, induciendo la expansión de la población de MDSCs así como alteraciones en los macrófagos [94-96] (Figura 9). Este factor transcripcional no sólo previene la apoptosis y promueve la proliferación celular mediante la sobre-regulación de factores anti-apoptóticos y pro-proliferativos como (Bcl-XL), MYC, ciclina D1 y survivin [97], sino que también regula la expresión de múltiples proteínas que son cruciales para la diferenciación de células mieloides. Adicionalmente, el incremento de las proteínas pro-inflamatorias de unión a calcio S100A8 y S100A9 regula positivamente a STAT3, lo que induce la activación de vías que afectan la diferenciación de DCs y promueven la acumulación de MDSC [98].

El factor de transcripción STAT1 inducido por la actividad de IFN- γ regula en las células mieloides la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS, por sus siglas en inglés) y es crucial para los procesos inmunosupresores ejercidos por TAMs y MDSCs [99] [9]. Adicionalmente el factor STAT6 inducido por IL-4 controla la polarización de TAMs mediante la unión al promotor del gen que codifica a la proteína 3 con dominio desmetilasa (JMJD3, por sus siglas en inglés) lo que da lugar a la desmetilación de la lisina 27 de la histona H3 en un *loci* genético específico que origina el aumento de la expresión de ARG1, YM1 y FIZZ1 promoviendo así, la polarización hacia M2 [100].

La familia receptores de linfocitos T (TLR, por sus siglas en inglés) también tiene un papel destacado en el desarrollo de células mieloides, principalmente a través de la activación de la diferenciación mioide de la proteína 88 de respuesta primaria (MyD88) y la inducción río abajo del factor nuclear- κ B (NF- κ B). Esta vía de señalización es crucial para el reclutamiento de células mieloides a sitios de infección, lesión o crecimiento del tumor [101]. Acorde con estos hallazgos los mediadores pro-inflamatorios COX2 y prostaglandina E2

(PGE2, por sus siglas en ingles), que inducen la acumulación y actividad supresora de MDSC también son blancos potenciales para la acción del NF- κ B [102] [103].

Debido a que gran parte de los estudios abordan a las células mieloides de manera independiente y a que la expresión superpuesta de marcadores celulares impide una correcta discriminación de las poblaciones, se ha generado información fraccionada que produce confusión en la comprensión de su biología y del papel que juegan durante el desarrollo tumoral. Sin embargo, la gran cantidad de hallazgos que siguen describiéndose permitirá superar los obstáculos que se presentan en el desarrollo de intervenciones terapéuticas.

Como se mencionó, el microambiente puede condicionar a las células mieloides para convertirse en poblaciones inmunosupresoras. En la actualidad este fenómeno se estudia ampliamente por distintos grupos, destacando de manera importante el efecto de la acumulación excesiva de células mieloides inmaduras [12, 13, 104]. Estas poblaciones celulares con capacidad para suprimir la respuesta antitumoral fueron etiquetadas como MDSCs porque comparten el origen mieloide y propiedades inmunorreguladoras comunes. A continuación se describen los aspectos más importantes de este complejo subgrupo de células mieloides inmunosupresoras.

1.4 Células supresoras de origen mieloide (MDSCs)

Las células supresoras de origen mieloide constituyen una población mieloide heterogénea (granulocitos, células dendríticas y macrófagos) en un estado inmaduro con capacidad de suprimir la respuesta inmune del huésped [11]. Las MDSCs pueden considerarse un elemento basal de regulación inmune natural, ya que éstas, pueden evitar el daño e inflamación que causarían poblaciones citotóxicas, después de haber eliminado al agente extraño. En este contexto las células mieloides inmaduras con fenotipo de MDSCs que se generaron en la médula ósea de individuos sanos, se diferencian en células mieloides maduras. Los factores solubles como el GM-CSF, SCF y citocinas promueven el origen de células mieloides maduras capaces de establecer una respuesta efectiva. Sin embargo, durante estados patológicos, traumas, inflamación, trasplantes y otras condiciones de estrés, estas células supresoras se expanden en medula y viajan al torrente sin haber madurado

correctamente. Como resultado de esta liberación, las MDSCs se acumulan en órganos linfoides periféricos en donde pueden expandirse y migrar a sitios blanco y torrente sanguíneo. Los efectos supresores de esta población se pueden ejercer así, sobre la respuesta inmune innata y adaptativa.

1.4.1 Contexto histórico

Las células supresoras de origen mieloides fueron descritas hace más de 20 años en pacientes con cáncer, pero su importancia funcional en el sistema inmune ha sido apreciada sólo recientemente [105]. Debido a lo heterogéneo de estas poblaciones fueron denominadas como; células supresoras naturales, células mieloides inmaduras, progenitores mieloides inmaduros o células supresoras mieloides entre otros. Dado que ninguna de estas nomenclaturas abarcaba completamente las características de este tipo de células la propuesta hecha por el Dr. Gabrilovich y sus colaboradores, este grupo designa el nombre de “*Células supresoras de origen mieloides*” [106]. Esta nomenclatura transmite mejor las propiedades de este tipo celular porque indica que pertenecen al linaje mieloides, implica la heterogeneidad del fenotipo y la plasticidad funcional y describe la naturaleza inmunosupresora de estas células.

Adicionalmente permite distinguir a esta población de otras con características inmunoregulatorias o inmunosupresoras como los macrófagos asociados a tumores y las células T reguladoras (Treg); así como de otras que simplemente no se han diferenciado, como las células mieloides inmaduras (IMCs). Esta nomenclatura es aplicable tanto en animales como en humanos. Sin embargo, como se describirá más adelante las células de humano desafortunadamente no expresan un marcador distintivo que permita su distinción absoluta.

La gran cantidad de información entorno a la biología de las MDSCs confirman, por una parte, que estas células podrían haber evolucionado como un componente regulatorio del sistema inmune, y por otra, que su función y mecanismos dirigidos por el desarrollo de neoplasias es evidente y representa un posible biomarcador de cánceres humanos.

1.4.2 MDSCs como células regulatorias.

Las MDSCs están casi ausentes en condiciones fisiológicas, y no son inmunosupresoras mientras estén en un estado inactivado. Sin embargo, en condiciones de estrés agudo, infección o inmunización, hay una expansión transitoria de la población de células mieloides inmaduras (IMCs, por sus siglas en ingles) que rápidamente se diferencia en células mieloides maduras [11].

Esta población de IMCs transitorias, puede mediar las funciones supresoras características de las MDSCs pero, debido a las condiciones agudas, son de vida corta y sus funciones de supresión tienen un impacto mínimo en la respuesta inmune en general. Sin embargo, estas células probablemente funcionan como vigías importantes, que impiden el daño patológico, mediado por la respuesta sin control del sistema inmune. El papel de las MDSCs en las infecciones crónicas y el cáncer es diferente. En esta última condición se da una prolongada y marcada expansión de MDSCs con habilidades inmunosupresoras que provoca su acumulación en órganos linfoides periféricos y su migración hacia sitios del tumor en donde ejercen su efecto o se diferencian a otras poblaciones inmunosupresoras [11]. El creciente interés por ampliar el conocimiento entorno a las células supresoras de origen mieloides permite obtener información actual de cómo se comporta esta población en diversas patologías [14]. Sin embargo, desde las últimas dos décadas la mayor parte de información e interés científico se enfoca en los efectos que causa su excesiva acumulación y expansión en el cáncer.

1.4.3 Origen de las MDSCs

Como se menciono anteriormente las células supresoras de origen mieloides que se expanden y se acumulan en condiciones patológicas, no son una población bien definida de células mieloides, sino una población heterogénea de células mieloides diferencialmente inmaduras. Estas células mieloides pueden ser parte del proceso normal de mielopoiesis, el cual tiene lugar en la médula ósea y es controlado por una red compleja de factores solubles

que incluye a GM-CSF, SCF, IL-3 y Tirosin cinasa receptora tipo 3 (FLT3, por sus siglas en inglés) (Figura 12).

Las células madre hematopoyéticas se diferencian en células progenitoras mieloides comunes y luego en células mieloides inmaduras. Normalmente las células mieloides inmaduras migran a órganos periféricos, donde se diferencian en macrófagos, células dendríticas o granulocitos. Sin embargo, los factores que son producidos durante infecciones agudas o crónicas, trauma o sépsis y en microambiente tumoral, promueven la acumulación de las células mieloides inmaduras en estos sitios, impidiendo su diferenciación e induciendo su activación. Estas células presentan funciones inmunosupresoras y por lo tanto son nombradas células supresoras de origen mieloide. Las MDSCs se acumulan también en órganos linfoides periféricos en respuesta a factores de origen tumoral. Estas células pueden también diferenciarse en TAMs dentro de un microambiente tumoral; el fenotipo y función de TAMs es distinto de aquel expresado por las MDSCs (Figura 12).

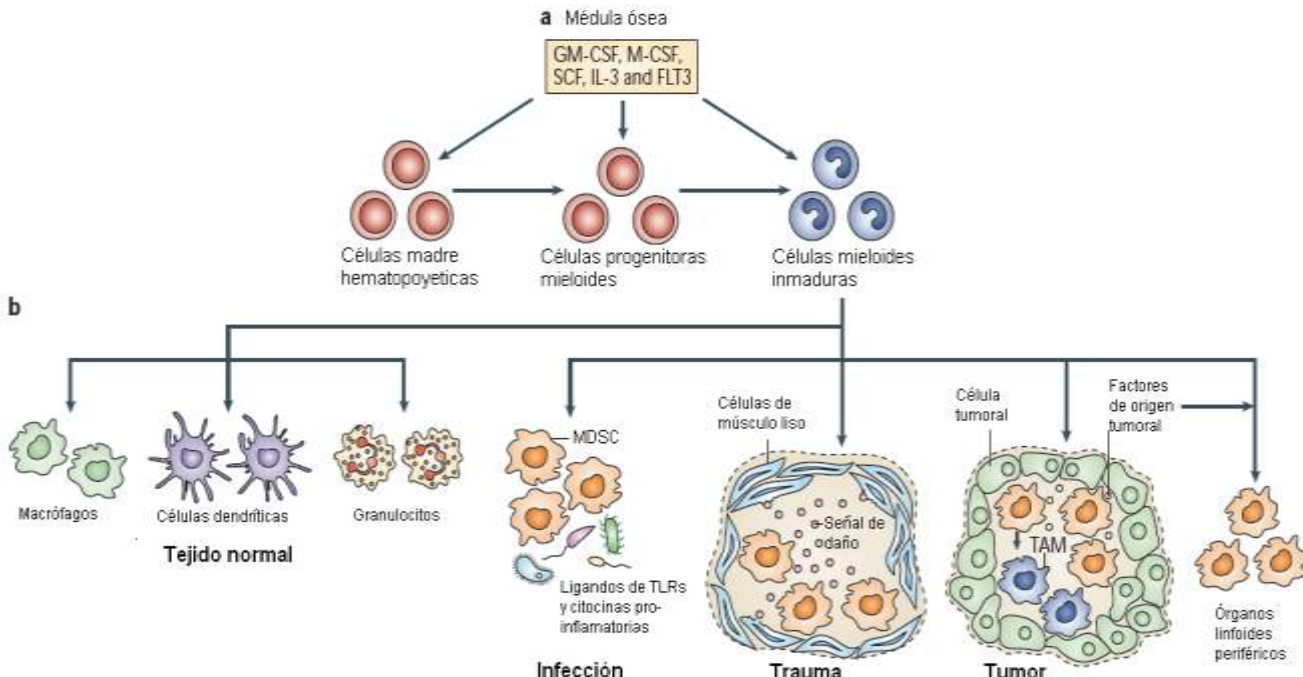


Figura 12. El origen de MDSCs. Apartir de un progenitor mieloide común las células mieloides pueden dar origen a células mieloides maduras o a MDSCs.

1.4.4 Subgrupos de MDSCs.

Dado que las células supresoras de origen mieloide carecen de la expresión de marcadores de superficie celular específicos y comparten algunos que son expresados por monocitos, macrófagos, células dendríticas y granulocitos, éstas han sido estudiadas con diversos fenotipos (Figura 13). En ratones, las células supresoras de origen mieloide están caracterizadas por la co-expresión del antígeno de diferenciación de linaje celular mieloide GR1 y CD11b lo que permite un fácil análisis y aislamiento para su estudio [92, 107].

En humanos las MDSCs han sido caracterizadas de diversas formas [14]. Éstas suelen ser identificadas como células CD14⁻CD11b⁺ y frecuentemente como células que expresan el marcador común de células mieloides CD33, que carezcan de la expresión de marcadores de células maduras, y de moléculas de MHC clase II, HLA-DR [14]. Las MDSCs también han sido identificadas dentro de una población granulocítica en sangre periférica en diversos estudios en humanos [12, 99, 108].

El uso de los anticuerpos monoclonales antes mencionados llevó a la identificación de dos subclases de células supresoras de origen mieloide: las MDSCs granulocíticas que tienen un fenotipo CD11b⁺LY6G⁺LY6Clow y aquellas con morfología monocítica con un fenotipo CD11b⁺LY6G⁻LY6Chi [109] para células de ratón. Posteriormente, en humanos también se estableció la expansión de ambas subclases que involucran diversos fenotipos debido a la limitante mencionada sobre la falta de marcadores específicos [99].

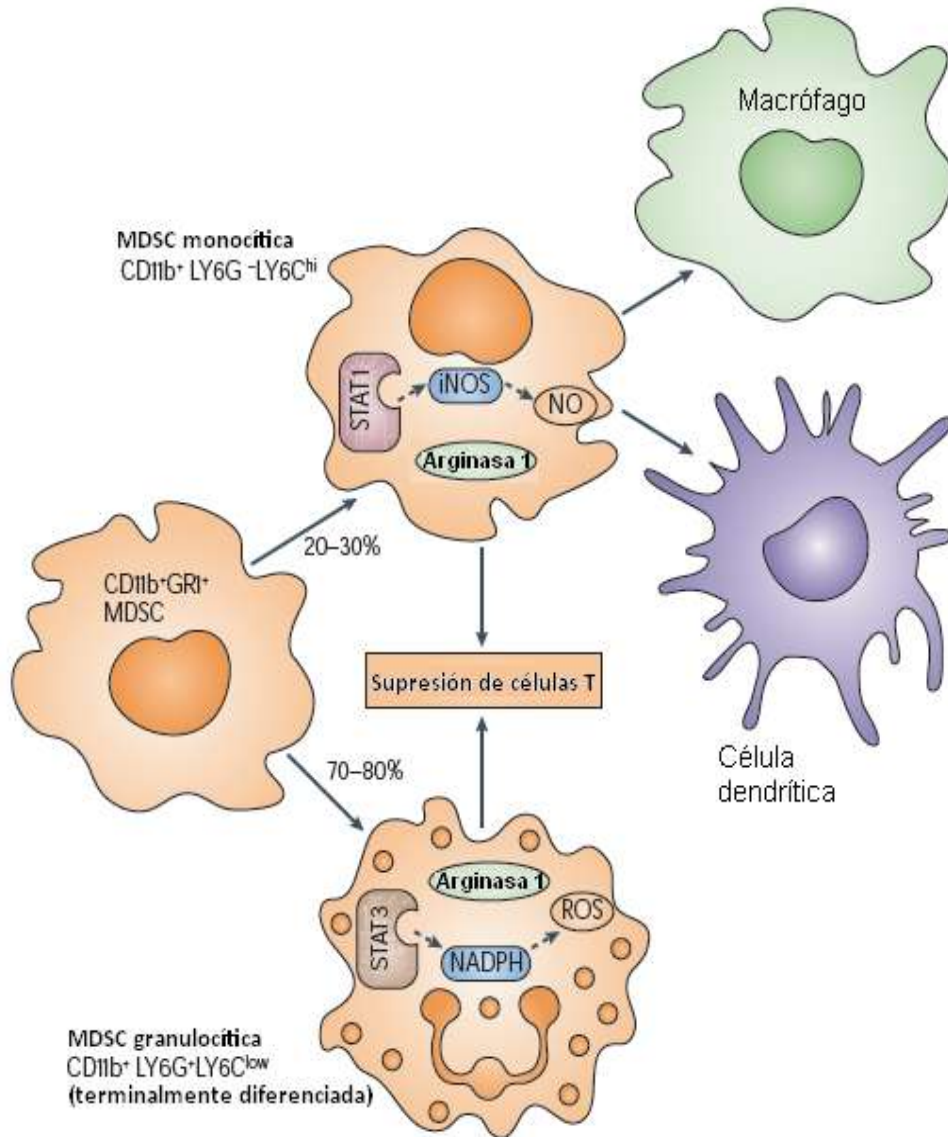


Figura 13. Mecanismos supresores mediados por los diferentes subgrupos de MDSCs. Las MDSCs en el ratón se diferencian en dos principales subgrupos: Las MDSCs monocíticas, las cuales tienen un fenotipo CD11b⁺LY6G⁻LY6C^{hi}; y las MDSCs granulocíticas con fenotipo CD11b⁺LY6G⁺LY6C^{low}. En la mayoría de los modelos tumorales predomina el linaje granulocítico (70-80%). Se ha sugerido que el subgrupo granulocítico tiene una actividad incrementada de STAT3 y NADPH, lo que resulta en niveles elevados de ROS y niveles bajos de óxido nítrico. ROS y peroxinitritos [el producto química de la reacción entre el óxido nítrico (NO) y anión superóxido (O₂⁻)], inducen la modificación post-traduccional del receptor de las células T, ocasionando una falta de respuesta en este tipo celular. El linaje monocítico, tiene una expresión sobre-regulada de STAT1 y de la enzima óxido nítrico inducida (iNOS o NOS2) y niveles incrementados de NO pero producción baja de ROS. El óxido nítrico que es producido por el metabolismo de la L-arginina por iNOS, suprime la función de las células T a través de varios mecanismos, que involucran la inhibición de cinasas Janus-3 (JAK-3, por sus siglas en inglés) y STAT-5, la inhibición en la expresión del MHC clase II y la inducción de apoptosis. Ambos subgrupos tienen niveles incrementados de arginasa 1, la cual causa la supresión de las células T a través de la depleción de la L-arginina. Solo el linaje monocítico, puede diferenciarse in vitro en células dendríticas maduras y macrófagos. (Imagen modificada desde: Gabrilovich, Nat Rev Immunol, 2009).

Se ha sugerido que la fracción monocítica de las MDSCs ejerce un efecto inmunosupresor mayor del que ejerce la fracción granulocítica, sin embargo, en la mayoría de los casos la expansión de estas últimas es superior que las de subclase monocítica. Además, las MDSCs polimorfonucleares representan el subconjunto importante por su participación en otros procesos del desarrollo tumoral como la angiogenesis y la metástasis.

1.4.5 Expansión y activación

Mediante una compleja vía de señalización en la que intervienen factores (IL-6, GM-CSF, IL-10, M-CSF, G-CSF y VEGF) se desencadenan diferentes vías de señalización en las MDSCs que involucran principalmente, a la familia de moléculas activadoras de la transcripción y transductores de señales (STATs). La activación de STAT6, STAT1 y del factor NF- κ B mediada por receptores tipo Toll, resulta en la activación de las MDSCs, lo que lleva a estas células a la sobrerregulación de las enzimas arginasa 1 y óxido nítrico sintasa, (enzimas que otorga diversos mecanismos inmunosupresores a estas poblaciones). Una gran cantidad de reportes han mostrado que la expansión y activación de las MDSCs involucran a las interleucinas 6, IL-10, IL-12 e IL-13 y a diversos factores como COX-2, PTGS2, SCF, GM-CSF, G-CSF y VEGF [110] (Figura 14).

La mayoría de los factores descritos anteriormente desencadenan en las MDSCs vías de señalización que convergen en los miembros de la familia de proteínas JAK, así como en el factor STAT 3, los cuales están involucrados en procesos celulares como la supervivencia celular, proliferación, diferenciación y apoptosis.

