



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

CURSO DE ESPECIALIDAD EN ONCOLOGÍA MÉDICA

**EVALUACIÓN DE LA SOBRE-EXPRESIÓN DE CD47 COMO
MECANISMO DE EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN
CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS Y SU
POSIBLE UTILIDAD COMO BLANCO TERAPÉUTICO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
SUBESPECIALISTA EN ONCOLOGÍA MÉDICA**

PRESENTA:

DRA. MARYTERE HERRERA MARTÍNEZ

**DR. OSCAR GERARDO ARRIETA RODRÍGUEZ
TUTOR PRINCIPAL DE TESIS**

**DRA. LOURDES MARÍA BARRERA RAMÍREZ
COMITÉ TUTOR**



MÉXICO, D.F.

2013



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.

**EVALUACIÓN DE LA SOBRE-EXPRESIÓN DE CD47 COMO MECANISMO DE
EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN CÁNCER DE PULMÓN Y SU POSIBLE
UTILIDAD COMO BLANCO TERAPÉUTICO**

Dra. Marytere Herrera Martínez

Vo.Bo.

Dr. Oscar Gerardo Arrieta Rodríguez

Asesor de Tesis

Vo.Bo.

Dra. Sylvia Verónica Villavicencio Valencia

Subdirección de Educación Médica

DEDICATORIA

Primero, a Dios, por guiarme por este camino que me ha dado tantas satisfacciones y me ha hecho crecer tanto personal, como académicamente, por permitirme contar con familia y amigos con los que puedo ver culminado este sueño.

A mis padres; Papa, gracias a tu ejemplo, dedicación durante tantos años, esfuerzos y sacrificios finalmente me he convertido en la mujer que siempre quise ser; Mama que incondicionalmente me has apoyado tanto en los buenos como en los malos momentos, sin tu compañía no hubiera logrado ser quien ahora soy. Sin dejar atrás a mi Hermana, que aunque siendo más pequeña, me has enseñado grandes lecciones de vida, siempre dando lo mejor de ti y siempre recordándome quien verdaderamente soy.

A mis primos, que a pesar de lágrimas, siempre tienen el modo de hacerme sonreír y hacerme ver que siempre existe otro día para ser mejor persona. A mi abuelito que desde el cielo me cuida, aunque ya no estás presente siempre siento tu apoyo.

A mis amigos que nunca dejaron que me rindiera, a mis maestros, muy especialmente al Dr. Lara que desde un inicio creyó en mí, no sólo es mi maestro, se ha convertido en un padre, gracias por el apoyo. Al Dr. Arrieta y Dra. Barrera, gracias por enseñarme el gusto a la investigación.

A la Oncología y a tantos pacientes que me han dado la oportunidad de llorar, sonreír, crecer y soñar, me han enseñado que la vida es sólo un momento y que nuestra única obligación es disfrutarla.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
I. ANTECEDENTES	11
2.1 Definición del término Cáncer	11
2.2 Epidemiología del cáncer de pulmón.....	11
2.3 La muerte celular programada y las señalizaciones fagocíticas: “encuéntrame”, “cómeme” y “no me comas”	12
2.4 Señales profagocíticas: La exposición de Fosfatidilserina y calreticulina	13
2.5 Señales anti-fagocíticas: Interacción CD47/SIRP α	14
2.6 SIRP α	15
2.7 Señales anti-fagocíticas: Unión homofílica CD31/CD31	16
2.8 La coordinación de señales pro y antifagocíticas en la célula Apoptótica: CD47/SIRP α y Calreticulina.....	16
2.9 CD47 y sus ligandos.....	16
2.10 CD47 y la evasión de la fagocitosis en cáncer.....	18
2.11 CD47 como blanco terapéutico en cáncer.....	19
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
IV. JUSTIFICACIÓN.....	22
V. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	23
<i>Hipótesis nula</i>	23
<i>Hipótesis Alternativa</i>	23
VI. OBJETIVOS.....	24
6.1 <i>Objetivo General</i>	24
6.2 <i>Objetivos específicos</i>	24