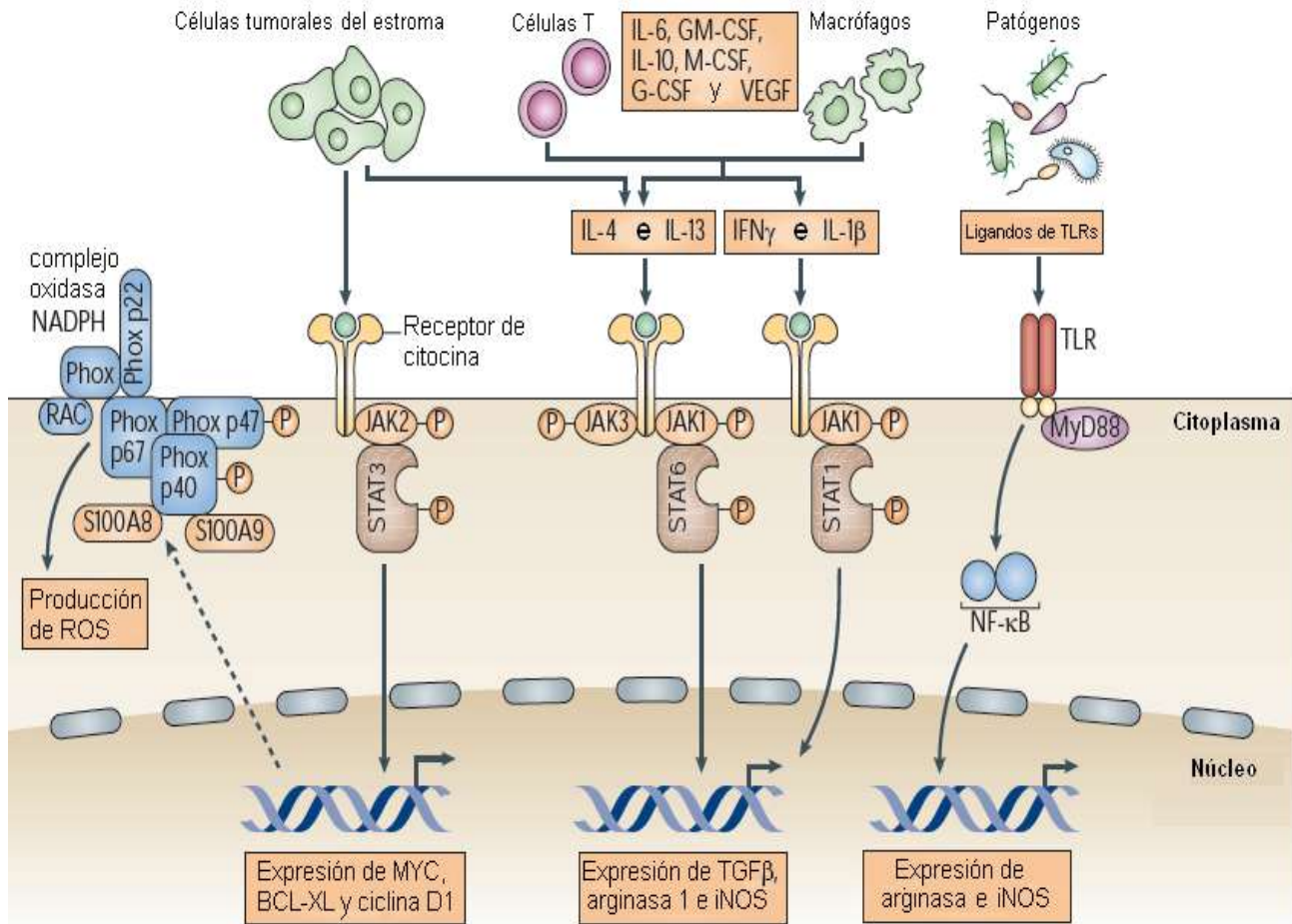


Figura 14. Vías de señalización involucradas en la expansión de las MDSCs. La acumulación de las MDSCs está regulada por varios factores que son liberados por células tumorales, células del estroma, células T activadas y macrófagos, células tumorales apoptóticas, agentes virales y bacterianos y células infectadas por patógenos. Estos factores (IL-6, GM-CSF, IL-10, M-CSF, G-CSF y VEGF) desencadenan diferentes vías de señalización en las MDSCs que involucran, principalmente, a la familia de moléculas activadoras de la transcripción y transductores de señales (STATs, por sus siglas en inglés). STAT 3, regula la expansión de las MDSCs, estimulando la mielopoyesis e inhibiendo la diferenciación de células mieloides y promoviendo la supervivencia de las MDSCs a través de factores transcripcionales como MYC (factor transcripcional que es codificado por el protooncogen *Myc*) y proteínas que inhiben la apoptosis, como la proteína XL del linfoma de células B (*BCL-XL*, por sus siglas en inglés) y ciclina D. STAT-3, contribuye también en el incremento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en las MDSCs. La activación de STAT-6 y STAT-1, así como de la activación del factor nuclear- $\kappa\beta$ (*NF- $\kappa\beta$*) mediada por receptores tipo Toll, resulta en la activación de las MDSCs, lo que lleva a estas células a la sobre-regulación de las enzimas arginasa 1 y óxido nítrico sintasa inducida (*iNOS* o *NOS2*), así como al incremento en la producción de citocinas supresoras como el factor de crecimiento transformante- β (*TGF- β*). Las proteínas de unión al calcio S100 (*S100A8* y *S100A9*) se unen directamente a componentes del complejo NADPH. Esta unión potencia la activación del complejo oxidasa NADPH en las MDSCs, lo que causa un incremento en la producción ROS, y por ende de la actividad supresora observada. Abreviaturas en inglés: G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor (factor estimulante de colonias de granulocitos); GM-CSF, granulocyte/Macrophages CSF (Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos); IFN- γ , (interferón gamma); IL, interleukin (interleucina); JAK, Janus kinase (quinasas Janus); MyD88, myeloid differentiation primary-response gen 88 (gen de respuesta primaria para diferenciación mieloide que codifica para una molécula adaptadora del receptor tipo Toll); Phox, (phagocyte oxidase); VEGF, vascular endothelial growth factor (factor de crecimiento endotelial vascular). (Imagen modificada desde: Gabrilovich, *Nat Rev Immunol*, 2009).

Para que se lleve a cabo la actividad supresora de las MDSCs, éstas requieren de factores que simultáneamente promuevan su expansión y activación. La expresión de estos factores son producidos principalmente por patógenos, células tumorales y células T. Estos factores, incluidos el IFN- γ , los ligandos de TLRs, IL-4, IL-13 y TGF- β activan varias vías de señalización en las MDSCs que involucran a STAT6, STAT1 y NF- $\kappa\beta$ [110].

También se ha demostrado el papel que cumple del receptor- α de la IL-4 (IL4R α) y STAT6 para la vía de señalización corriente abajo en las MDSCs [111]. La activación de esta vía, induce la expresión de arginasa-1 en esta población supresora. Además se ha reportado que la IL-4 e IL-13 sobre regulan la actividad de la arginasa-1, la cual incrementa la actividad supresora de las MDSCs. Otra investigación demostró que la deficiencia de STAT6 previene la señalización río abajo y bloquea la producción de arginasa-1 por MDSCs [112].

Los receptores tipo Toll que participan en la activación de la respuesta inmune innata también se involucran en la inducción de la expansión de MDSCs. Por ejemplo cuando ésta se induce por eventos de sepsis en el intestino grueso, la cual libera productos microbianos dentro del peritoneo que viajan a torrente, lo que da lugar a la expansión de la población de MDSCs en el bazo. Estas observaciones indican que la activación de las MDSCs es un resultado básico de la respuesta inmune a los patógenos que expresan los ligandos de los TLRs [11]. Bajo condiciones patológicas, la expansión de la población de MDSCs está regulada por factores que inducen la expansión y la activación, sin perder de vista que en la mayor parte de los casos, estas vías funcionan simultáneamente.

1.4.6 MDSCs en cáncer

Mientras que en individuos sanos los niveles de MDSCs permanecen en niveles casi imperceptibles, durante el desarrollo del cáncer estas y otras poblaciones supresoras se incrementan y se acumulan para establecer una plataforma que permita al tumor evadir la destrucción inmune. Para que esto ocurra, es necesario que la diferenciación de células mieloides se desvíe de su camino normal, la cual, dirige a los macrófagos, DCs y granulocitos hacia una vía que favorece la diferenciación de MDSCs patológicas. La caracterización funcional de diversas poblaciones de MDSCs renueva continuamente el enfoque sobre fenotipos adecuados para el análisis de éstas poblaciones supresoras.

La inclusión de estas poblaciones en estudios clínicos que se ha incrementado en las últimas dos décadas comienza a reflejar su importancia en el manejo de cánceres humanos. Las MDSCs con el fenotipo LIN⁻HLA-DR⁻CD33⁺CD11b⁺ se ha aislado de la sangre de pacientes con glioblastoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón o cáncer de riñón[113] (tabla 5). La frecuencia de esta población de células inmaduras puede reflejar la carga tumoral y su alta frecuencia se correlaciona con un mal pronóstico y la progresión radiográfica en pacientes con cáncer colorrectal [104].

Las células monocíticas CD14⁺CD11b⁺HLA-DR^{low/-}, circulan en la sangre de los pacientes con melanoma, mieloma múltiple, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular o el cáncer de cabeza y cuello [112, 114, 115]. De igual forma, los pacientes con cáncer renal se ven afectados por MDSCs polimorfonucleares CD11b⁺CD14⁻, CD15⁺CD66b⁺VEGFR⁺ [12]. Estos y otros fenotipos han sido empleados para la caracterización de poblaciones mieloides supresoras en cáncer [14].

Tabla 5. Fenotipos de MDSCs en cancer.

Fenotipo	Tipo de Enfermedad
Lin ⁻ HLA ⁻ DR ⁻	HNSCC, Cáncer pulmonar y Cáncer de mamá (N=93)
Lin ⁻ HLA ⁻ DR ⁻ CD33 ⁺	Cáncer renal (N=18)
Lin ⁻ HLA ⁻ DR ⁻ CD33 ⁺	Melanoma (N=39)
Lin ^{-Low} HLA ⁻ DR ⁻ CD33 ⁺ CD11b ⁺	Cáncer de mama (N=17)
CD11b ⁺ CD14 ⁻ CD33 ⁺	HNSCC (N=14) y (N=5)
CD33 ⁺ HLA ⁻ DR ⁻	Cáncer Renal (N=23)
CD11b ⁺ CD14 ⁻ CD15 ⁺	Cáncer Renal (N=123)
CD11b ⁺ CD14 ⁻ CD15 ⁺	Cáncer Renal (N=27)
CD11b ⁺ CD14 ⁻ CD15 ⁺ CD33 ⁺	HNSCC (N=87)
CD11b ⁺ CD33 ⁺	Cáncer Pulmonar (N=10)
CD15 ⁺ CD14 ⁻	Cáncer Renal (N=23)
CD15 ⁺ IL4R α ⁺	Melanoma (N=14); Colon (N=15)
CD14 ⁺ HLA ⁻ DR ^{Low/neg}	Mieloma múltiple (N=76)
CD14 ⁺ HLA ⁻ DR ^{Low/neg}	Melanoma (N=16)

Tabla modificada desde Greten, Int Immunopharmacol, 2011. HNSCC, Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.

1.4.7 Mecanismos de Supresión

Para que se establezca una respuesta antitumoral efectiva los linfocitos requieren la asistencia de células accesorias de origen mieloides que hagan accesible el antígeno al receptor de células T. Las células accesorias son también importantes para la eliminación de antígenos, destrucción de patógenos intracelulares, producción de colágeno y remodelación de tejidos.

Éstas funcionan como guías para los linfocitos, debido a que estas células deciden si una respuesta inmune debe ser iniciada y si las células T deben ser activadas, asegurándose también de que las células T activadas sean correctamente desactivadas para evitar el daño a tejidos propios y la acumulación de grandes números de células antígeno específicas que no son requeridas después de la eliminación del antígeno. Como parte de este proceso, células mieloides son reclutadas desde la sangre y órganos hematopoyéticos en números que son proporcionales al reto antigénico referencias.

Durante el proceso carcinogénicos, las MDSCs son capaces de inhibir esta respuesta a través de mecanismos específicos que se siguen describiendo actualmente. Éstas pueden usar diferentes mecanismos para suprimir la proliferación de células T, demostrando que ambos subgrupos de MDSCs usan diversas vías y moléculas de señalización para ejercer su función [99]. Sin embargo, el papel que juegan en la supresión antígeno específica y la medida en la que afectan la respuesta antitumoral en humano aun no han sido determinadas.

La actividad supresora de estas subpoblaciones se atribuía hasta hace pocos años al agotamiento de aminoácidos esenciales para el funcionamiento de linfocitos T y al daño molecular sobre el receptor de células T, productos de la sobreexpresión de los factores inmunosupresores Arginasa 1 e iNOS respectivamente, en el interior de las MDSCs [11]. Sin embargo, investigaciones recientes se han descrito otros mecanismos para la supresión de la respuesta inmune, los cuales serán mencionados a continuación.

1.4.7.1 Mecanismos Dependientes de L-Arginina

Los mecanismos supresores de las MDSCs descritos con mayor frecuencia en la literatura están basados en el metabolismo que llevan a cabo las MDSCs sobre el aminoácido esencial L-arginina, el cual es un importante nutriente para una gran diversidad de procesos celulares [116]. La L-arginina es un aminoácido utilizado en la biosíntesis de proteínas como creatina y agmatina, ésta es metabolizada principalmente por las enzimas arginasa y óxido nítrico sintasa, las cuales producen respectivamente; urea y L-ornitina, y óxido nítrico y L-citrulina (Figura 15). El consumo y transformación de la L-arginina, a través de las

enzimas iNOS y ARG-1 alteran funciones vitales para linfocitos T como su activación y proliferación. Las evidencias indican que el metabolismo incrementado de estos factores por células mieloides puede resultar en el daño a linfocitos antígeno específicos durante la respuesta antitumoral [117].

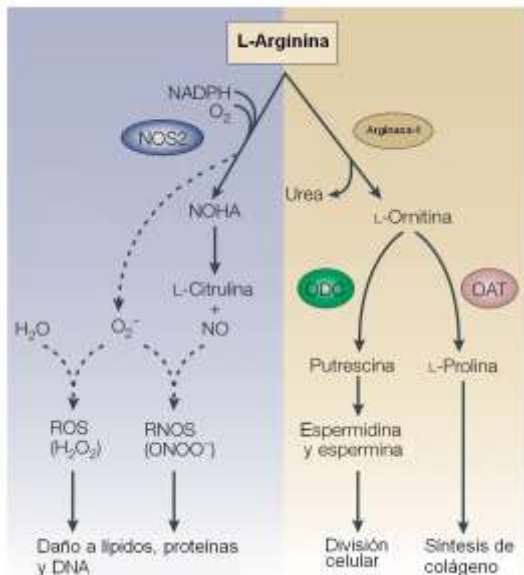


Figura 15. Representación esquemática de rutas metabólicas dependientes de las enzimas arginasa-1 e iNOS (NOS2). Las actividades de ambas enzimas se ilustran junto con las rutas metabólicas corriente abajo, que son activadas por la L-Arginina. Las líneas continuas indican la actividad enzimática principal, mientras que la línea punteada indica la ruta metabólica alternativa. En particular, cuando las concentraciones de la L-arginina son limitadas, los electrones se transfieren a través de subunidades de iNOS al co-sustrato O₂, el cual genera al ión superóxido (O₂⁻). El O₂⁻ (de esta reacción o de otra fuente) puede reaccionar con óxido nítrico para generar peroxinitritos (ONOO⁻) o con agua para producir peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Se ha reportado la producción de peroxinitritos por la actividad combinada de arginasa-1 e iNOS; la producción de H₂O es indicada, considerando el mecanismo de reacción química y por las observaciones iniciales, aunque aún no ha sido comprobado completamente. Debe notarse que otras reacciones oxidativas generan a las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés reactive oxygen species) en la célula. NOHA, NG-hydroxy-L-arginine; RNOS, reactive nitrogen-oxide species.) (Imagen modificada desde: Bronte, Nat Rev Immunol, 2005).

1.4.7.1.1 Agotamiento de L-arginina y sus efectos en proliferación y activación de Linfocitos T.

El consumo y agotamiento de la L-arginina tiene un efecto importante en la función de distintos tipos celulares. En organismos unicelulares, el agotamiento de nutrientes es una estrategia utilizada para regular la proliferación de células que compiten en un microambiente. La familia de enzimas arginasas, está altamente conservada entre las especies.

En patógenos estas enzimas tienen la capacidad de metabolizar la L-arginina del huésped, agotando así los niveles de este aminoácido como estrategia de supervivencia.

En organismos superiores el control del metabolismo del aminoácido, se vuelve una estrategia evolutiva que limita la expansión indeseada de células proliferantes activas, incluyendo células T [118]. La arginasa hidroliza a la L-arginina a L-ornitina y urea (Figura 16). La L-ornitina es un precursor para la síntesis de poliaminas a través de la ornitina descarboxilasa (ODC) y para la síntesis de la L-prolina por la enzima ornitina aminotransferasa (ODC); las poliaminas están involucradas en la diferenciación y crecimiento celular, mientras que la L-prolina afecta la producción del colágeno.

Es importante señalar que la mayor parte de información referente a los procesos moleculares que envuelven a esta enzima dentro del contexto de las MDSCs se ha obtenido de numerosos modelos murinos bien diseñados. Así se han identificado dos isoformas de la L-arginasa: arginasa-1 y arginasa-2, que son codificadas por diferentes genes. Las isoformas son idénticas en un 58% a nivel de la secuencia de aminoácidos, pero tienen distintas distribuciones celulares. La arginasa-1 (también conocida como arginasa de tipo hepática) se localiza en el citosol de hepatocitos y es un componente importante del ciclo de la urea [118]. Además, su expresión es inducida en células mieloides de ratón a través de la exposición a citocinas de tipo Th2, como IL-4 ó IL-13, así como por el TGF- β . Se ha reportado que la región que codifica para la arginasa-1 contiene en su extremo 5' elementos reguladores de la transcripción en respuesta a IL-4, AMPc, TGF- β y dexametasona [117]. El factor de transcripción más importante para la arginasa-1 es el STAT6, pero también hay rutas independientes. El STAT-1 también se puede requerir para la inducción en la expresión de arginasa-1 e iNOS, pero estas rutas moleculares no han sido totalmente elucidadas [97].

La arginasa-1 humana, se expresa constitutivamente en granulocitos pero su expresión no está sobre-regulada por los estímulos que afectan al análogo de la arginasa-1 *in vivo* [118]. La arginasa-2 conocida comúnmente como arginasa tipo renal se expresa constitutivamente en la mitocondria de varios tipos celulares, incluyendo células renales, neuronas, macrófagos y enterocitos. La inducción de la expresión de esta enzima en varios sistemas biológicos también se ha vinculado con la sobre-regulación de los transportadores de membrana de la L-arginina, indicando que ambos forman una unidad funcional (Figura 16).

Los transportadores de aminoácidos catiónicos de ratón CAT2A, CAT2B, CAT3 y CAT4 (CATs, por sus siglas en inglés) son proteínas integrales de membrana que transfieren L-lisina, L-arginina y L-ornitina a través de una vía independiente del pH, sensible a estimulación y saturable. Las CATs bombean L-arginina desde el compartimiento extracelular al intracelular para compensar su metabolismo por la arginasa-1 intracelular o por iNOS.

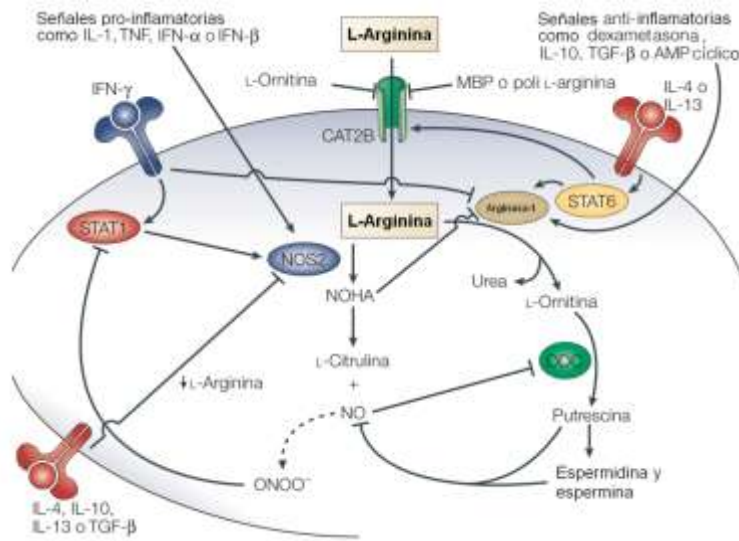


Figura 16. Circuitos metabólicos regulatorios y dependientes de citocinas que afectan las enzimas inducidas arginasa-1 e iNOS (NOS2). La citocina Th1 IFN-γ y las citocinas Th2 IL-4 e IL-13 son los inductores principales de iNOS y arginasa-1 respectivamente. Señales pro-inflamatorias (como IL-1, TNF, INF-γ e IFN-β) y señales anti-inflamatorias (como IL-10, TGF-β, AMP cíclico y dexametasona) pueden contribuir a la regulación del balance final de la actividad de iNOS y arginasa-1. Además, la arginasa-1 e iNOS activan directamente varios circuitos bioquímicos que regulan negativamente una a la otra. La baja concentración extracelular de L-arginina, la sobre-expresión de arginasa-1 o la reducción en la capacidad de toma de la L-arginina, pueden disminuir los niveles intracelulares de L-arginina y detener la traducción del RNA mensajero que codifica la iNOS, reduciendo la actividad de iNOS. Los productos y moléculas del metabolismo de la L-arginina funcionan en el citosol, pero también pueden ser liberados extracelularmente. Óxido Nítrico (NO, nitric oxide), NG-hidroxi-L-Arginina (NOHA, NG-hydroxy-L-Arginine), L-ornitina, poliaminas (incluidas putrescina, espermidina y espermita), NG-monometil-L-arginina monoacetato e incluso la arginasa-1 por sí misma, pueden ser encontrados en el espacio extracelular. NOHA puede ser liberado por macrófagos durante la actividad intensa de iNOS; por tanto puede inhibir la actividad de la arginasa-1, estimulando una mayor liberación de NO por iNOS en células vecinas durante las reacciones inflamatorias. El óxido nítrico causa la S-nitrosilación de los residuos de cisteína presentes en el sitio activo de la ornitina descarboxilasa (ODC, ornithine decarboxylase), lo cual resulta en su inhibición enzimática y subsecuentemente en el arresto de la producción de poliaminas y proliferación celular. A la inversa, las poliaminas producidas por ODC son inhibidores de iNOS. En adición, la L-ornitina y proteínas catiónicas de origen eosinófilo (EDCP, eosinophil-derived cationic protein) (como proteínas básicas principales (MBP, por sus siglas en inglés) y su análogo poli-L-arginina)) pueden impedir el transporte de L-arginina dependiente de CAT2B (CAT2B, cationic amino-acid transporter 2B). ONOO⁻, peroxinitrito;. (Imagen modificada desde: Bronte, Nat Rev Immunol, 2005).

Se ha observado que las MDSCs sobrerregulan coordinadamente la expresión de ARG-1 y del transportador de aminoácidos catiónico CAT2B, lo cual resulta en una disminución de la L-arginina extracelular, por debajo de los niveles normales[117]. En un modelo de cáncer pulmonar en ratón, se encontró que infiltrados de células con fenotipo supresor, (CD11b+GR1-F4/80-CD16 +CD32) y alta expresión de arginasa-1 y CAT2B incorporan y consumen rápidamente L-arginina del medio extracelular, lo que resultó en daño a la función

de células T, mediante inhibición de la re-expresión de la cadena ζ del CD3, después de la internalización inducida del TCR en células T antígeno específicas [119]. Este mecanismo parece ser relevante para la proliferación tumoral y para evadir su eliminación *in vivo*, ya que al inhibir la arginasa con (*N*-hidroxi-nor-L-arginina), se limitó el crecimiento tumoral de manera dependiente a la dosis [117]. La cadena ζ del CD3 es un importante componente para la transducción de señales en el TCR y se requiere para el ensamblaje correcto del complejo receptor. La pérdida de esta cadena es uno de los mecanismos descritos que demuestra tener relevancia en la función de las células T [77].

Adicionalmente ha reportado que el agotamiento de la L-arginina en el ambiente local causa alteraciones en la traducción de varios RNA mensajeros en ciertos tipos celulares referencia. Esto ocurre a través de vías de cinasas que involucran a la cinasa de control general no reprimible (GCN2) y a la cinasa blanco de rapamicina (MTOR) (Figura 17a). Como consecuencia del agotamiento de L-arginina se incrementa el nivel de tRNAs que carecen del anclaje de este aminoácido, el cual al unirse a la cinasa GCN2 la activa y se detecta el agotamiento del aminoácido, fosforilando entonces un residuo serina en la posición 51 de la subunidad- α del factor 2 de iniciación de la traducción eucariótica (EIF2- α). Esta fosforilación suprime la síntesis de proteínas a nivel del bloqueo de la iniciación de la traducción mRNAs [117].

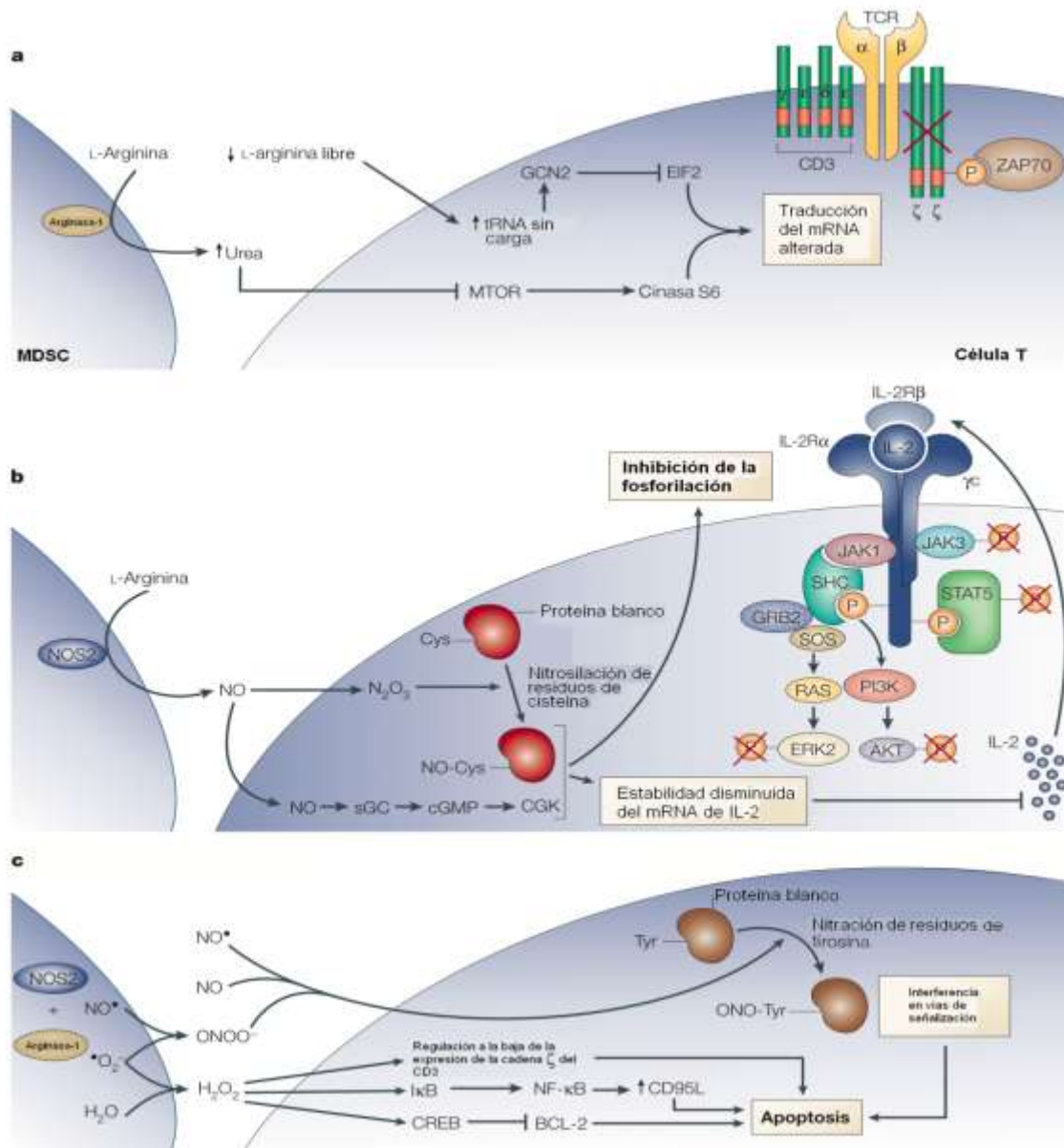


Figura 17.- Las enzimas arginasa-1 e iNOS (NOS2) o ambas, pueden ser activadas en células mieloides y frenar la activación de células T a través de diferentes rutas. a) La actividad de la arginasa-1 causa el bloqueo traduccional de la cadena del ζ CD3, posiblemente a través de diferentes vías de señalización que involucran a la cinasa que es blanco de la rapamicina (MTOR,) y la cinasa de control general no reprimible (GCN2). b) iNOS (NOS2) a través del óxido nítrico causa la nitrosilación de residuos de cisteína en proteínas blanco y genera la producción de GMP cíclico por la ruta de la enzima guanilato ciclasa (sGC). Estos eventos interfieren con la señalización del receptor de la IL-2, bloqueando la fosforilación de diversas moléculas transductoras de señales que se acoplan al receptor de la IL-2 y alterando al RNA mensajero que codifica para la citocina IL-2. c) Cuando ambas enzimas son activadas, se desencadena la producción de ROS (H₂O₂) y RNOS (ONOO⁻), las cuales inducen apoptosis celular (ver texto principal). γc, common cytokine-receptor γ-chain (Cadena γ de receptor común de citocina); CGK, cGMP-dependent protein kinase (proteína cinasa dependiente de GMP cíclico); CREB, cyclic-AMP-responsive-element-binding protein (Proteína de unión en respuesta a AMP cíclico); (Imagen modificada desde: Bronte, Nat Rev Immunol, 2005).

1.4.7.1.2 Estrés Oxidante como promotor de la falta de reconocimiento antigénico

La L-arginina es también el sustrato para la familia de enzimas óxido nítrico sintasas (NOS). Se han descrito tres isoformas de la enzima NOS, como productos de diferentes genes. Estas isoformas son idénticas en un 50% pero difieren en su localización intracelular, regulación, propiedades catalíticas y sensibilidad inhibitoria: NOS1 (también llamada nNOS) predomina en tejido neuronal; NOS2 (también llamada iNOS) es la isoforma inducida, la cual está presente en varias células del sistema inmune, incluyendo varios tipos de células mieloides; y NOS3 (también llamada eNOS) se encuentra en células endoteliales [120].

La expresión de iNOS y la producción de NO se han descrito claramente en macrófagos, neutrófilos, DCs y otras células que participan en la respuesta inmune. Se sabe que los inductores principales de iNOS son el IFN- γ y el lipopolisacárido, pero también puede ser activada por otras citocinas inflamatorias como IL-1, TNF, o IFN- γ referencia. Estas citocinas regulan varios factores de transcripción tales como el NF- κ B, la proteína activadora 1 (AP1) y STAT-1. Las especies reactivas de oxígeno conducen a diversos bloqueos moleculares en las células T, que van desde la pérdida de la expresión de la cadena ζ del TCR [121], hasta la desregulación en la señalización de la vía del IL-2R [120] y la desensibilización subsecuente del TCR [122]. Se sabe que el óxido nítrico (NO) regula negativamente a proteínas de señalización intracelulares, ya sea directamente a través de la nitrosilación de residuos de cisteína, o indirectamente por la activación de la enzima guanilato ciclasa (GC) y a la proteína cinasa dependiente de guanosín monofosfato cíclico (cGMP). En las células T, el NO puede bloquear la fosforilación y por lo tanto la activación de proteínas de señalización importantes. Estudios en humanos han demostrado que el NO afecta la estabilidad del mRNA que codifica para la IL-2 en linfocitos activados [120] (Figura 17b).

El peroxinitrito (ONOO⁻) es una potente molécula oxidante producto de la reacción entre el NO y el anión superóxido. Esta molécula induce la nitración y nitrosilación de los aminoácidos cisteína, metionina, triptófano y tirosina del TCR y de moléculas CD8.

También se encuentra en altos niveles en sitios donde las MDSCs y células inflamatorias se acumulan, incluyendo sitios de reacciones inmunológicas y puede funcionar como un mensajero intra e intercelular poco común que induce modificaciones post-traduccionales en las proteínas, a través de la nitración de los residuos de tirosina. La nitración de los residuos de tirosina puede por lo tanto, influenciar en diferentes actividades biológicas, como la actividad o inactividad enzimática, diferenciación, proliferación e inducción de apoptosis celular. En dosis altas, los peroxinitritos controlan la muerte celular, por nitración de componentes de la membrana mitocondrial, lo cual causa daño en este organelo celular y por lo tanto la liberación de factores que promueven la muerte celular, como el citocromo *c* [120]. Por otra parte en pacientes con cáncer avanzado el peróxido de hidrogeno H₂O₂ producido por granulocitos circulantes de baja densidad, ha sido reconocido como el causante del daño funcional de las células T a través de la afección en la expresión de la cadena ζ del CD3 [120].

Es importante mencionar que la falla de reconocimiento antígeno específico que puede producir el estrés oxidativo antes descrito sobre las moléculas de superficie de linfocitos T, no necesariamente los conducen a la muerte, ni evita su activación específica contra otros estímulos sin relación con los antígenos tumorales, incluyendo virus, lectinas, moléculas coestimuladoras, interleucinas u otros estímulos [123].

1.4.7.1.3 Supresión cooperativa de arginasa e iNOS.

La arginasa-1 e iNOS, son enzimas utilizadas tanto individualmente como en conjunto por las MDSCs para suprimir la respuesta de las células T. La elección de cuál de estas enzimas se utilizará, está regulada por una compleja red de señalización la cual es la base para que las MDSCs y células T activadas puedan interactuar. El mecanismo molecular que regula la activación y proliferación de las células T, depende de la actividad enzimática predominante. Las evidencias iniciales indican que el metabolismo de cada una de estas enzimas regula negativamente a la otra por competencia directa del sustrato L-arginina [120].

Sin embargo, cuando se induce la expresión de ambas enzimas en el interior de las MDSCs, datos cinéticos indican que la producción del óxido nítrico no debe ser afectada en gran medida, ya que si bien, la ARG-1 tiene menor afinidad por el sustrato, se observó que ésta

cataliza la reacción aproximadamente 1000 veces más rápido que iNOS, lo que indica la L-arginina es metabolizada a velocidades similares por estas dos enzimas[124]. Recientemente se mostró una actividad combinada de arginasa e iNOS, en células mieloides CD11b+ provenientes de infiltrados tumorales. Esto indica que la co-expresión de estas enzimas puede ser un marcador de las MDSCs. Tanto las especies reactivas de oxígeno como el (H₂O₂) y las especies reactivas de nitrógeno como el (ONOO⁻), son capaces de cruzar membranas dentro de las células o entre ellas [120] (Figura 17c).

1.4.7.2 Nuevos mecanismos

Producto del avance en el conocimiento biológico de las poblaciones supresoras, en la actualidad se ha descrito que las MDSCs aprovechan un exceso de mecanismos redundantes para influir negativamente en la respuesta inmune innata y adaptativa. A continuación se describen aquellos de reciente inclusión en la biología de esta población mieloide.

1.4.7.2.1 Afectación del tráfico y viabilidad de linfocitos T

La expresión de ADAM17 (desintegrina y proteína 17 que contiene un dominio metaloproteínasa) en la membrana plasmática de las MDSCs disminuye la expresión de CD62L en la superficie de las células T CD4⁺ y CD8⁺, lo que limita la recirculación de las células T a los ganglios linfáticos [125]. Otro ejemplo es la modificación de CCL2 por el peroxinitrito derivado de las MDSCs, un proceso que afecta la migración de las células T CD8⁺ en el núcleo del tumor [91] (Figura 18).

1.4.7.2.2 Inducción de apoptosis en Linfocitos T

Las MDSCs expresan galectina 9, que se une a la inmunoglobulina de las células T y a la proteína 3 que contiene dominios de mucina (TIM3) en los linfocitos e induce la apoptosis de células T [126]. Las MDSCs también disminuyen el número e inhiben la función de las células NK en ratón y humanos, principalmente a través de la membrana en contacto con los

mecanismos dependientes (es decir, a través de la membrana envolvente del TGF- β (en el caso de MDSCs ratón) y mediante la interacción con el receptor de las células NK NKp30 (también conocido como NCR3) [127-129] (Figura 18).

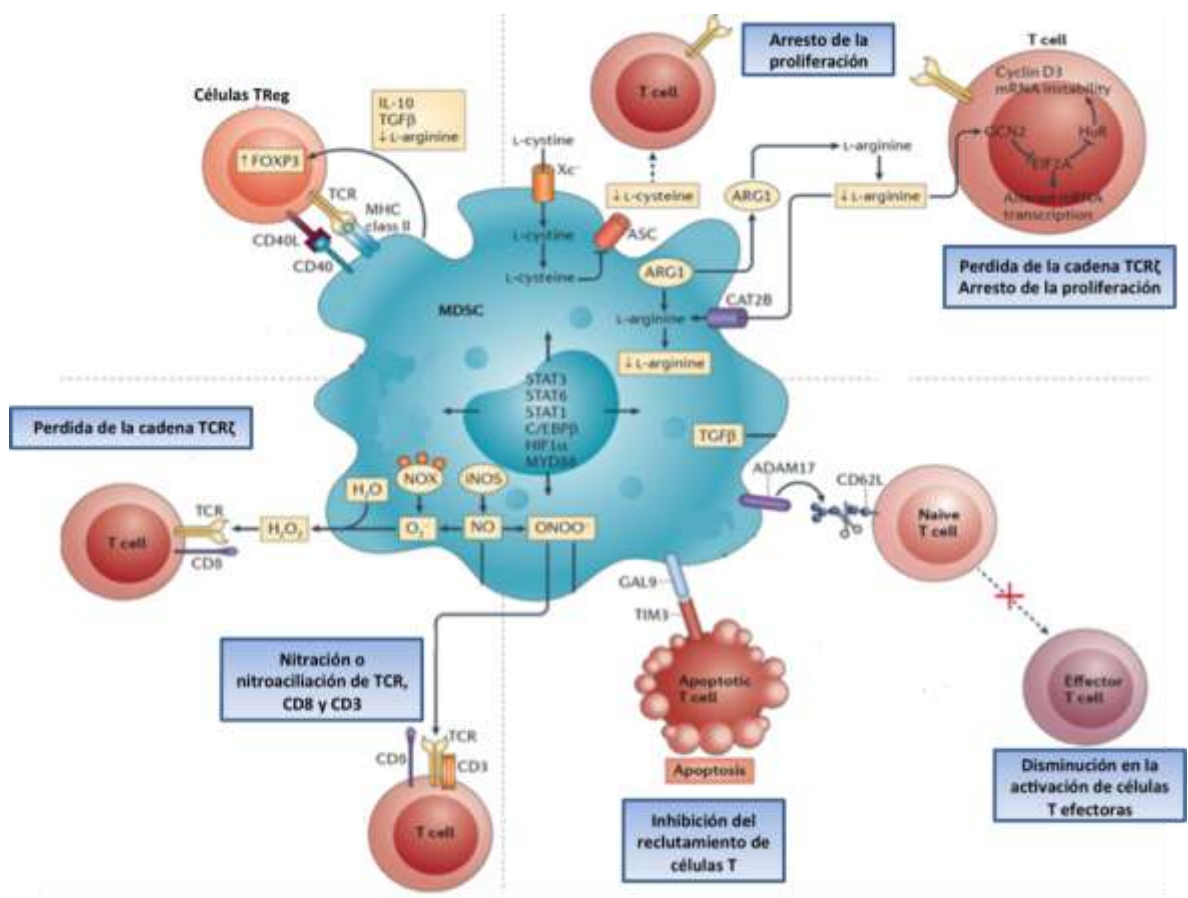


Figura 18.- Mecanismos de inhibición dependientes de las MDSCs sobre la activación y proliferación de linfocitos T. Las Células supresoras de origen mielode (MDSCs) pueden inhibir eficientemente la respuesta antitumoral de células T a través de diferentes mecanismos. **a)** MDSCs asociadas al tumor inducen el desarrollo de linfocitos T reguladores T_{reg} y también la proliferación de los T_{reg} ya existentes. Las proteínas de unión a calcio S100A8 y S100A9 están involucradas en la quimiotaxis de las MDSCs y otras células mieloides; estos efectos son mediados en parte a través del receptor de glicosilación avanzada de productos finales (RAGE). Al mismo tiempo S100A8 y S100A9 extendidos con gp91phox son parte del complejo NADPH oxidasa (NOX) que es responsable del incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por las MDSCs. **b)** Células mieloides asociadas al tumor privan a los linfocitos T de aminoácidos esenciales para su diferenciación y crecimiento. **c)** Células mieloides asociadas al tumor liberan moléculas oxidantes, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y peroxinitrito (ONOO). El peroxinitrito causa nitricación y nitrosilación de componentes del complejo de señalización del receptor de células T (TCR) y el H_2O_2 causa la pérdida de la cadena del TCR, inhibiendo por lo tanto la activación de células T. **d)** Células mieloides asociadas al tumor también pueden interferir con la migración y viabilidad de células T. La metaloproteína ADAM17 (proteína 17 con dominio metaloproteína y desintegrina) se acopla a CD62L, el cual es necesario en la migración de células T para drenar nódulos linfáticos. Y la galectina 9 (GAL9) puede actuar sobre la inmunoglobulina de células T y sobre la proteína 3 con dominio mucina (TIM3) sobre células T para producir apoptosis. Como la inducción de las vías inmunosupresoras que se muestran en la imagen son reguladas por factores de transcripción comunes, estas vías pueden operar en más de un tipo celular mielode.