VII. METODOLOGÍA:	25
7.1 Diseño del estudio	25
7.2 Población del estudio	25
7.3 Diseño estadístico del estudio	27
7.4 Metodología experimental	28
7.5 Consideraciones éticas	28
7.6 Proceso de obtención de muestras	28
7.7 Destino final de las muestras	29
7.8 Proceso de obtención del consentimiento informado	29
VIII. RESULTADOS	30
8.1 Características socio-demográficas de los pacientes estudiados:	30
8.2 Frecuencia de la expresión del receptor de CD47 total y en neutrófilos en sangre periférica de sujetos control y pacientes con Cáncer de pulmón de células no pequeñas	31
8.3 Correlación de características generales de los pacientes con cáncer de pulmón con la densidad de expresión del receptor CD47	33
8.5 Supervivencia Global	35
IX. DISCUSIÓN	40
X. BIBLIOGRAFÍA:	42

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMEN

Justificación: La sobre-expresión de CD47 en diferentes tipos de tumores y su función como una señal de evasión de la fagocitosis, sugiere que este mecanismo (CD47-SIRP α) puede representar un blanco terapéutico. Por otra parte, se ha observado que, el nivel de expresión de CD47 se correlaciona inversamente con el pronóstico del paciente.

Pacientes y métodos: Pacientes con diagnóstico de cáncer de pulmón de células no pequeñas en estadios clínicos IIIB/IV que recibieron al menos una línea de quimioterapia y un grupo control de personas sanas. Se obtuvo una muestra de sangre periférica de 8 ml de cada sujeto incluido en el estudio. El estudio de la expresión de CD47 en células totales y en poblaciones de origen granulocítico se realizó a partir de sangre completa por cada combinación de anticuerpos.

Resultados: Se realizó la correlación de las características generales de la población con la densidad de expresión del receptor CD47 (intensidad media de fluorescencia) del grupo de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas, encontrando mayor densidad de expresión de acuerdo al estadio clínico (III vs IV; 1000.60 vs 2602.34; $p=0.0001$), enfermedad oligometastásica (Ausente vs presente; 1620.66 vs 2694.37; $p=0.002$) y con la cantidad de albúmina (Hipoalbuminemia vs normal; 2817.75 vs 1778.68; $p=0.047$). En los pacientes que presentaron disminución de la densidad de expresión del receptor CD47, la supervivencia a 1 año fue del 62.5% (IC 95% 41.8-62.5, $p=0.015$) a diferencia de aquellos pacientes que presentaron incremento de la densidad de expresión del receptor de CD47, siendo la supervivencia a 1 año del 36.7% (IC 95% 15.1-58.2, $p=0.015$).

Conclusiones: La sobreexpresión del receptor CD47 en sangre periférica en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas se encuentra directamente relacionado con enfermedad en estadio clínico IV, polimetastásica e hipoalbuminemia. Esta relación es inversamente proporcional con la supervivencia global de los pacientes.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón es la causa más frecuente de muerte por cáncer en hombres y la cuarta en mujeres en todo el mundo [1]. En México, el cáncer de pulmón es la segunda causa de muerte por tumores malignos en el hombre y la octava en mujeres y es la enfermedad más importante atribuible al tabaquismo. Se estima que para el año 2015, habrá más de 11800 muertes por esta causa[1]. El grupo de carcinomas pulmonares de células no pequeñas (NSCLC) representa el 80% de todos los casos de cáncer pulmonar, integrado a su vez por tres tipos histopatológicos principales: carcinoma de células grandes (LCC), carcinoma epidermoide o carcinoma de células escamosas (SCC) y adenocarcinoma (AD); abarcando el SCC y AD, cerca del 85% de todos los casos de NSCLC[2]. Reportes de Estados Unidos[3] han señalado una supervivencia a cinco años cercana al 5% para el estadio clínico IIIB y prácticamente nulo (1%) para estadios IV; en contraste con la supervivencia alcanzada por los pacientes diagnosticados en estadios clínicos tempranos, IA (61%); IB (38%); y IIA (34%), mientras que para estadios IIB y IIIA son de 24 y 13%, respectivamente (AJCC, séptima edición)[3]. En México, el Instituto Nacional de Cancerología atiende 250 nuevos casos de cáncer de pulmón cada año, de los cuales 90 por ciento de los pacientes muere antes de los 18 meses[4]. Actualmente se cuenta con pocos tratamientos efectivos para este tipo de patología por lo que para mejorar el pobre pronóstico se han desarrollado nuevas estrategias terapéuticas, incluyendo la regulación del sistema inmune.