1.4.7.2.3 Promoción de la activación y expansión de Linfocitos Tregs

Las MDSCs promueven la expansión clonal de células Treg antígeno específicas y también inducen la conversión de células T CD4⁺ en células Treg inducidas. Los mecanismos no se conocen, pero pueden implicar el contacto célula a célula (incluyendo las interacciones CD40-CD40L) [130], la producción de factores solubles (como el IFN, IL-10 y TGFβ) por MDSCs y posiblemente, también por su sobreexpresión de ARG-1 [107, 131]. Las MDSCs CD14+HLA-DR^{low/-} promueven en humanos la transdiferenciación de las células Th en células T reguladoras inducidas por FOXP3⁺, mediante la producción de ácido retinoico y TGF-β [132].

1.4.8 Especificidad de las MDSCs para suprimir la respuesta inmune en tejidos específicos.

Por otra parte en la supresión directa, el contacto célula-célula, es necesario para que los peroxinitritos y las ROS generadas por las MDSCs dirijan sus efectos a las moléculas expresadas por linfocitos T, lo que ocasiona que estas células permanezcan sin respuesta a antígenos tumorales. Las MDSCs pueden mediar la supresión de las células T de manera antígeno específica y no específica, dependiendo de si estas entran o no, en contacto directo con los linfocitos. Además, el efecto inmunosupresor de éstas está determinado por el contexto en el que se encuentren ya que sus estrategias difieren respecto al lugar en el que actúan.

En los órganos linfoides periféricos, la supresión de las MDSCs sobre los linfocitos T CD8⁺ se produce principalmente de manera antígeno específica y requiere de la presentación de antígenos por MDSCs, así como del contacto directo con células T [120] (Figura 19). Por el contrario, en la periferia [133] y en el sitio del tumor [134] [135] [136], la actividad de MDSCs se ve aumentada por las células T activadas, y como resultado las MDSCs son capaces de suprimir a células T cercanas de forma antígeno no específica. Sin embargo, si las células T se activan y comienzan a expresar el ligando de Fas (también conocido como CD95L), las MDSCs pueden inducir en éstas un proceso apoptótico [133].

La medida en que las MDSCs pueden suprimir la respuesta inmune de manera específica y no específica sigue siendo estudiada por distintos grupos. Sin embargo, las evidencias indican que los factores que median la función supresora de las MDSCs pueden inhibir la proliferación de las células T inespecíficamente, siempre y cuando éstas se encuentren en proximidad con las MDSCs [11]. Estos hallazgos se confirman en estudios *in vitro* que es donde se lleva a cabo una supresión antígeno no específica de células T, mediada por las MDSCs. Mientras que las interacciones antígeno específicas entre células presentadoras de antígeno y células T, resultan en un contacto mucho más estable y más prolongado, que las interacciones antígeno no específicas. Estas interacciones célula-célula, son necesarias para que los peroxinitritos y las ROS generadas por las MDSCs, medien sus efectos en las moléculas expresadas en la superficie de las células T, y que hacen que estas células queden sin respuesta a antígenos específicos. Otra evidencia que soporta la hipótesis de que las MDSCs median la supresión de células T de manera antígeno específica es el hallazgo que demuestra que las MDSCs pueden tomar antígenos solubles, incluyendo antígenos asociados a tumores, procesarlos y presentarlos a las células T [119].

Por otra parte el bloqueo de la interacción MDSC-célula T, con anticuerpos específicos contra el MHC clase I, bloquea la inhibición de la respuesta de células T CD8+ ejercida por las MDSCs *in vitro*. La naturaleza de la supresión de células T CD8+ mediada por las MDSCs, restringida al MHC clase I, se ha demostrado también *in vivo* en modelos tumorales y modelos de enfermedad intestinal [137, 138].

Como se mencionó, las MDSCs migran activamente al sitio del tumor, en donde sobre-regulan la expresión de factores inmunosupresores y se diferencian rápidamente a TAMs. Los niveles de dichos factores que son producidos por los TAMs, son mucho más altos que aquellos producidos por las MDSCs que están presentes en órganos linfoides periféricos. Además los TAMs producen varias citocinas que suprimen la respuesta de las células T, de manera antígeno-no específica (Figura 19).

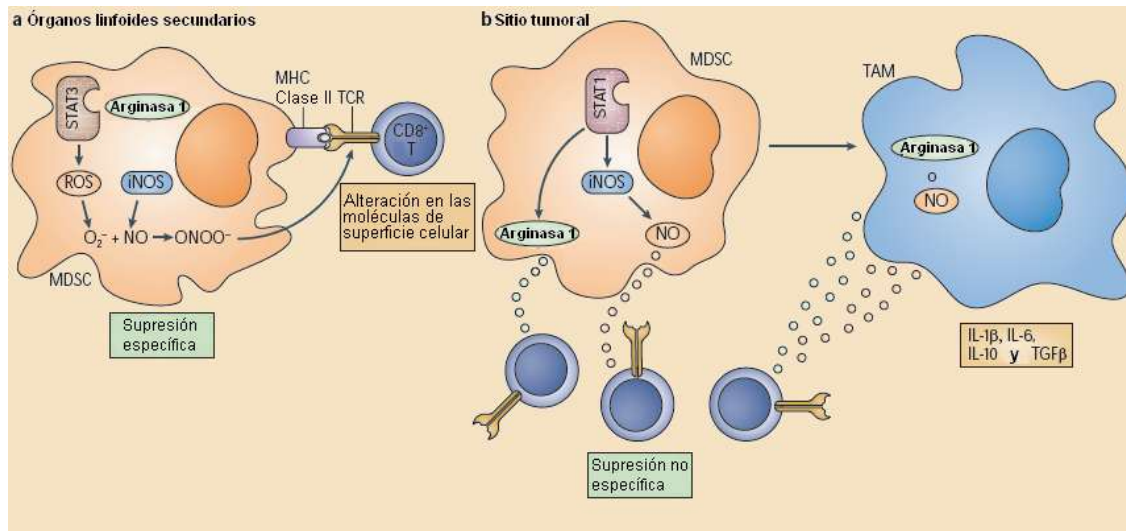


Figura 19. Mecanismos de supresión inmune mediada por las MDSCs en órganos linfoides secundarios y en sitios tumorales. Ver texto principal. (Imagen modificada desde: Gabrilovich, et al., *Nat Rev Immunol*, Myeloid-derived suppressor cells as regulators of immune system. 2009).

Las MDSCs migran activamente al sitio del tumor donde sobre regulan la expresión de iNOS y arginasa⁻¹ y se diferencian en gran medida a TAMs. Los niveles de NO y arginasa⁻¹ producidos por estos macrófagos son mucho más altos que aquellos producidos por las MDSCs. Además los TAMs producen varias citocinas que suprimen la respuesta de las células T, de manera antígeno inespecífica [11]. Sin duda las células del estroma tumoral, la hipoxia y el ambiente acidófilo juegan un papel en la regulación de esta población supresora, dependiendo del entorno, (microambiente tumoral, periferia, matriz extracelular, etc.) los mecanismos bajo los que operan las MDSCs.

1.4.9 Relación de las MDSCs con otras células mieloides.

A pesar de su similitud morfológica, las MDSCs polimorfonucleares y los neutrófilos son funcional y fenotípicamente diferentes. En primer lugar, las MDSCs polimorfonucleares, y no los neutrófilos, son inmunosupresores. En segundo lugar, las MDSCs polimorfonucleares expresan mayores niveles de CD115 y CD244 que los neutrófilos, pero niveles más bajos del receptor 1 de quimioquinas CXC-1 (CXCR1) y CXCR [139].

Por último, en comparación con los neutrófilos, las MDSCs polimorfonucleares son menos fagocíticas, expresan niveles más altos de ARG1 y mieloperoxidasa, aumentan la producción de ROS y muestran la reducción de quimiotaxis en los sobrenadantes de carcinomas humanos [108].

De manera similar, aunque las MDSCs monocíticas y los monocitos inflamatorios tienen un fenotipo similar, estas poblaciones celulares son en realidad funcional y morfológicamente distintas. Las MDSCs monocíticas son altamente inmunosupresoras, ya que expresan, entre otros factores, altos niveles de iNOS y ARG1. Por el contrario, iNOS y ARG1 no se regulan de forma coordinada en los monocitos. Además, aunque en los macrófagos M1 la expresión de iNOS es un sello distintivo de un fenotipo tumorocida, en las MDSCs monocíticas la expresión de iNOS promueve actividades supresoras [35]. Este cambio en la actividad de iNOS probablemente refleja la interacción de iNOS con otras enzimas expresadas por MDSCs, como ARG1 y NADPH oxidasa, donde la actividad coordinada de estas enzimas han demostrado promover la producción de peroxinitrito, que inhibe la proliferación, las funciones efectoras y la migración de las células T [140]. La población MDSC incluye precursores directos de las DCs, macrófagos y granulocitos. Después de 24 horas de cultivo *in vitro*, las MDSCs polimorfonucleares se asemejan a los neutrófilos fenotípica y funcionalmente [139]. En cultivos de MDSCs provenientes de tumor se ha observado una generación de macrófagos maduros y DCs efectoras cuando éstos se encuentran en ausencia de factores derivados de un tumor [141].

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer pulmonar es un problema de salud pública a nivel mundial en la actualidad. En general, las tasas de mortalidad debidas a esta enfermedad tienden a aumentar dado que representa a uno de los tipos de cáncer más invasivo y letal. En México el cáncer de pulmón es uno de los más frecuentes entre hombres y mujeres. La tendencia indica que en los próximos años la incidencia y mortalidad por este tipo de cáncer aumentará en nuestro país.

A pesar de los intensos programas de concientización sobre el consumo del tabaco y de los constantes intentos por detectarlo en fases tempranas, esta enfermedad se diagnostica generalmente en estadios avanzados y con un pronóstico pobre. En el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) y en el Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) el número de casos también va en aumento, siendo el adenocarcinoma el subtipo histopatológico más frecuente.

Por otra parte, el reconocimiento de la extraordinaria complejidad del proceso neoplásico y de los constantes fracasos en el tratamiento de la enfermedad ponen de manifiesto la necesidad por incursionar en nuevas investigaciones que aporten elementos para la comprensión del proceso tumoral e incentiven el diseño de mejores y más eficaces esquemas terapéuticos.

En el contexto de los procesos característicos que dan origen y/o participan en el desarrollo neoplásico, la evasión de la destrucción inmune continúa siendo blanco activo de investigación debido a que no se conocen con claridad los mecanismos por medio de los cuales el tumor promueve la evasión de la respuesta antitumoral. En este contexto el estudio de las características y funciones de poblaciones celulares con carácter inmunosupresor es relevantemente y necesario ya que las vías de evasión de la respuesta antitumoral permanecen sin ser elucidadas.

III. HIPOTESIS

Las células mieloides con fenotipo supresor se encuentran incrementadas en la sangre periférica de pacientes con estadios avanzados de cáncer pulmonar de células no pequeñas libres de tratamiento respecto a sujetos control.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Caracterizar fenotípicamente a las células supresoras de origen mieloide provenientes de muestras sanguíneas de pacientes con adenocarcinoma pulmonar en estadio IV libres de tratamiento.

4.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar fenotípicamente las células supresoras de origen mieloide mediante el fenotipo: CD14⁻ CD11b⁺ CD15⁺ CD66b⁺ VEGFR⁺ en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas y sujetos control.
2. Determinar la frecuencia de población de linfocitos T totales y las subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺ presentes en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas y sujetos control.
3. Analizar la expresión de la cadena z del receptor CD3 en los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ de los sujetos estudiados por citometría de flujo.

V. METODOLOGÍA

5.1 Población de estudio

Los pacientes incluidos en el estudio fueron clasificados clínicamente según la estirpe histológica y el estadio de la enfermedad. Se seleccionaron sujetos con diagnóstico confirmado de cáncer de pulmón de células no pequeñas diagnosticados en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y en el Instituto Nacional de Cancerología.

La clasificación histológica se realizó por anatomopatólogos de acuerdo los criterios de la IASLC. El estadio de la enfermedad se determino según la combinación de criterios radiológicos, patológicos y quirúrgicos, de acuerdo con el sistema TNM para la clasificación del cáncer de pulmón, recomendado por la IASLC. Este último está basado en la extensión y tamaño del tumor primario (T), la afectación de ganglios linfáticos regionales (N), y la presencia o ausencia de metástasis a distancia (M) [37].

En el presente trabajo se incluyeron 40 pacientes con diagnóstico confirmado de cáncer pulmonar que se encontraban en estadio clínico IV con diagnóstico de adenocarcinoma. Participaron 25 sujetos control sin síntomas respiratorios, fumadores y no fumadores como grupos control.

5.2 Criterios de inclusión

➤ Pacientes con cáncer pulmonar:

1.- Se incluyeron pacientes que junto con un cuadro clínico-radiológico compatible con cáncer de pulmón, cumplieron al menos una de las siguientes condiciones y se encontraban libres de tratamiento previo a la obtención de la muestra.

2.- Citología positiva para malignidad en esputo, aspirado bronquial, cepillado bronquial, punción aspirativa pulmonar, líquido pleural o punción de otras localizaciones metastásicas.

3.- Biopsia positiva para malignidad de origen bronquial, transbronquial, pleural, pulmonar percutánea, pulmonar por toracotomía o de localizaciones metastásicas.

Sujetos Control

1.- Aquellos sujetos que estuvieron de acuerdo de participar en el estudio

5.3 Criterios de exclusión

➤ Pacientes con cáncer pulmonar

1. Sujetos con infección por VIH

2. Se excluyeron aquellos sujetos que no estuvieron de acuerdo en participar en el estudio.

➤ Sujetos Control:

1. Se excluyeron aquellos en los que se tuviera sospecha de lesiones pulmonares de tipo neoplásico con los mismos criterios que rigieron para los pacientes con diagnóstico positivo para cáncer de pulmón.

2. Aquellos sujetos que reportaban antecedentes familiares de cualquier tipo de cáncer

3. Sujetos con enfermedades que comprometen seriamente al sistema inmune.

4. Aquellos que no estuvieron de acuerdo en participar en el estudio.

5.4 Obtención de células mononucleares de sangre periférica.

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de los dos grupos estudiados con la siguiente técnica. Las células se obtuvieron a partir de sangre venosa heparinizada de los pacientes y sujetos sanos por gradiente de centrifugación (Ficoll Hypaque, Amersham).

Esta fracción celular se lavó dos veces con PBS (Buffer Fosfato Salino) y se determinó la viabilidad por microscopía óptica para conocer el volumen de la muestra que contiene las PBMC necesarias para el marcaje con anticuerpos monoclonales.

5. 5 Caracterización fenotípica de MDSCs polimorfonucleares.

La fracción polimorfonuclear de la sangre de pacientes y controles se trató de manera directa, 800 µl de la muestra se lavaron 3 veces con PBS para separar el plasma y se bloqueo 15 minutos con anti-IgG para evitar el pegado inespecífico. Los leucocitos se incubaron directamente con anticuerpos previamente titulados durante 25 minutos a 4°C en la oscuridad. Para el marcaje del VEGFR los leucocitos fueron lavados 3 veces para su separación de componentes del plasma, según indicaciones del fabricante. Las células se trataron con 450 µl de solución de lisis por 10 minutos y se resuspendieron en 250 µl PBS para su análisis por citometría. La expresión celular de receptores mieloides fue determinada con los anticuerpos monoclonales anti-ratón dirigidos contra humano CD11b, CD66, CD15, VEGFR y CD14. Las muestras fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACSAria (BD Biosciences, San José, Cal. USA) y analizadas con el Software FlowJo V. (Treestar, Inc, Ashland,Or, USA) , En todos los casos se adquirieron 100 000 eventos.

5.5 Caracterización fenotípica Linfocitos T.

El análisis de las poblaciones linfocitarias se llevo cabo en la misma fracción de PBMCs para ambos grupos de estudio. Aproximadamente 500 µl de PMBCs se marcaron con los anticuerpos de superficie anti-ratón dirigidos contra humano CD3, CD4 y CD8 durante 20 minutos. Se lavaron y resuspendieron en PBS para su análisis por citometría de flujo. De igual forma, 100 000 eventos de cada una de las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo FACSAria (BD Biosciences, San José, Cal. USA) y analizadas con el Software FlowJo V. X (Treestar, Inc, Ashland,Or, USA) , En todos los casos se adquirieron 100 000 eventos.

5.6.1 Medición de la expresión de la cadena ζ del receptor de CD3 (CD247).

100 μ l de sangre completa fueron incubados con anticuerpos de superficie anti-humano CD3, CD4 y CD8 durante 20 minutos. Posteriormente se lavó la muestra con PBS y se permeabilizo con 450 μ l solución citofix/cytoperm (BD biosciences) durante 20 minutos, después de lo cual se lavo dos veces con PBS/BSA y se incubaron con el anticuerpo intracelular anti-humano CD247 durante 20 minutos.

Las células se lavaron dos veces y se agregaron 200 μ l de paraformaldehído al 1%. Las células se analizaron en el citómetro de flujo FACSAria (BD Biosciences, San José, Cal. USA) y analizadas con el Software FlowJo V. X (Treestar, Inc, Ashland,Or, USA) , En todos los casos se adquirieron 100 000 eventos.

5.8 Análisis estadístico

Con el fin de describir las variables continuas se mostraron los valores en media, mediana y desviación estándar. Mientras que las variables nominales u ordinales en proporciones. La comparación entre las características generales de controles y pacientes con Cáncer Pulmonar de células no pequeñas (adenocarcinoma) de variables continuas, así como la comparación del número de células supresoras se determinó por se realizó con prueba t de Student o U de Man-Whitney según su distribución. Se consideró un valor significativo de p cuando éste sea ≤ 0.05 .

VI. RESULTADOS.

6.1 Características socio-demográficas de los pacientes estudiados.

Se incluyeron en este estudio 40 pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas, la media de edad fue de 58.1 (± 14.3) años, 28 mujeres y 12 hombres con una edad media de 61.4 años y una desviación estándar de 15.3. Adicionalmente 15 pacientes correspondientes al 37.5% del grupo, presentaban antecedentes de tabaquismo mientras que 18 pacientes estuvieron expuestos a humo de leña (Tabla 6).

Tabla 6. Características socio-demográficas.

	Casos (n=40)	Controles (n=25)	P
Sexo masculino	12/40(30)	6/25(24)	0.6
Edad	58.1(± 14.3)	61.5(± 15.4)	0.4
Exposición a humo de leña y tabaco	5/40(12.5)	0	0.06
Diabetes o hipertensión	15/40(37.5)	2/25(8)	0.008

Las muestras sanguíneas de los pacientes fueron comparadas con un grupo de sujetos control libres de cáncer con una edad media de 58 años y desviación estándar de 14.3 años. No se encontraron diferencias significativas entre la edad de ambos grupos.

6.2 Características clínicas de los pacientes estudiados

El 87.5% de los pacientes se encontraron en la etapa clínica IV. El 25% de los pacientes tenían un ECOG de 2 y la media del Karnofsky fue de 85 (± 7.5). El 42.5% de los casos presentaron derrame pleural. El 85% de los casos presentaron diagnóstico de adenocarcinoma y 15% otros subtipos histológicos. Igualmente 85% de los pacientes habían desarrollado metástasis, 10% presentaron polimetástasis y 25% metástasis en sistema nervioso central (Tabla 7).

Tabla 7. Características clínicas de los pacientes Cáncer pulmonar de células no pequeñas (n=40).

CARACTERÍSTICA		% y D.E.
Etapa clínica IV/III	35/40	87.5
Histología (adenocarcinoma)	34/40	85
Índice de masa corporal	24.6	(±3.9)
Metástasis (si/no)	35/40	87.5
Polimetastásico/Oligometastásico	4/35	11.4
Oligometastásico (si/no)	31/40	77.5
Polimetastásico (si/no)	4/40	10
Metástasis SNC	10/40	25
Derrame pleural	17/40	42.5
ECOG 2/1	10/40	25
Karnofsky (media, ± desviación estándar)	85	(±7.5)

6.3 Incremento de poblaciones mieloides en pacientes con Cáncer Pulmonar.

La caracterización fenotípica de las poblaciones mieloides CD11b⁺, CD11b⁺/CD15⁺, CD11b⁺/CD14⁻ se realizó mediante marcaje directo en células de sangre total circulante de pacientes con adenocarcinoma pulmonar en estadio IV libres al tratamiento, así como en sujetos sanos como grupo control. Para jerarquizar los distintos fenotipos de las poblaciones celulares mieloides se analizó la expresión de marcadores referidos en las células totales adquiridas. Los datos mostrados representan porcentajes de células positivas en una población total de 100,000 eventos para todas las muestras. El análisis de todas las subpoblaciones estudiadas se realizó inicialmente a partir de una ventana en la que se mostraron los tipos celulares por tamaño y complejidad [Forward Scatter (FSC) vs. Side Scatter (SSC)]. Posteriormente se analizó la expresión independiente del marcador CD11b. Mientras que de manera simultánea se analizó la expresión de los marcadores CD11b y CD15 así como los marcadores CD11b y CD14 (Figura 20, Tabla 8).