De manera fisiológica, durante los procesos inflamatorios, los macrófagos incrementan su actividad para hacer más efectiva la eliminación de patógenos y células muertas. Se han descrito al menos tres mecanismos concertados de señalización claves que facilitan la fagocitosis de células apoptóticas. Esas señales promueven la ingestión de células apoptóticas por los macrófagos residentes [5]. Evidencia reciente sugiere que las células viables previenen su propia ingestión exponiendo receptores de superficie que evita que sean fagocitadas. Un mecanismo de señalización de protección a la fagocitosis involucra la interacción entre el receptor de superficie CD47 y la proteína reguladora de señales alfa (SIRP α). La molécula CD47 se encuentra principalmente en

leucocitos y eritrocitos [6]. Es una proteína de la familia de las inmunoglobulinas que interactúa con integrinas y con la trombospondina-1. Entre algunas de sus funciones se encuentran la migración de neutrófilos, extensión de axones y co-estimulación de células T. La unión de la proteína SIRP α expresada en macrófagos al receptor CD47, inhibe la fagocitosis por medio de la fosforilación de residuos de tirosina de la molécula ITIM citoplasmática (immunoreceptor tyrosin- based inhibitory motif) de SIRP α [7]. Diversos estudios han mostrado que la fagocitosis eficiente de neutrófilos y otras células inflamatorias, puede ser mediada al menos en parte por la unión del receptor CD47 y sus ligandos[8, 9]. Se ha propuesto que uno de los mecanismos de evasión de la fagocitosis de células tumorales, es la imitación en la expresión de receptores propios de células normales. La sobre expresión del receptor CD47 en células tumorales, podría favorecer la migración y acumulación de dichas células promoviendo el crecimiento tumoral[8-10]. Recientemente se ha propuesto que el receptor CD47 puede ser un blanco terapéutico efectivo reduciendo su interacción con SIRP α , haciendo a algunos tipos de cáncer susceptibles [11, 12], ante las defensas del sistema inmune, facilitando los procesos de defensa [8], sin embargo no hay ningún estudio que evalúe el papel de este mecanismo en cáncer de pulmón. El estudio de los mecanismos de evasión que utilizan las células tumorales o inflamatorias y que favorecen el crecimiento tumoral resultan de gran importancia para la propuesta de intervenciones terapéuticas efectivas.

I. ANTECEDENTES

2.1 Definición del término Cáncer

Cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo, una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis (Organización Mundial de la Salud).

El cáncer es también una de las principales causas de muerte en todo el mundo; en el 2008, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, causó 7.6 millones de defunciones (aprox. 13% del total) y se prevé que las muertes por cáncer sigan aumentando en todo el mundo hasta alcanzar la cifra de 13.1 millones de defunciones por esta enfermedad en el mundo en el 2030.

2.2 Epidemiología del cáncer de pulmón

Diez millones de personas son diagnosticadas con cáncer anualmente y más de 6 millones mueren de esta enfermedad en todo el mundo, actualmente lo padecen cerca de 22 millones de personas. La incidencia de los cánceres más frecuentes a nivel mundial es de un 12,3% para el pulmón, 10,4% mama y 9,4% colorrectales. Se estima que para el año 2025 se incrementará el número de muertes en más de un 80%; es decir, a tres y medio millones en países en desarrollo (13). El cáncer de pulmón, bronquios y tráquea ocupa el segundo lugar de incidencia en ambos géneros (14); a nivel mundial (15) incluyendo a Estados Unidos y México (16, 17). Reportes del año 2001 pronosticaban para el 2010, la existencia de más de 10 mil muertes anuales en nuestro país a causa del cáncer pulmonar (17). En México se estimaron para el año 2010 más de 10 mil muertes por esta causa, lo que significa un incremento del 50% en tan sólo una década. El cáncer de pulmón causa altos costos económicos, tanto para instituciones del sector salud como del sector productivo con un costo anual promedio por paciente mayor a 100 mil pesos (18).

Este panorama es debido, en parte, a la incapacidad de los servicios de salud para ofrecer un diagnóstico y tratamiento oportunos. Se sabe que un paciente diagnosticado en estadios clínicos tempranos, con hallazgo radiográfico de imagen de tórax de nódulo pulmonar solitario asintomático, posee mayor índice de respuesta a tratamiento, cercano al 70%. En contraste, sólo el 15% de los pacientes responden parcialmente en estadios avanzados con un pobre índice de sobrevida (19, 20).