Tabla 8. Poblaciones mieloides en pacientes con adenocarcinoma pulmonar y sujetos control.

Población	Cáncer Pulmonar	Controles	P
CD11b ⁺	57 (±14.2)	19.5(±5.4)	<0.0001
CD11b ⁺ CD15 ⁺	25.7(±7.7)	0.9(±0.5)	<0.0001
CD11b ⁺ CD14 ⁻	21.0(±7.9)	7.8(±2.5)	<0.0001

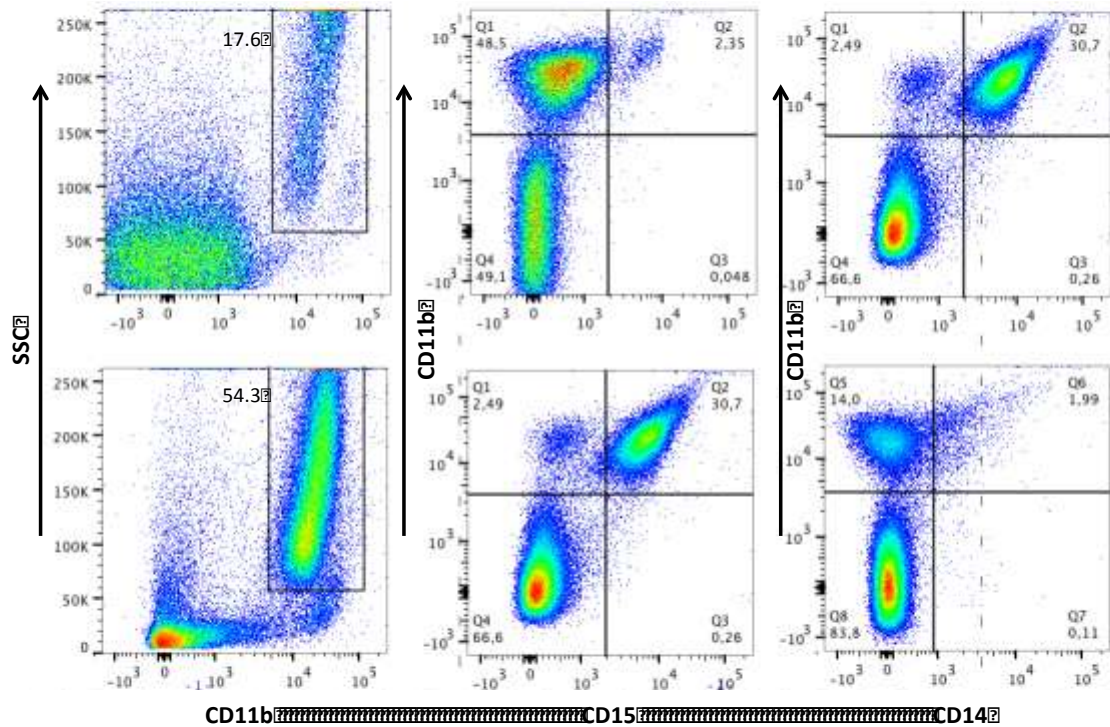


Figura 20. Estrategia de análisis para la identificación de poblaciones mieloides en pacientes y controles dot plots de 11b, MDSC

Se encontró un incremento significativo de las poblaciones $CD11b^+$ (<0.0001), $CD11b^+/CD15^+$ (<0.0001) y $CD11b^+/CD14^-$ (<0.0001) en los pacientes con adenocarcinoma pulmonar, comparados con el grupo control (Figura 21 y 22).

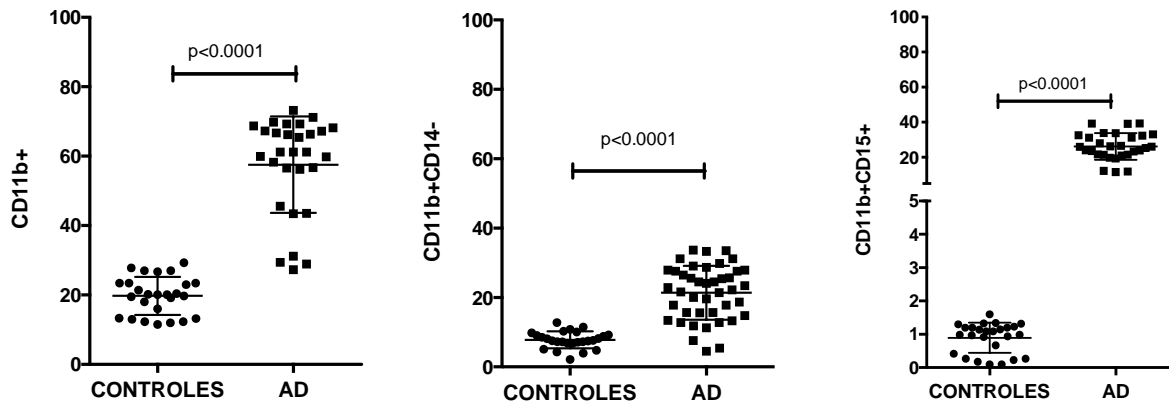


Figura 21.- Frecuencia de poblaciones mieloides en sangre circulante de pacientes adenocarcinoma pulmonar ($n=27$) comparados con controles ($n=25$). Se observa un incremento significativo ($p < 0.0001$) de las poblaciones $CD11b^+$, $CD11b^+CD15^+$; $CD11b^+CD14^-$ en el grupo de pacientes.

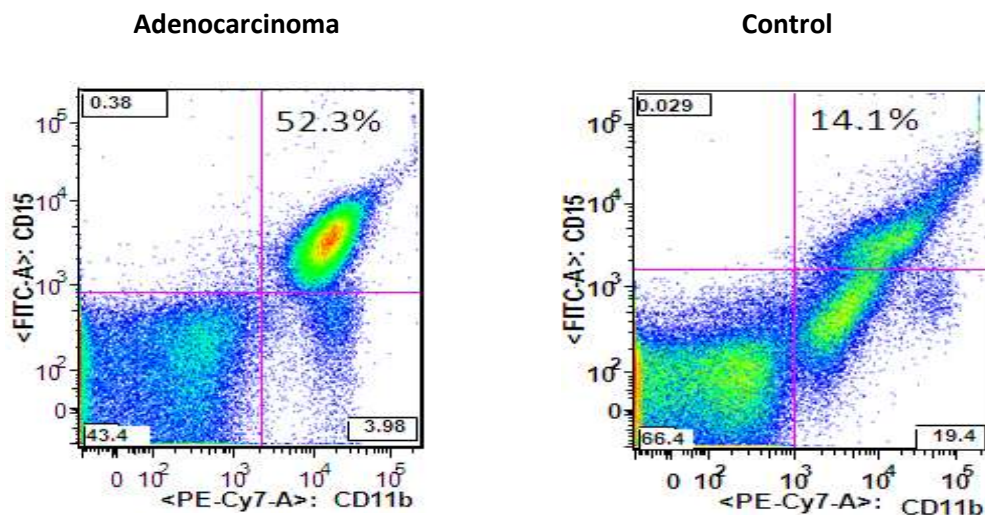


Figura 22. Ejemplo comparativo entre la población mieloides $CD11b^+CD15^+$ de un paciente con adenocarcinoma pulmonar en estadio IV y un sujeto control.

6.4 Incremento de la población supresora de origen mieloide

CD11b⁺CD14⁻CD66b⁺CD15⁺ en pacientes con adenocarcinoma en estadio IV.

Inicialmente el análisis de la población mieloide con fenotipo supresor CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺/CD66b⁺ presentes en la sangre circulante de ambos grupos de estudio, se realizó a partir de la población CD11b⁺/CD14⁻. Después se seleccionaron las células CD15⁺ y finalmente se analizó la expresión del marcador CD66b (Figura 23).

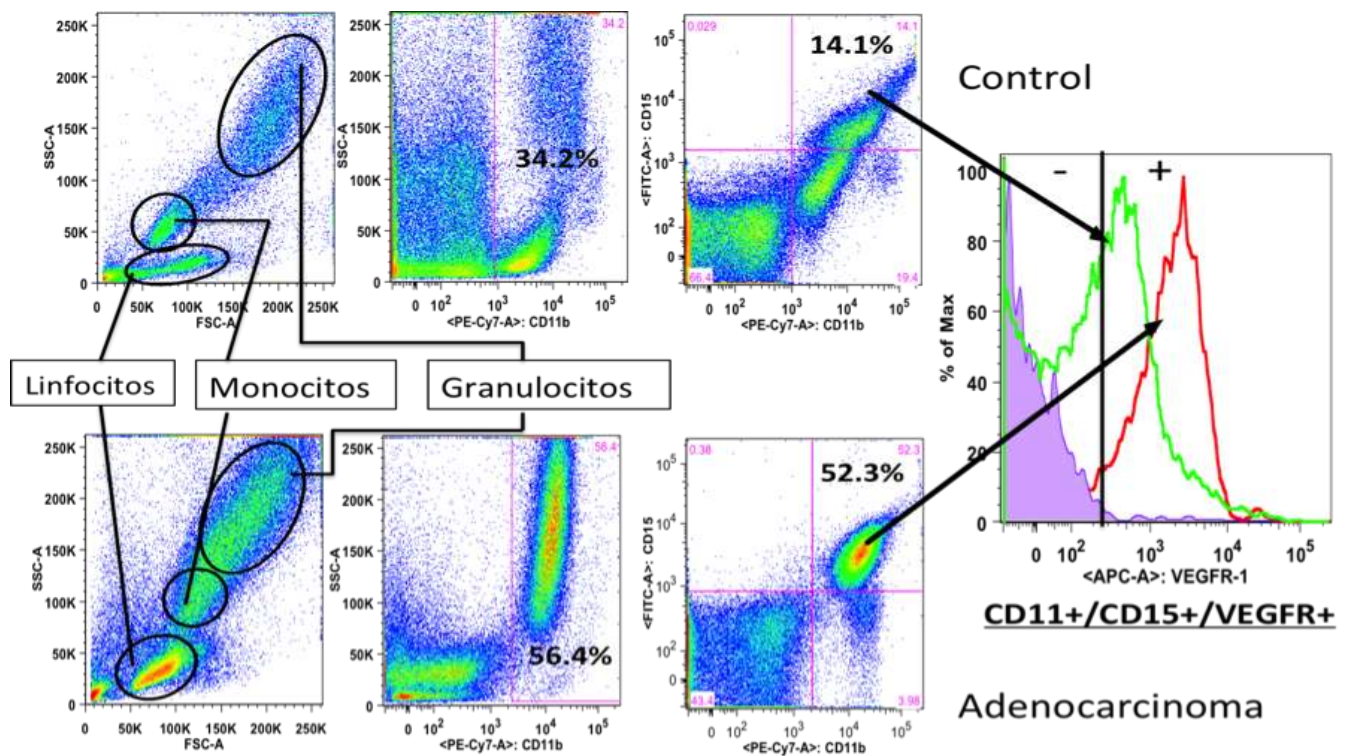


Figura 23.- Estrategia de análisis para la identificación de la población supresora de origen mieloide

La población circulante con fenotipo supresor CD11b⁺/CD14⁻/CD66b⁺/CD15⁺ mostro un incremento fuertemente significativo en los pacientes con adenocarcinoma pulmonar (media 33.5±14.9) en comparación con el grupo control (media 2.7±1.5) (p<0.0001) (Figura 24).

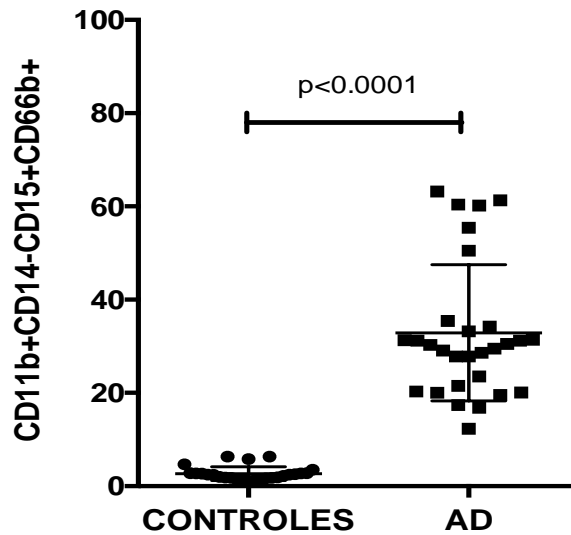


Figura 24.- La población con fenotipo supresor $CD11b^+CD14^-CD15^+CD66b^+$ se encuentra incrementada significativamente ($p < 0.0001$) en sangre circulante de pacientes con adenocarcinoma pulmonar ($n = 27$) libres de tratamiento, en comparación con sujetos control ($n = 25$).

6.5 Aumento de la expresión del VEGFR-1 en la población mieloide supresora $CD11b^+CD14^-CD66b^+CD15^+$ de pacientes con adenocarcinoma.

Se realizó el análisis de la Intensidad Media de Fluorescencia del receptor del factor de crecimiento vascular endotelial VEGFR en la población con fenotipo supresor $CD11b^+/CD14^-/CD15^+/CD66b^+$. Ésta intensidad se encontró incrementada significativamente ($p < 0.0001$) en pacientes con adenocarcinoma pulmonar en estadio IV libres de tratamiento (media 1021 ± 494) comparados con sujetos control (media 510 ± 185.2) (Figura 25a).

El incremento observado demuestra la sobreexpresión del receptor del VEGFR-1 en las células supresoras de origen mieloide de los pacientes (Figura 25b).

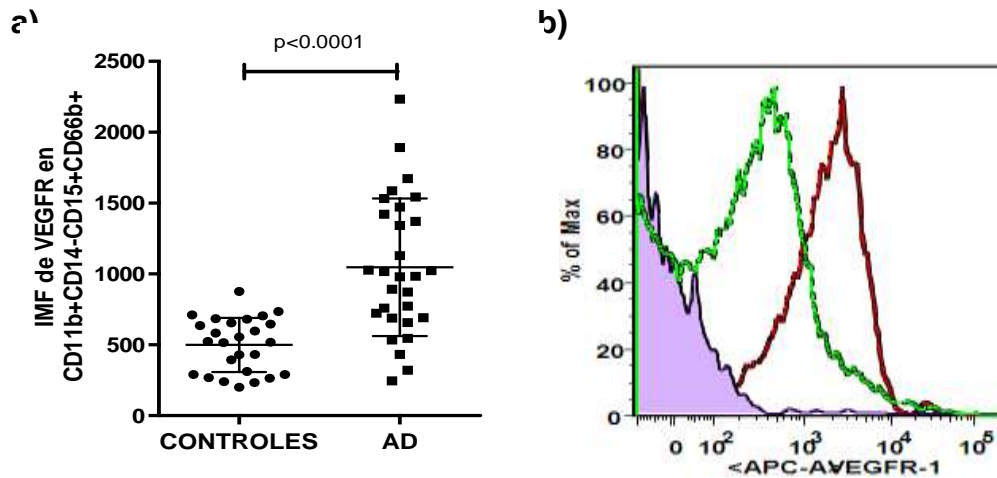


Figura 25.- Aumento en la expresión de VEGFR en la subpoblación CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺/CD66b⁺. **a)** Incremento significativo ($p < 0.0001$) de la Intensidad Media de Fluorescencia del VEGFR en pacientes con adenocarcinoma en estadio IV ($n = 25$) comparados con el grupo control ($n = 27$). **b)** Ejemplo comparativo de los histogramas de Intensidad Media de Fluorescencia entre un paciente (rojo) y un sujeto control (verde), Control de Isotipo (gris). (MFI: Mean Fluorescence Intensity).

6.6 Disminución de poblaciones linfocitarias en pacientes con adenocarcinoma pulmonar.

La caracterización fenotípica de las poblaciones linfoides CD3⁺, CD3⁺/CD4⁺ y CD3⁺/CD8⁺, se llevo a cabo sobre células mononucleares de sangre periférica de pacientes y controles. Para esto se jerarquizó a los distintos fenotipos de las poblaciones celulares linfoides mediante el análisis de la expresión de marcadores referidos en las células totales adquiridas. Los datos mostrados representan porcentajes de células positivas en una población total de 100,000 eventos para todas las muestras.

El análisis inicial se realizó a partir de una ventana en la que se mostraron los tipos celulares por tamaño y complejidad [Forward Scatter (FSC) vs. Side Scatter (SSC)]. Posteriormente se seleccionaron las células CD3⁺ y finalmente se analizó la expresión de los marcadores CD4 y CD8 (Figura 26).

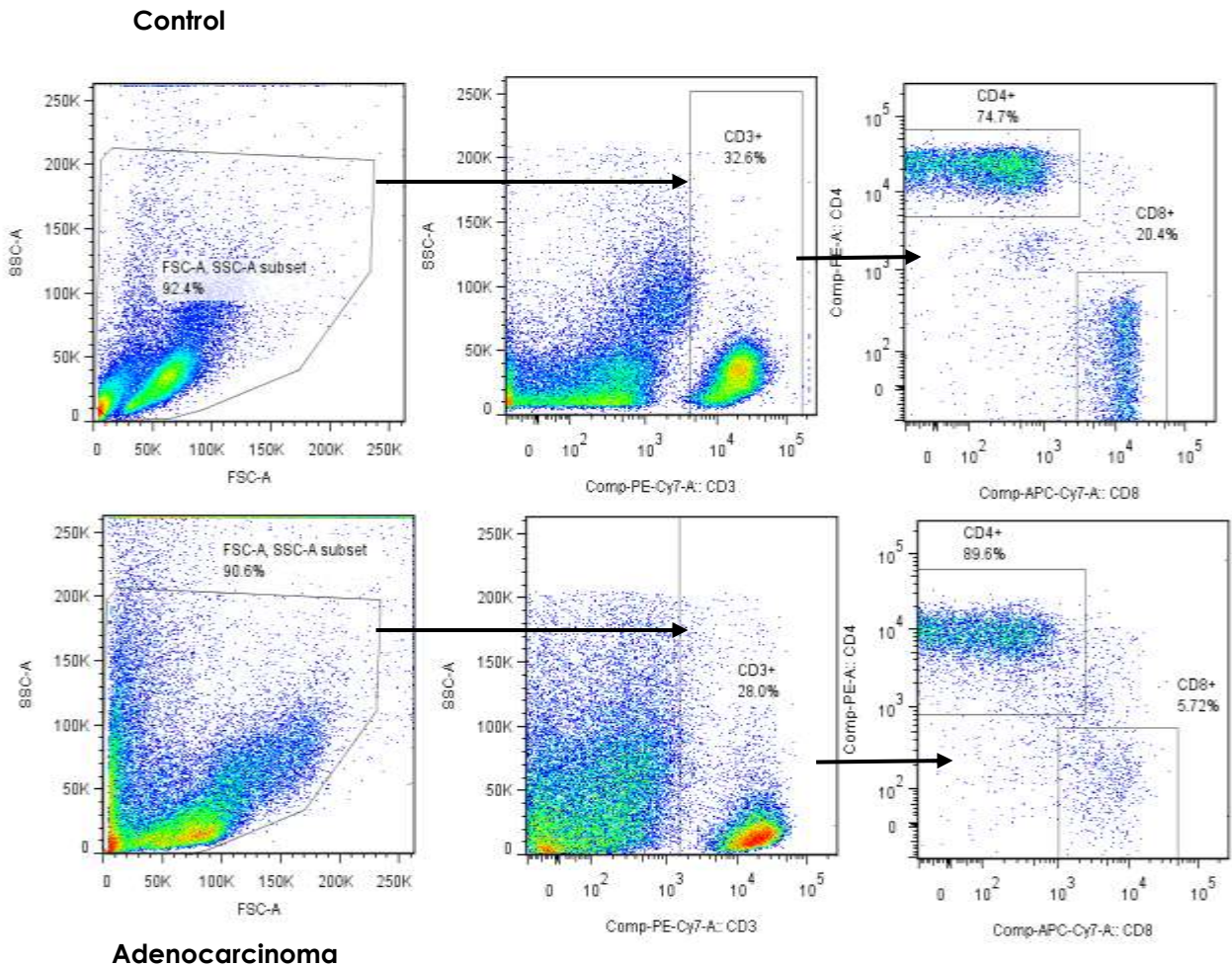


Figura 26.- Ejemplo representativo de la estrategia de análisis por citometría de flujo para la caracterización de las poblaciones linfoides. Se muestra la jerarquización de las PBMCs de sangre circulante en pacientes con adenocarcinoma pulmonar y sujetos control. A partir una selección inicial en la ventana de (FSC vs. SSC), la población linfocida CD3⁺ se somete al análisis de la expresión de los marcadores CD4 y CD8.

El análisis sobre células mononucleares de sangre periférica mostró una disminución significativa en la población de linfocitos T CD3⁺ totales en pacientes con adenocarcinoma pulmonar comparados con sujetos control ($p < 0.0001$). Adicionalmente los linfocitos T citotóxicos CD3⁺CD8⁺ de pacientes con cáncer pulmonar se encontraron disminuidos significativamente en comparación con el grupo control ($p < 0.001$). Así como la subpoblación de linfocitos T colaboradores CD3⁺CD4⁺ que también se encontró disminuida significativamente en pacientes comparados con controles ($p < 0.0001$) (Tbla 9) (Figura 27).

Tabla 9.- Poblaciones linfoides de pacientes con adenocarcinoma pulmonar y controles.

Población	Cáncer Pulmonar	Controles	P
CD3 ⁺	25.4 (14.2)	46.9 (±11.2)	<0.0001
CD3 ⁺ CD4 ⁺	30.0 (±11.3)	61.1 (±9.9)	<0.0001
CD3 ⁺ CD8 ⁺	19.5 (±8.0)	26.8 (±7.7)	<0.0001

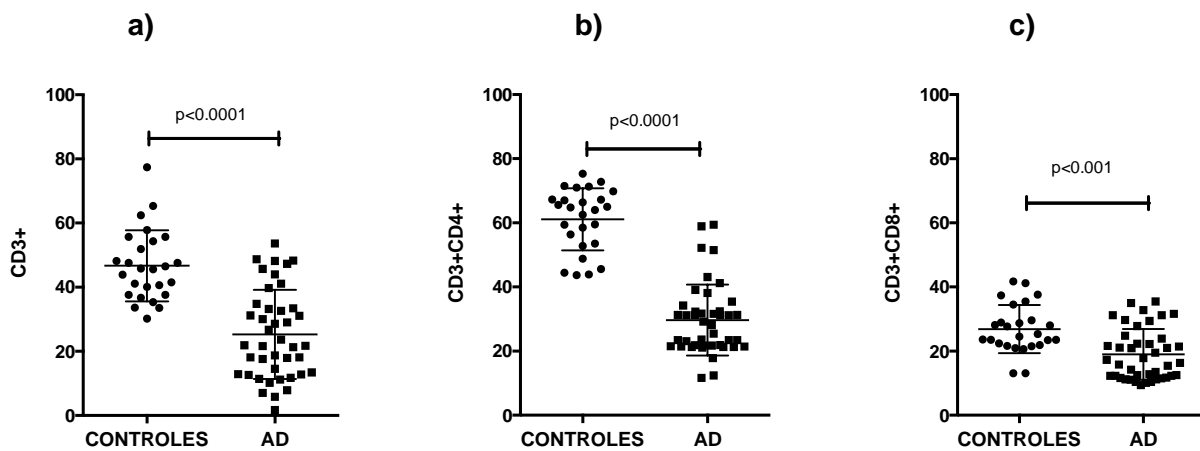


Figura 27.- Análisis de linfocitos sobre células mononucleares de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma y su correlación con el aumento de poblaciones mieloides. a) Disminución significativa ($p < 0.0001$) de células CD3⁺ totales en PBMCs de pacientes libres de tratamiento ($n = 40$) respecto a sujetos control ($n = 25$). b) Linfocitos CD3⁺CD8⁺ de pacientes se encontraron disminuidos significativamente ($p < 0.001$) en comparación con controles. c) Disminución significativa ($p < 0.0001$) de Linfocitos CD3⁺CD4⁺ en pacientes comparados con controles.

6.7 Disminución de la expresión de la cadena ζ en las subpoblaciones

CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar.

La determinación de la expresión intracelular basal de la cadena ζ del receptor CD3 en linfocitos T totales y en las subpoblaciones, CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ se llevo a cabo sobre células mononucleares de sangre periférica de 13 pacientes con adenocarcinoma y 10 sujetos sanos pareados por edad y sexo.

Inicialmente se reafirmaron las diferencias existentes entre las frecuencias de poblaciones linfocitarias de esta cohorte de pacientes con adenocarcinoma pulmonar y sujetos control. En donde se observó una disminución significativa de los linfocitos T CD3+ ($p=0.003$), linfocitos T CD3+CD4+ ($p=0.01$) y linfocitos T CD3+CD8+ ($p=0.007$) en pacientes comparados con controles. (Figura 28) (Tabla 10).

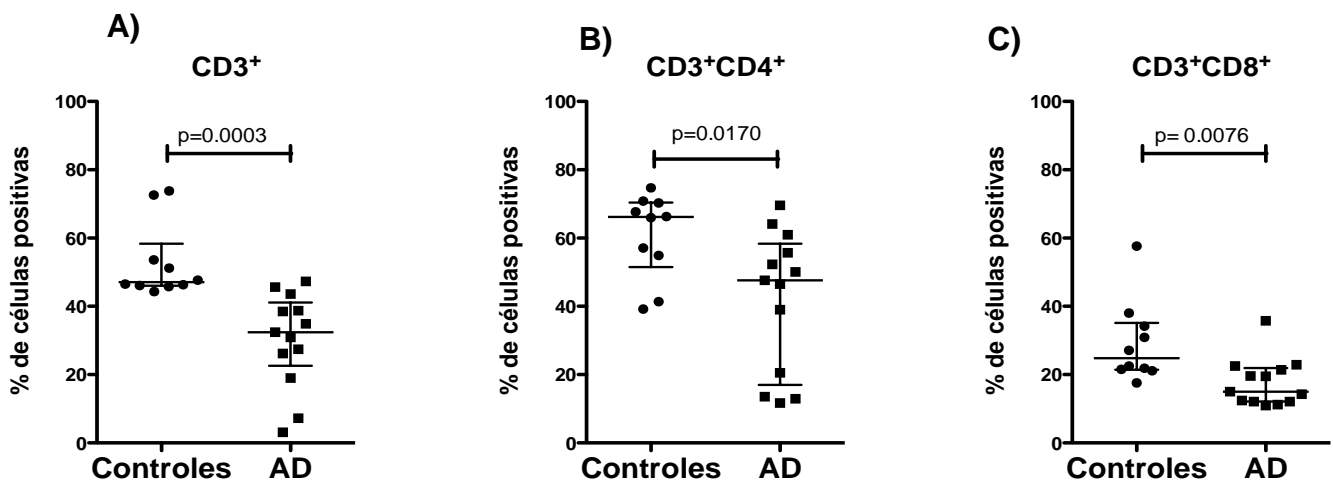


FIGURA 28.- Frecuencias de las subpoblaciones CD3+, CD3+CD4+ y CD3+CD8+ en pacientes con adenocarcinoma pulmonar (AD) y sujetos control.

Posteriormente se evaluaron las frecuencias de las poblaciones CD3+CD3 ζ +, CD3+CD4+ CD3 ζ + y CD3+CD8+ CD3 ζ + y la intensidad media de fluorescencia del marcador CD3 ζ + en las poblaciones anteriores presentes en las células mononucleares de sangre periférica de pacientes y controles.

Con este fin se estableció para ambos grupos de estudio, la siguiente estrategia de análisis; primero se delimitó la región en donde se localizaban los linfocitos, según su patrón de tamaño y complejidad (FSC-A vs SSC-A) (figura 29a). De esta región se selecciono la población CD3⁺ (figura 29b). Posteriormente se analizó la co-expresión del anticuerpo anti-CD3 ζ en la subpoblación de la región anterior (figura 29c). El análisis de las subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺ se realizó a partir de la subpoblación CD3 (figura 29d). Finalmente se analizó la expresión del CD3 ζ en las subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺ (figura 29e). En todos los casos se analizó la expresión del control de isotipo IgG (figura 29f).

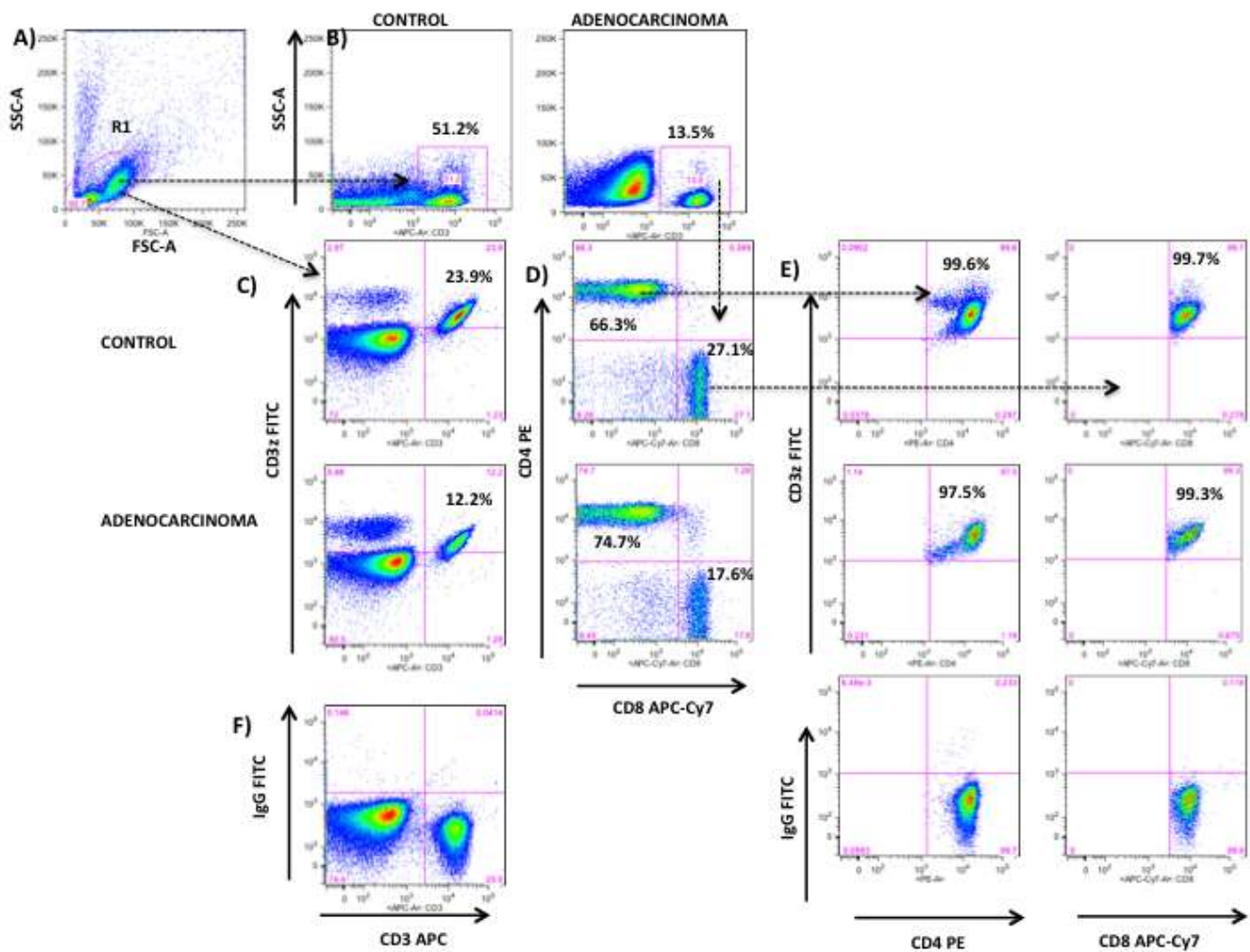
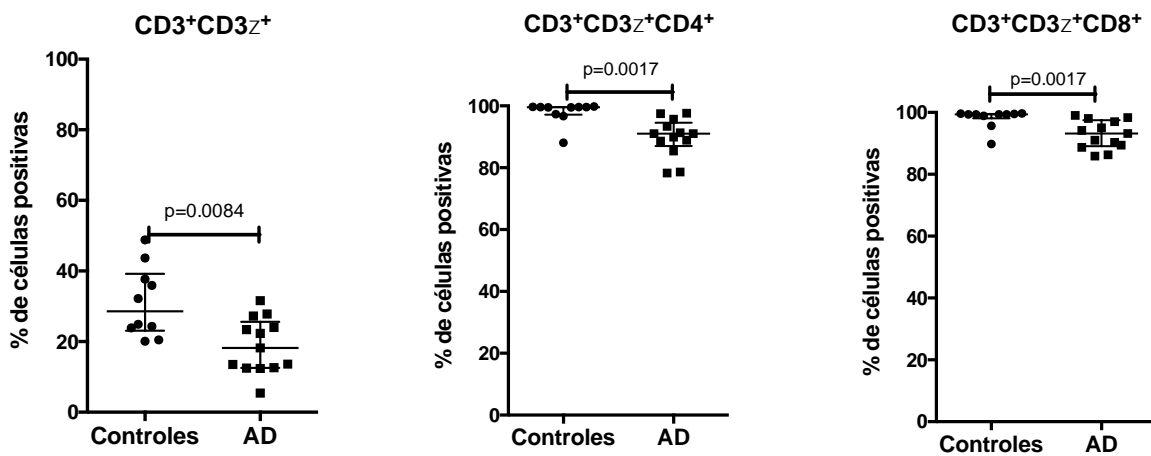


Figura 29. Estrategia de análisis por citometría de flujo para la expresión de la cadena z del receptor de células T CD3.

Se encontraron disminuciones significativas en las poblaciones $CD3^+CD3\zeta^+$ ($p= 0.008$), $CD3^+CD4^+CD3\zeta^+$ ($p= 0.0017$) y $CD3^+CD8^+CD3\zeta^+$ ($p= 0.0017$) de pacientes con adenocarcinoma pulmonar comparados con controles (figura 30a) (Tabla 10).

Sin embargo, el análisis de la intensidad media de fluorescencia indicó una disminución fuertemente significativa de la expresión del $CD3\zeta$ en las poblaciones de linfocitos T $CD3^+CD3\zeta^+$ (<0.0001), $CD3^+CD4^+CD3\zeta^+$ ($p=0.0004$) y $CD3^+CD8^+CD3\zeta^+$ ($p=0.007$) (Figura 30b y 31) (tabla10).

A)



B)

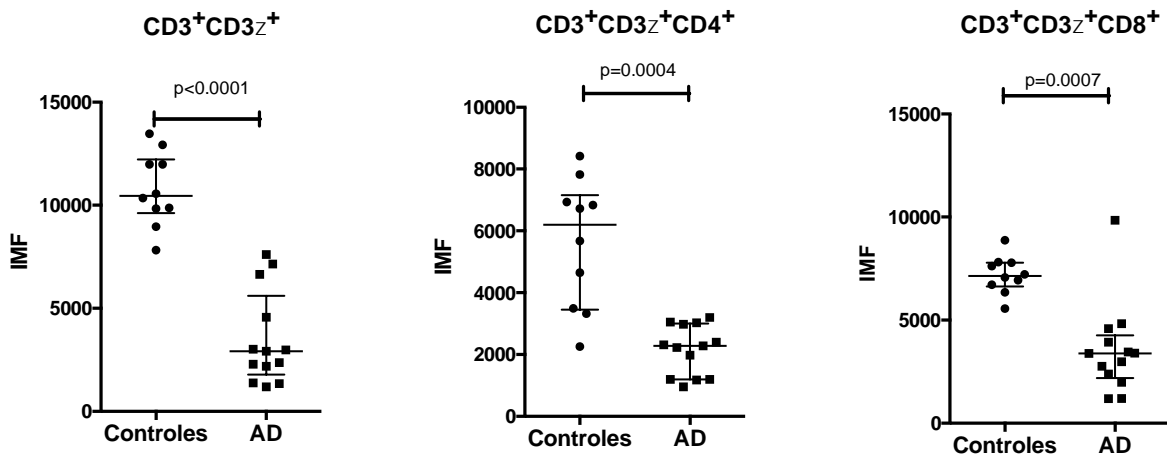


Figura 30.- Determinación de la expresión de la cadena ζ en células $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$ y $CD3^+CD8^+$ de pacientes con adenocarcinoma pulmonar (AD) y sujetos control. MFI: Mean Fluorescence Intensity.

Tabla 10. Frecuencia de las subpoblaciones de linfocitos T y expresión de la cadena ζ del receptor CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺.

	ADENOCARCINOMA (n=13)	CONTOLES (n=10)	<i>p</i>
% CD3 ⁺	32.4 (3.08-47.3)	47.1 (44.3-77.8)	0.003
% CD3 ⁺ CD3 ζ ⁺	18.20 (5.45-31.70)	28.55 (20.10-48.8)	0.008
% CD3 ⁺ CD4 ⁺	47.6 (11.7-69.6)	66.15 (39.2-74.7)	0.01
% CD4 ⁺ CD3 ζ ⁺	91 (78.3-97.6)	99.5 (88.1-99.8)	0.001
% CD3 ⁺ CD8 ⁺	15 (10.9-35.8)	24.8 (17.6-57.6)	0.007
% CD8 ⁺ CD3 ζ ⁺	93.2 (85.9-99)	99.4 (89.8-99.7)	0.001
CD3 ⁺ CD3 ζ ⁺ MFI	2918 (1194-7612)	10454 (7823-13465)	<0.0001
CD4 ⁺ CD3 ζ ⁺ MFI	2284 (956-3189)	6198 (2257-8421)	0.0004
CD8 ⁺ CD3 ζ ⁺ MFI	3392 (1184-9842)	7146 (5562-8874)	0.0007

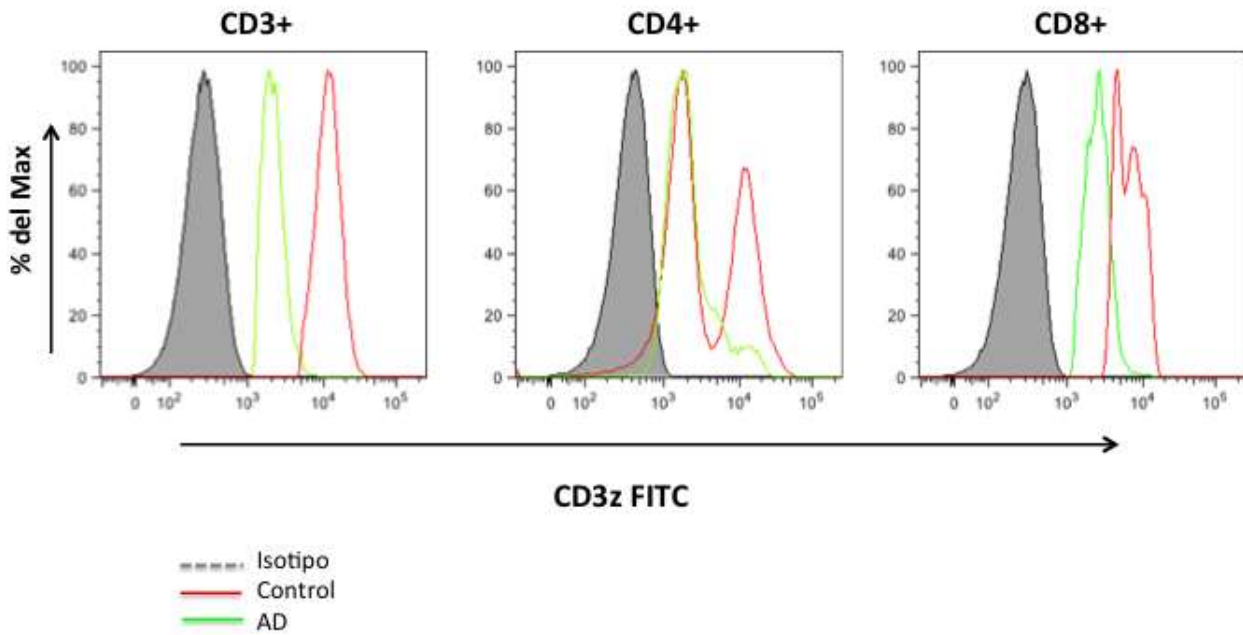


Figura 31. Ejemplo comparativo de la Intensidad media de fluorescencia de la cadena ζ del receptor CD3 en las poblaciones CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺ entre un paciente con adenocarcinoma pulmonary (AD) y un sujeto control.

6.8 Correlación entre el aumento de poblaciones mieloides y la disminución de linfocitos.

El análisis de poblaciones linfocitarias sobre PBMC's y mieloides sobre leucocitos totales en la sangre de pacientes con adenocarcinoma pulmonar en estadio IV libres de tratamiento, mostró una disminución en la frecuencia de linfocitos T totales CD3⁺ que correlaciona con el aumento de las poblaciones mieloides CD11b⁺ ($r=-0.5948$), CD11b⁺CD14⁺ ($r=-0.4731$), CD11b⁺CD15⁺ ($r=-0.6142$) (Figura 32).

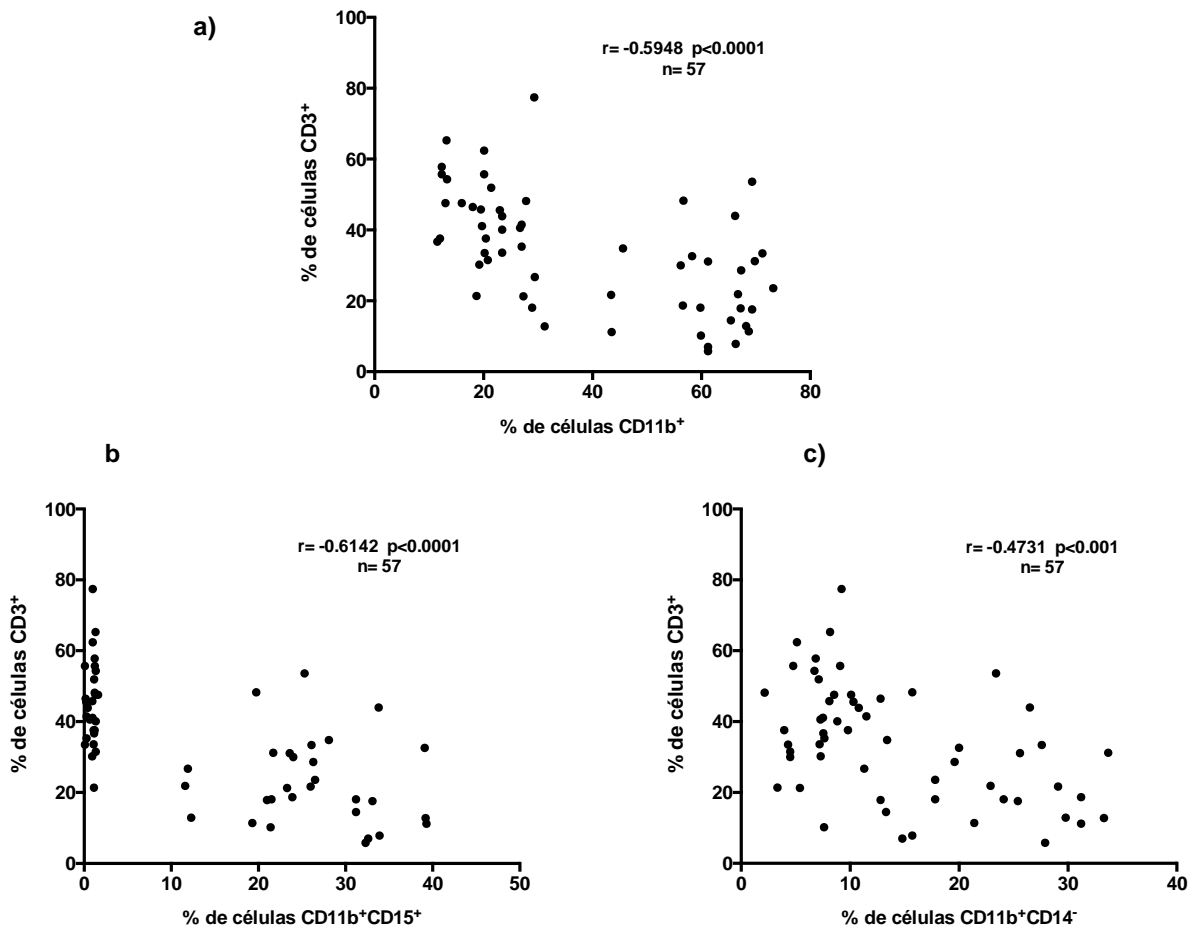


Figura 32. Correlación entre el aumento de las poblaciones CD11b⁺, CD11b⁺CD14⁺, CD11b⁺CD15⁺ y la disminución de la población CD3⁺ d

VII. DISCUSIÓN.

Las Células Supresoras de Origen Mieloide habían sido observadas y asociadas a cáncer desde la década de los 80s [105]. Este grupo celular está compuesto por varios tipos celulares de origen mielode inmaduros por lo que han sido blanco de estudio bajo diversos fenotipos y funciones, tanto en modelos tumorales como en diversos estudios en humano. La determinación de su nombre en 2007 [106] permitió su distinción de otras poblaciones como las células supresoras mieloides, células mieloides inmaduras, células supresoras naturales, entre otras. Las MDSCs han demostrado ser una población que actúa en un estado indiferenciado y tiene la capacidad de suprimir la respuesta inmune mediante mecanismos que siguen siendo descritos en la actualidad y que suman importancia al enfoque creciente sobre el entendimiento de estas poblaciones.

La acción supresora de esta fracción celular es dependiente de la sobre-regulación de factores inmunosupresores activados por las condiciones del microambiente tumoral y por el programa erróneo de diferenciación presente en estas poblaciones mieloides. Los principales daños que ejercen las MDSCs sobre las poblaciones inmunes maduras han sido atribuidos, desde las etapas iniciales de su observación, a los efectos producidos por la sobreexpresión de las enzimas arginasa-1 y Oxido Nitrico Sintasa. Esto se refleja en alteraciones moleculares a componentes del receptor de células T y al bloqueo de funciones vitales en estos últimos. Sin embargo, en la actualidad se han identificado más mecanismos con los que cuentan estas células para ejercer su efecto, dentro de los que destacan; el agotamiento de aminoácidos esenciales para el funcionamiento del sistema inmune, la generación de estrés oxidativo y sus importantes daños a componentes de células T, su participación en la disfunción de linfocitos T promoviendo principalmente la falta de expansión, proliferación, reclutamiento y circulación a ganglios linfáticos, así como induciendo apoptosis, anergia y senectud en estos elementos indispensables para la destrucción de células cancerosas. Aunado a esto, se ha demostrado que inducen fuertemente la expansión de linfocitos T reguladores y que su diferenciación en el tumor da origen a poblaciones mieloides supresoras con efectos más potentes [10].

Por otra parte la descripción y estudio de ambas fracciones de MDSCs, los sofisticados modelos *in vitro* e *in vivo* que las caracterizan, su implicación en estudios clínicos de casi

todos los tipos de cáncer y otros aspectos de reciente inclusión en este campo, suman relevancia a la inclusión de esta fracción celular dentro del estudio y manejo del cáncer en humanos.

Algunos aspectos biológicos propios de las células supresoras de origen mieloide, como la plasticidad de su diferenciación, los elementos genéticos y epigenéticos que determinan su actividad, la medida en que cada fracción de MDSCs ejerce su efecto, la especificidad con que lo ejerce, su participación en la carcinogénesis y sus funciones en órganos específicos, entre otros, siguen siendo investigados por diversos grupos en todo el mundo. Sin embargo sus niveles incrementados en sangre periférica, su relación con el avance de la enfermedad[104] y su manipulación con esquemas terapéuticos[10, 115] han propiciado que estas subpoblaciones sean empleadas como biomarcador de sobrevida, pronóstico, respuesta al tratamiento, carga tumoral y otros[56] [81].

Respecto al cáncer pulmonar se ha descrito que poblaciones con fenotipo supresor están presentes, de manera incrementada, en sitios del tumor y sangre periférica de portadores de tumores con diversas clasificaciones histopatológicas de cáncer de pulmón de células no pequeñas[13]. Si bien no se han llevado a cabo estudios que correlacionen con precisión las diferencias que existen entre las subclases de la enfermedad y el avance del estadio en cáncer pulmonar no microcítico, observaciones en otros tipos de cáncer pueden sugerir que los niveles de MDSCs se incrementan conforme avanza la enfermedad [112, 114, 115].

El presente estudio demuestra el incremento de la frecuencia de la población con fenotipo supresor **CD11b⁺CD14⁻CD66b⁺CD15⁺VEGFR⁺** en pacientes con adenocarcinoma pulmonar en estadio avanzados de la enfermedad. Las observaciones iniciales por citometría de flujo del incremento de poblaciones granulocíticas en muestras de pacientes comparadas con controles, permitió dirigir nuestro enfoque al análisis de subpoblaciones celulares correspondientes a la fracción polimorfonuclear de MDSCs. Este importante subgrupo de tipo granulocítico ha demostrado tener efectos relevantes durante el desarrollo de diversos tipos de tumores, interviniendo a nivel inmune y participando en la angiogénesis tumoral y la metástasis[23, 54, 66]. Esto es debido a su capacidad de infiltrar continuamente el tumor y a los potenciales efectos de supresión antígeno específica que pueden ejercer sobre linfocitos

T vírgenes y/o diferencialmente inmaduros, cuando estas vuelven a torrente sanguíneo y órganos linfáticos[11].

Adicionalmente el incremento significativo de más de una población con fenotipo supresor observado, indica que su participación puede estar afectando la respuesta de las poblaciones inmunes efectoras. Esta subpoblación se asocia fuertemente a potentes efectos inmunosupresores en paciente con cáncer renal[12], lo que sugiere que en cáncer pulmonar también pueden llevar a cabo su papel inmunosupresor y colaborar con otras poblaciones supresoras para evitar la evasión de la destrucción inmune del tumor.

Consistente con las evidencias obtenidas en otros tipos de cáncer en humano, las MDSCs de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar también presentan una reprogramación en la expresión de receptores celulares que participan en la sensibilización a los efectos que factores solubles derivados del tumor ejercen continuamente sobre su expansión y activación. Nuestros resultados demuestran como las células con el fenotipo supresor **CD11b⁺CD14⁻CD66b⁺CD15⁺** expresan niveles incrementados del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), que ha demostrado ser uno de los inductores de la activación de MDSCs. El que este receptor haya sumado importancia dentro de los factores que intervienen en la expansión y activación de MDSCs, se debe a que diversos tratamientos terapéuticos empleados en la actualidad, que bloquean la señalización, tienen efectos sobre sus frecuencias y funciones.

El panel de anticuerpos utilizados en presente estudio permitió identificar a la vez que las poblaciones mieloides con fenotipo **CD11b⁺**, **CD11b⁺CD15⁺** y **CD11b⁺CD14⁻** también se encuentran incrementadas significativamente en las muestras de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar libres de tratamiento. Estas poblaciones también se han observado incrementadas en pacientes con cáncer. Particularmente la población **CD11b⁺CD14⁻** fue recientemente identificada en cáncer de pulmón de células no pequeñas, manifestando una participación en la inactivación de linfocitos T [13].

Para resaltar la importancia que merece la inclusión de los niveles y funciones de las poblaciones mieloides supresoras dentro de la práctica clínica basta con mencionar que los

fármacos que modulan los efectos de estas células se han incrementado en más del doble durante los últimos años. Además, el empleo de los niveles periféricos de estas células como biomarcadores, también sigue en aumento. Respecto a la manipulación de las poblaciones supresoras que se practica actualmente en pacientes con cáncer, podemos observar que la capacidad de los fármacos para reducir sus niveles sanguíneos o bloquear su actividad, varían en su efectividad. Se ha observado que gran una cantidad de fármacos disminuyen los niveles de células supresoras de origen mieloide. Sin embargo el camino que sigue por delante lo siguen trazando aquellos esquemas terapéuticos que demuestran una eliminación y estabilización de las poblaciones celulares supresoras, lo cual se asocia a un mejor pronóstico para los pacientes [10].

Respecto a las poblaciones linfocitarias presentes en los pacientes con adenocarcinoma pulmonar, la disminución en la frecuencia de las subpoblaciones circulantes **CD3⁺**, **CD3⁺CD4⁺** y **CD3⁺CD8⁺**, puede sugerir una supresión en la proliferación de dichas subpoblaciones. Estos linfocitos también pueden estar sujetos a estados de anergia y falta de reclutamiento a sitios del tumor. Estos defectos en la actividad de los linfocitos han sido observados con anterioridad en cáncer pulmonar, demostrando que subpoblaciones especializadas en la destrucción de células cancerosas, no llevan a cabo su labor [13]. En este sentido se ha observado en distintos tipos de cáncer que adecuados niveles sanguíneos e infiltración de linfocitos T citotóxicos en el tumor, se asocian a pronósticos buenos de sobrevida, respuesta al tratamiento y retraso en la remisión de la enfermedad.

Adicionalmente la disminución en la expresión de la cadena ζ del receptor CD3 en la población de linfocitos T totales y en las subpoblaciones citotóxicas y colaboradoras que se observo en el presente estudio confirma que la ausencia de esta cadena puede afectar el reconocimiento de células tumorales [77]. Además, este elemento se expresa bajo condiciones apropiadas de proliferación y su ausencia es un indicativo de anergia celular. Al disminuir los niveles de expresión de dicha cadena las células T quedan potencialmente inactivadas para la destrucción del tumor.

Aunque pueden ser varios los factores que durante el desarrollo del cáncer pulmonar afectan las capacidades efectoras dependientes del receptor CD3 en linfocitos T de pacientes con adenocarcinoma pulmonar, la población **CD11b⁺CD14⁻** que se observó incrementada hace un año en pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas, demostró una capacidad para afectar la expresión de la cadena ζ del TCR en la membrana celular de linfocitos T CD8⁺ en muestras sanguíneas de una cohorte significativa de pacientes, la cual incluía a todos los subtipos histopatológicos de este tipo de cáncer pulmonar [13]. Estas evidencias confirman la afectación en la función de linfocitos T en nuestra cohorte de pacientes.

Es importante resaltar la necesidad de insistir en la investigación de aquellos elementos que participan reconocer la medida en la que las alteraciones sobre moléculas de linfocitos T maduros, es responsabilidad de los efectos que ejercen las células supresoras de origen mieloide sobre ellos, ya que otras condiciones propias del desarrollo tumoral como la hipoxia y la circulación de factores solubles derivados del tumor también alteran la función de los linfocitos T. Además, dado que la mayor parte de la información respecto a este aspecto corresponde al daño sobre células T CD8⁺ resultaría relevante profundizar en los efectos que las células supresoras pueden ejercer sobre otras poblaciones linfocitarias como los linfocitos colaboradores y las células B, ya que como observamos, la disminución de la población **CD4⁺** fue menor que la presente en células citotóxicas. Esto puede sugerir una susceptibilidad mayor de esta subpoblación a los efectos de poblaciones supresoras y a los factores derivados del tumor. O bien los mecanismos que manipula el tumor podrían ser particularmente específicos para alterar en mayor medida a células citotóxicas.

Adicionalmente, el empleo de índices que involucren a células del sistema inmune como factores pronósticos, es un campo en el que se debe avanzar. Un ejemplo reciente de estas herramientas lo representa la proporción Neutrófilos/Linfocitos que recomienda la Sociedad Americana de Oncología Clínica en Estados Unidos y el Centro para el Cuidado del Cáncer de Ontario Canadá. Dicha proporción resulta ser un fuerte factor predictivo de supervivencia después de la resección del tumor primario en cáncer pulmonar, permitiendo estadificar a aquellos pacientes de alto riesgo mediante un procedimiento de rutina y sin tener que emplear sofisticadas y costosas tecnologías [81]. La refinación de esta proporción para incrementar su relevancia y poder predictivo, podría llevarse a cabo considerando

únicamente a poblaciones neutrófilos supresores y poblaciones linfocitarias efectoras, excluyendo así, a neutrófilos efectores y linfocitos T reguladores.

Finalmente debemos considerar algunos aspectos clave que pueden ampliar el entendimiento de la función biológica de las células supresoras de origen mieloide en cáncer. En primer lugar se encuentra la importante necesidad de evaluar los niveles sanguíneos de poblaciones supresoras en pacientes con cáncer pulmonar en estadios tempranos. Esto permitiría comprobar que en este tipo de cáncer también se incrementan las poblaciones supresoras conforme avanza la enfermedad y conocer en que parte del proceso existe un mayor incremento. De manera simultánea, esto podría demostrar con certeza la correlación que existe entre la disminución de poblaciones linfocitarias y el aumento de poblaciones supresoras que se presenta durante la evolución de la enfermedad.

En segundo lugar la evaluación de tejido tumoral permitiría identificar la presencia y el estado de poblaciones supresoras asociadas al tumor y en particular las poblaciones granulocíticas. Es evidente que la fracción monocítica de las células supresoras de origen mieloide al llegar al tumor se diferencia a células dendríticas supresoras y macrófagos asociados al tumor. Sin embargo, aunque se sabe que la fracción granulocítica, compuesta principalmente por neutrófilos supresores, puede infiltrar el tumor y volver a torrente y ganglios linfáticos, no se ha descrito con claridad si estos alcanzan un estado de diferenciación posterior que les otorgue mayores capacidades supresoras como en el caso de macrófagos y células dendríticas. De ser así, podría proponer que la población granulocítica de células supresoras de origen mieloide que desemboca en neutrófilos supresores “maduros” se puede denominar “Neutrófilos Derivados del Tumor”. O bien, si el análisis sobre el tejido tumoral y un modelo bien diseñado permiten establecer si algunos neutrófilos supresores permanecen en el tumor evadiendo su recirculación a torrente y evitando apoptosis, podríamos estar hablando de “Neutrófilos Asociados al Tumor”.

El último aspecto involucra la relevancia que juega el profundizar en la caracterización genética y epigenética de estas subpoblaciones supresoras. La programación genética a la que son sujetas algunas poblaciones mieloides supresoras resulta en la inadecuada regulación de factores transcripcionales como STAT3 y STAT6 que modulan la expresión de

los factores inmunosupresores en el interior celular. De igual forma la regulación epigenética que se puede presentar en células mieloides a nivel de la activación de la proteína 3 con dominio desmetilasa (JMJD3), resulta en la desmetilación de la lisina 27 de la histona 3 en un *loci* específico que promueve la sobre expresión de Arg-1 y la polarización de macrófagos hacia un fenotipo [100]. Estas evidencias sugieren que las células supresoras de origen mieloides también están sujetas a alteraciones en sus mecanismos de regulación genética y epigenética. Sin duda, el avance que se obtenga de la investigación en estos campos, permitirá el diseño de mejores esquemas terapéuticos que actúen de manera específica en la sobre regulación de factores inmunosupresores presentes en células mieloides supresoras.

En conjunto estos aspectos pueden resolver el papel que juegan las células supresoras de origen mieloides en la biología del desarrollo tumoral, determinando si una plataforma de células supresoras es inducida y requerida para que se entable la progresión del cáncer ó si la desregulación de sus niveles y funciones son meramente producto del crecimiento tumoral.

Finalmente el seguimiento en la caracterización funcional de las poblaciones estudiadas en el presente proyecto permitirá incrementar el conocimiento referente a su comportamiento dentro del cáncer con mayor índice de mortalidad a escala global.

VIII. CONCLUSIONES

Se caracterizó a la subpoblación supresora de origen mieloide con fenotipo $CD11b^+CD14^-CD66b^+CD15^+$. Encontrándose incrementada en aproximadamente 10 veces su frecuencia en pacientes con adenocarcinoma pulmonar libres de tratamiento.

La caracterización de la subpoblación mieloide con fenotipo supresor $CD11b^+CD14^-CD66b^+CD15^+VEGFR^+$ demuestra un incremento significativo de la expresión del receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR) e la membrana celular de esta subpoblación.

Las subpoblaciones mieloides $CD11b^+$, $CD11b^+CD15^+$ y $CD11b^+CD14^-$ también se encontraron incrementadas en la sangre circulante de los pacientes con adenocarcinoma.

En cuanto a las poblaciones linfocitarias, se encontró una disminución de la población de linfocitos totales $CD3^+$ en las muestras de pacientes con adenocarcinoma. De igual forma, las subpoblaciones de linfocitos $CD3^+CD4^+$ y $CD3^+CD8^+$ se encuentran disminuidas significativamente en los pacientes con cáncer pulmonar respecto a sujetos control.

Las frecuencias de las poblaciones $CD3^+CD3\zeta^+$, $CD3^+CD4^+CD3\zeta^+$ y $CD3^+CD8^+CD3\zeta^+$, mostraron diferencias significativas, sin embargo, la intensidad media de fluorescencia analizada en las mismas subpoblaciones, mostró una disminución significativa aun mas fuerte en sujetos con adenocarcinoma comparados con sujetos control.

La disminución en la intensidad media de fluorescencia puede indicar una disminución en la densidad de la expresión de la cadena ζ del receptor $CD3$, lo que sugiere una potencial inactivación de las señales de proliferación al interior de los linfocitos T y un inadecuado reconocimiento antigénico de células tumorales.

Encontramos una correlación moderada entre la disminución de linfocitos T totales y el aumento de las subpoblaciones mieloides $CD11b^+$, $CD11b^+CD15^+$, $CD11b^+CD14^-$, Mientras que no existe una correlación entre la disminución de linfocitos $CD3^+CD8^+$ y el aumento de cualquiera de las poblaciones mieloides analizadas.

IX. REFERENCIAS

1. Kumar V, C.R., Robbins SL. , *Patología Estructural y Funcional*. Séptima Edición ed2005: McGraw-Hill Interamericana
2. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. . International journal of cancer., 2010. **127**((12)): p. 2893-917.
3. Warren, J.L., et al., *Evaluation of trends in the cost of initial cancer treatment*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(12): p. 888-97.
4. Alva LLF, C.V., García Sancho FC, *Epidemiología del cáncer pulmonar en México; hallazgos por imagen*. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 2003. **16**: p. 197-204.
5. Salud, S.d., *Programa de Acción específico 2007-2012. Cáncer de mama*. . 2008. <http://www.spps.gob.mx/programas-y-proyectos/cancer-de-mama.html>.
6. Cerecedo-Zapata C, L.D., Gonzaga R, . *Oncología clínica, genómica y epigenómica en cáncer broncogénico: Parte I*. Rev Inst Nal Enf Resp Mex,, 2009. **22**(43): p. 217-229.
7. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
8. Mouggiakakos, D., et al., *Regulatory T cells in cancer*. Adv Cancer Res, 2010. **107**: p. 57-117.
9. Kusmartsev, S. and D.I. Gabrilovich, *STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion*. J Immunol, 2005. **174**(8): p. 4880-91.
10. Gabrilovich, D.I., S. Ostrand-Rosenberg, and V. Bronte, *Coordinated regulation of myeloid cells by tumours*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 253-68.
11. Gabrilovich, D.I. and S. Nagaraj, *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(3): p. 162-74.
12. Rodriguez, P.C.e.a., *Arginase I producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes*. Cancer Res., 2009. **69**: p. 1553-1560.
13. Liu, C.Y., et al., *Population alterations of L-arginase- and inducible nitric oxide synthase-expressed CD11b+/CD14(-)/CD15+/CD33+ myeloid-derived suppressor cells and CD8+ T lymphocytes in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 2010. **136**(1): p. 35-45.
14. Greten, T.F., M.P. Manns, and F. Korangy, *Myeloid derived suppressor cells in human diseases*. Int Immunopharmacol, 2011. **11**(7): p. 802-7.
15. Croce, C.M., *Oncogenes and cancer*. N Engl J Med, 2008. **358**(5): p. 502-11.
16. OMS, *Organización Mundial de la Salud (2008). La lucha contra el cáncer tiene que ser una prioridad del desarrollo*. Documento revisado el 23 de enero de 2012.
17. OMS. *Organización Mundial de la Salud (2011). Cáncer. Nota descriptiva No. 297*. Documento revisado el 7 de enero de 2012; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>
18. Organización Mundial de la Salud [OMS] y Unión Internacional Contra el Cáncer . *Acción Mundial contra el Cáncer 2005, v.r.*; Documento revisado el 7 de enero de 2012:[Available from: <http://www.who.int/cancer/media/AccionMundialCancerfull.pdf>.
19. Herbst, R.S., J.V. Heymach, and S.M. Lippman, *Lung cancer*. N Engl J Med, 2008. **359**(13): p. 1367-80.
20. Bindea, G., et al., *Natural immunity to cancer in humans*. Curr Opin Immunol, 2010. **22**(2): p. 215-22.

21. Ferrone, C. and G. Dranoff, *Dual roles for immunity in gastrointestinal cancers*. J Clin Oncol, 2010. **28**(26): p. 4045-51.
22. Nelson, B.H., *The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes*. Immunol Rev, 2008. **222**: p. 101-16.
23. Pages, F., et al., *Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored*. Oncogene, 2010. **29**(8): p. 1093-102.
24. Yang, L., Y. Pang, and H.L. Moses, *TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression*. Trends Immunol, 2010. **31**(6): p. 220-7.
25. Shields, J.D., et al., *Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21*. Science, 2010. **328**(5979): p. 749-52.
26. Finn, O.J., *Cancer immunology*. N Engl J Med, 2008. **358**(25): p. 2704-15.
27. Travis WD, B.E., Müller-Hermelink HK, Harris and CC., (Eds.): *World Health Organization Classification*

of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of

the Lung, Pleura, Thymus and Heart. IARC Press:Lyon 2004.

28. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2012. **62**(1): p. 10-29.
29. Khuder, S.A., *Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis*. Lung Cancer, 2001. **31**(2-3): p. 139-48.
30. Carrión Valero F, H.H.J., *El tabaquismo pasivo en adultos*. Arch Bronconeumol, 2002. **38**: p. 137-46.
31. López MJ, N.M., *Tabaquismo pasivo: un riesgo ignorado*. Med Clin (Barc), 2004. **123**(503): p. 4.
32. Alberg, A.J. and J.M. Samet, *Epidemiology of lung cancer*. Chest, 2003. **123**(1 Suppl): p. 21S-49S.
33. Sun S, S.J., Gazdar AF. , *Lung cancer in never smokers: a different disease*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**: p. 778-790.
34. IARC. *International Agency for Research on Cancer. Overall evaluations of carcinogenicity to humans*. 2005; Available from: <http://www.iarc.fr>.
35. Maggiore, C., et al., *Histological classification of lung cancer*. Rays, 2004. **29**(4): p. 353-5.
36. Travis WD, B.E., Müller-Hermelink HK, Harris CC. , *Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*, ed. E.W.H.O.C.o. Tumours. Press: Lyon . 2004: IARC.
37. Groome, P.A., et al., *The IASLC Lung Cancer Staging Project: validation of the proposals for revision of the T, N, and M descriptors and consequent stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours*. J Thorac Oncol, 2007. **2**(8): p. 694-705.
38. Rusch, V.W., et al., *The IASLC lung cancer staging project: a proposal for a new international lymph node map in the forthcoming seventh edition of the TNM classification for lung cancer*. J Thorac Oncol, 2009. **4**(5): p. 568-77.
39. Goldstraw P, *Staging Manual in Thoracic Oncology*. 2009.
40. Shepherd, F.A., et al., *The International Association for the Study of Lung Cancer lung cancer staging project: proposals regarding the clinical staging of small cell lung cancer in the forthcoming (seventh) edition of the tumor, node, metastasis classification for lung cancer*. J Thorac Oncol, 2007. **2**(12): p. 1067-77.
41. Travis WD, G.D., Chansky K, Crowley J, Asamura H, Brambilla E, et al., *The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the inclusion of bronchopulmonary*

carcinoid tumors in the forthcoming (seventh) edition of the TNM

Classification for Lung Cancer. J Thoraces Ono., 2008. **3**(23): p. 1213.

42. Harewood, G.C., et al., *Economic analysis of combined endoscopic and endobronchial ultrasound in the evaluation of patients with suspected non-small cell lung cancer.* Lung Cancer, 2010. **67**(3): p. 366-71.

43. Quint LE, F.I., Gross BH., *Conventional imaging of non-small cell lung*

cancer. . Lung Cancer. Principles and Practice, 2005: p. 315-44.

44. Tournoy, K.G., et al., *Integrated FDG-PET/CT does not make invasive staging of the intrathoracic lymph nodes in non-small cell lung cancer redundant: a prospective study.* Thorax, 2007. **62**(8): p. 696-701.

45. Pfister DG, J.D., Azzoli ChG, Sause W, Smith TJ, Baker Jr SH, et al. , *Treatment of unresectable non-small cell lung*

cancer guideline: update 2003. J Clin Oncol., 2004. **22**(330): p. 53.

46. Larsen, S.S., et al., *Endoscopic ultrasound guided biopsy performed routinely in lung cancer staging spares futile thoracotomies: preliminary results from a randomised clinical trial.* Lung Cancer, 2005. **49**(3): p. 377-85.

47. Schwartz, A.M. and D.E. Henson, *Diagnostic surgical pathology in lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition).* Chest, 2007. **132**(3 Suppl): p. 78S-93S.

48. Lardinois, D., et al., *ESTS guidelines for intraoperative lymph node staging in non-small cell lung cancer.* Eur J Cardiothorac Surg, 2006. **30**(5): p. 787-92.

49. Sanchez de Cos, J., et al., *SEPAR guidelines for lung cancer staging.* Arch Bronconeumol, 2011. **47**(9): p. 454-65.

50. Brock, M.V., et al., *DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer.* N Engl J Med, 2008. **358**(11): p. 1118-28.

51. Benlloch, S., et al., *Expression of molecular markers in mediastinal nodes from resected stage I non-small-cell lung cancer (NSCLC): prognostic impact and potential role as markers of occult micrometastases.* Ann Oncol, 2009. **20**(1): p. 91-7.

52. Pages, F., et al., *Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer.* N Engl J Med, 2005. **353**(25): p. 2654-66.

53. Zhang, L., et al., *Intratatumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer.* N Engl J Med, 2003. **348**(3): p. 203-13.

54. Kowanetz, M., et al., *Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung metastasis through mobilization of Ly6G+Ly6C+ granulocytes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(50): p. 21248-55.

55. Pinzon-Charry, A., T. Maxwell, and J.A. Lopez, *Dendritic cell dysfunction in cancer: a mechanism for immunosuppression.* Immunol Cell Biol, 2005. **83**(5): p. 451-61.

56. Suzuki, K., et al., *Prognostic immune markers in non-small cell lung cancer.* Clin Cancer Res, 2011. **17**(16): p. 5247-56.

57. Kataki, A., et al., *Tumor infiltrating lymphocytes and macrophages have a potential dual role in lung cancer by supporting both host-defense and tumor progression.* J Lab Clin Med, 2002. **140**(5): p. 320-8.

58. Mori, M., et al., *Infiltration of CD8+ T cells in non-small cell lung cancer is associated with dedifferentiation of cancer cells, but not with prognosis.* Tohoku J Exp Med, 2000. **191**(2): p. 113-8.

59. Trojan, A., et al., *Immune activation status of CD8+ T cells infiltrating non-small cell lung cancer.* Lung Cancer, 2004. **44**(2): p. 143-7.

60. Shortman, K. and W.R. Heath, *The CD8+ dendritic cell subset*. Immunol Rev, 2010. **234**(1): p. 18-31.
61. Swiecki, M. and M. Colonna, *Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance*. Immunol Rev, 2010. **234**(1): p. 142-62.
62. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 958-69.
63. Mantovani, A., et al., *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. Trends Immunol, 2002. **23**(11): p. 549-55.
64. Coussens, L.M. and J.W. Pollard, *Leukocytes in mammary development and cancer*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(3).
65. Qian, B.Z. and J.W. Pollard, *Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis*. Cell, 2010. **141**(1): p. 39-51.
66. Murdoch, C., et al., *The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(8): p. 618-31.
67. Gabrilovich, D., *Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(12): p. 941-52.
68. Perrot, I., et al., *Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2763-9.
69. Pinzon-Charry, A., et al., *Numerical and functional defects of blood dendritic cells in early- and late-stage breast cancer*. Br J Cancer, 2007. **97**(9): p. 1251-9.
70. Bellone, G., et al., *Cooperative induction of a tolerogenic dendritic cell phenotype by cytokines secreted by pancreatic carcinoma cells*. J Immunol, 2006. **177**(5): p. 3448-60.
71. Yang, M., et al., *HIF-dependent induction of adenosine receptor A2b skews human dendritic cells to a Th2-stimulating phenotype under hypoxia*. Immunol Cell Biol, 2010. **88**(2): p. 165-71.
72. Norian, L.A., et al., *Tumor-infiltrating regulatory dendritic cells inhibit CD8+ T cell function via L-arginine metabolism*. Cancer Res, 2009. **69**(7): p. 3086-94.
73. Watkins, S.K., et al., *FOXO3 programs tumor-associated DCs to become tolerogenic in human and murine prostate cancer*. J Clin Invest, 2011. **121**(4): p. 1361-72.
74. Mantovani, A. and A. Sica, *Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity*. Curr Opin Immunol, 2010. **22**(2): p. 231-7.
75. Steidl, C., et al., *Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma*. N Engl J Med, 2010. **362**(10): p. 875-85.
76. Qian, B., et al., *A distinct macrophage population mediates metastatic breast cancer cell extravasation, establishment and growth*. PLoS One, 2009. **4**(8): p. e6562.
77. Rodriguez, P.C., et al., *Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses*. Cancer Res, 2004. **64**(16): p. 5839-49.
78. Movahedi, K., et al., *Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes*. Cancer Res, 2010. **70**(14): p. 5728-39.
79. Pucci, F., et al., *A distinguishing gene signature shared by tumor-infiltrating Tie2-expressing monocytes, blood "resident" monocytes, and embryonic macrophages suggests common functions and developmental relationships*. Blood, 2009. **114**(4): p. 901-14.
80. Hagemann, T., et al., *Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype*. J Immunol, 2006. **176**(8): p. 5023-32.
81. Sarraf, K.M., et al., *Neutrophil/lymphocyte ratio and its association with survival after complete resection in non-small cell lung cancer*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2009. **137**(2): p. 425-8.

82. Nozawa, H., C. Chiu, and D. Hanahan, *Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(33): p. 12493-8.
83. Houghton, A.M., et al., *Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth*. Nat Med, 2010. **16**(2): p. 219-23.
84. Fridlender, Z.G., et al., *Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN*. Cancer Cell, 2009. **16**(3): p. 183-94.
85. De Santo, C., et al., *Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A*. Nat Immunol, 2010. **11**(11): p. 1039-46.
86. Sica, A. and V. Bronte, *Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development*. J Clin Invest, 2007. **117**(5): p. 1155-66.
87. Marigo, I., et al., *Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBPbeta transcription factor*. Immunity, 2010. **32**(6): p. 790-802.
88. Gallina, G., et al., *Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells*. J Clin Invest, 2006. **116**(10): p. 2777-90.
89. Shojaei, F., et al., *Bv8 regulates myeloid-cell-dependent tumour angiogenesis*. Nature, 2007. **450**(7171): p. 825-31.
90. Huang, B., et al., *CCL2/CCR2 pathway mediates recruitment of myeloid suppressor cells to cancers*. Cancer Lett, 2007. **252**(1): p. 86-92.
91. Molon, B., et al., *Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells*. J Exp Med, 2011. **208**(10): p. 1949-62.
92. Yang, L., et al., *Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis*. Cancer Cell, 2008. **13**(1): p. 23-35.
93. Zhang, H.G. and W.E. Grizzle, *Exosomes and cancer: a newly described pathway of immune suppression*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(5): p. 959-64.
94. Nefedova, Y., et al., *Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer*. J Immunol, 2004. **172**(1): p. 464-74.
95. Poschke, I., et al., *Immature immunosuppressive CD14+HLA-DR-/low cells in melanoma patients are Stat3hi and overexpress CD80, CD83, and DC-sign*. Cancer Res, 2010. **70**(11): p. 4335-45.
96. Wang, T., et al., *Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells*. Nat Med, 2004. **10**(1): p. 48-54.
97. Yu, H., D. Pardoll, and R. Jove, *STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(11): p. 798-809.
98. Cheng, P., et al., *Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein*. J Exp Med, 2008. **205**(10): p. 2235-49.
99. Movahedi, K., et al., *Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity*. Blood, 2008. **111**(8): p. 4233-44.
100. Ishii, M., et al., *Epigenetic regulation of the alternatively activated macrophage phenotype*. Blood, 2009. **114**(15): p. 3244-54.
101. Liu, Y., et al., *Contribution of MyD88 to the tumor exosome-mediated induction of myeloid derived suppressor cells*. Am J Pathol, 2010. **176**(5): p. 2490-9.
102. Eruslanov, E., et al., *Pivotal Advance: Tumor-mediated induction of myeloid-derived suppressor cells and M2-polarized macrophages by altering intracellular PGE(2) catabolism in myeloid cells*. J Leukoc Biol, 2010. **88**(5): p. 839-48.
103. Rodriguez, P.C., et al., *Arginase 1 in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma*. J Exp Med, 2005. **202**(7): p. 931-9.

104. Diaz-Montero, C.M., et al., *Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy*. *Cancer Immunol Immunother*, 2009. **58**(1): p. 49-59.
105. Young, M.R., M. Newby, and H.T. Wepsic, *Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors*. *Cancer Res*, 1987. **47**(1): p. 100-5.
106. Gabrilovich, D.I., et al., *The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells*. *Cancer Res*, 2007. **67**(1): p. 425; author reply 426.
107. Huang, B., et al., *Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host*. *Cancer Res*, 2006. **66**(2): p. 1123-31.
108. Brandau, S., et al., *Myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of cancer patients contain a subset of immature neutrophils with impaired migratory properties*. *J Leukoc Biol*, 2011. **89**(2): p. 311-7.
109. Youn, J.I., et al., *Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice*. *J Immunol*, 2008. **181**(8): p. 5791-802.
110. Condamine, T. and D.I. Gabrilovich, *Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function*. *Trends Immunol*, 2011. **32**(1): p. 19-25.
111. Bronte, V., et al., *IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice*. *J Immunol*, 2003. **170**(1): p. 270-8.
112. Mandruzzato, S., et al., *IL4Ralpha+ myeloid-derived suppressor cell expansion in cancer patients*. *J Immunol*, 2009. **182**(10): p. 6562-8.
113. Kusmartsev, S., et al., *Reversal of myeloid cell-mediated immunosuppression in patients with metastatic renal cell carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(24): p. 8270-8.
114. Vuk-Pavlovic, S., et al., *Immunosuppressive CD14+HLA-DRlow/- monocytes in prostate cancer*. *Prostate*, 2010. **70**(4): p. 443-55.
115. Serafini, P., et al., *Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function*. *J Exp Med*, 2006. **203**(12): p. 2691-702.
116. Wu, G. and S.M. Morris, Jr., *Arginine metabolism: nitric oxide and beyond*. *Biochem J*, 1998. **336** (Pt 1): p. 1-17.
117. Bronte, V. and P. Zanovello, *Regulation of immune responses by L-arginine metabolism*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(8): p. 641-54.
118. Bronte, V., et al., *L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions*. *Trends Immunol*, 2003. **24**(6): p. 302-6.
119. Watanabe, S., et al., *Tumor-induced CD11b+Gr-1+ myeloid cells suppress T cell sensitization in tumor-draining lymph nodes*. *J Immunol*, 2008. **181**(5): p. 3291-300.
120. Mazzoni, A., et al., *Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism*. *J Immunol*, 2002. **168**(2): p. 689-95.
121. Schmielau, J. and O.J. Finn, *Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients*. *Cancer Res*, 2001. **61**(12): p. 4756-60.
122. Nagaraj, S., et al., *Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer*. *Nat Med*, 2007. **13**(7): p. 828-35.
123. Monu, N. and A.B. Frey, *Suppression of proximal T cell receptor signaling and lytic function in CD8+ tumor-infiltrating T cells*. *Cancer Res*, 2007. **67**(23): p. 11447-54.
124. Flinger, J., J. Blum, and T.W. Jungi, *Induction of intracellular arginase activity does not diminish the capacity of macrophages to produce nitric oxide in vitro*. *Immunobiology*, 1999. **200**(2): p. 169-86.

125. Hanson, E.M., et al., *Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells*. J Immunol, 2009. **183**(2): p. 937-44.
126. Sakuishi, K., et al., *Emerging Tim-3 functions in antimicrobial and tumor immunity*. Trends Immunol, 2011. **32**(8): p. 345-9.
127. Li, H., et al., *Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1*. J Immunol, 2009. **182**(1): p. 240-9.
128. Hoechst, B., et al., *Myeloid derived suppressor cells inhibit natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma via the NKp30 receptor*. Hepatology, 2009. **50**(3): p. 799-807.
129. Elkabets, M., et al., *IL-1beta regulates a novel myeloid-derived suppressor cell subset that impairs NK cell development and function*. Eur J Immunol, 2010. **40**(12): p. 3347-57.
130. Pan, P.Y., et al., *Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer*. Cancer Res, 2010. **70**(1): p. 99-108.
131. Serafini, P., et al., *Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells*. Cancer Res, 2008. **68**(13): p. 5439-49.
132. Hoechst, B., et al., *Plasticity of human Th17 cells and iTregs is orchestrated by different subsets of myeloid cells*. Blood, 2011. **117**(24): p. 6532-41.
133. Sinha, P., et al., *Myeloid-derived suppressor cells express the death receptor Fas and apoptose in response to T cell-expressed FasL*. Blood, 2011. **117**(20): p. 5381-90.
134. Corzo, C.A., et al., *HIF-1alpha regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment*. J Exp Med, 2010. **207**(11): p. 2439-53.
135. Doedens, A.L., et al., *Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha suppresses T-cell function and promotes tumor progression*. Cancer Res, 2010. **70**(19): p. 7465-75.
136. Nagaraj, S., et al., *Antigen-specific CD4(+) T cells regulate function of myeloid-derived suppressor cells in cancer via retrograde MHC class II signaling*. Cancer Res, 2012. **72**(4): p. 928-38.
137. Haile, L.A., et al., *Myeloid-derived suppressor cells in inflammatory bowel disease: a new immunoregulatory pathway*. Gastroenterology, 2008. **135**(3): p. 871-81, 881 e1-5.
138. Kusmartsev, S., S. Nagaraj, and D.I. Gabrilovich, *Tumor-associated CD8+ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells*. J Immunol, 2005. **175**(7): p. 4583-92.
139. Youn, J.I., et al., *Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice*. J Leukoc Biol, 2012. **91**(1): p. 167-81.
140. Lu, T., et al., *Tumor-infiltrating myeloid cells induce tumor cell resistance to cytotoxic T cells in mice*. J Clin Invest, 2011. **121**(10): p. 4015-29.
141. Narita, Y., et al., *Potential differentiation of tumor bearing mouse CD11b+Gr-1+ immature myeloid cells into both suppressor macrophages and immunostimulatory dendritic cells*. Biomed Res, 2009. **30**(1): p. 7-15.