Distintos reportes señalan que el grupo de carcinomas pulmonares de células no pequeñas (NSCLC) representa el 80% de todos los casos de cáncer pulmonar, integrado a su vez por tres tipos histopatológicos principales: carcinoma de células grandes (LCC), carcinomas epidermoides o carcinomas de células escamosas (SCC) y adenocarcinomas (AD); abarcando el SCC y AD, cerca del 85% de todos los casos de NSCLC (2). En México, dicha incidencia se conserva de acuerdo con datos del Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas (21). Reportes de Estados Unidos han señalado una sobrevida a cinco años cercano al 5% para el estadio clínico IIIB y prácticamente nulo (1%) para estadios IV; en contraste con la alta supervivencia para pacientes diagnosticados en estadios clínicos tempranos IA (61%); IB (38%); y IIA (34%), mientras que para estadios IIB y IIIA son de 24 y 13%, respectivamente (3). Estos datos, desde el punto de vista epidemiológico, se relacionan con diversas causas de exposición a factores de riesgo, aunado a la baja especificidad del cuadro clínico de los pacientes debido, en parte, a la baja sensibilidad de los métodos diagnósticos empleados durante la etapa asintomática. Así, en la actualidad no se ofrece solución alguna, lo que conlleva a altos índices de mortalidad y baja eficiencia terapéutica. Estimaciones del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER) durante un período de 40 años, muestran el reemplazo del tipo histológico predominante de SCC por el tipo AD (22).

2.3 La muerte celular programada y las señalizaciones fagocíticas: “encuéntrame”, “cómeme” y “no me comas”

La apoptosis o muerte celular programada es esencial para la regulación del crecimiento tisular así como para el mantenimiento de la homeóstasis; así también lo es

la eficiente eliminación de las células apoptóticas, ya que evita la necrosis secundaria de las células moribundas y respuestas inmunes a autoantígenos. Fallas en la eliminación de células apoptóticas resulta en un proceso inflamatorio no resuelto, condiciones autoinmunes y anormalidades de desarrollo (23). La eliminación celular programada es un mecanismo clave que une la muerte celular programada o apoptosis con la eliminación celular y ocurre antes del paso final de la apoptosis (24).

Es un proceso que se subdivide en 3 pasos: primero, las células apoptóticas liberan señales “encuéntrame”, los cuales son factores quimiotácticos que atraen a fagocitos a donde están las células apoptóticas, tienen un período corto de duración y se restringen al tejido local (25) e incluyen: lisofosfatidilcolina, ATP y UTP, fractalquina y esfingosina 1 fosfato (23,25). Segundo, las células apoptóticas expresan señales “cómeme” en su superficie celular que promueve el reconocimiento específico por el fagocito (24) e incluyen la aparición de nuevas moléculas en la superficie celular como fosfatidilserina o anexina, modificación de moléculas ya existentes en superficie celular como ICAM-3, proteína surfactante A (SP-A), proteína surfactante D (SP-D), MBL entre otros (26).

Finalmente, el tercer paso involucra el inicio de la fagocitosis por medio del fagocito a través de señalización inducida por los receptores del fagocito y la reorganización citoesquelética de la membrana del fagocito y el procesamiento del cadáver celular dentro de fagosomas (23).

Sin embargo, también existen moléculas que actúan como señales anti-fagocíticas (“no me comas”) como es el caso de CD47, CD31 y CD200 (24).

2.4 Señales profagocíticas: La exposición de Fosfatidilserina y calreticulina

La traslocación de fosfatidilserina de la parte interna de membrana hacia parte exterior es la alteración más universal que hay en la superficie de células apoptóticas. Recientemente, se sabe que múltiples receptores reconocen y se unen a fosfatidilserina en las células apoptóticas y este reconocimiento por parte de los receptores puede ser de dos formas: aquellos que se pueden unir de manera directa como miembros de familia TIM (TIM 1, 3 y 4) y aquellos que se unen indirectamente a fosfatidilserina a través de moléculas que actúen como puente como la familia de receptores Tyro-3-Axl-

Mer que a través de Gas6 y la proteína S unen fosfatidilserina expuesta en células apoptóticas con fagocito (25).

Calreticulina es una proteína altamente conservada de 46 kDa que se encuentra en la membrana del retículo endoplásmico donde participa en la homeóstasis del calcio y actúa como proteína chaperona (27). Cuando se expone en la superficie celular, se une a la proteína relacionada al receptor LDL de los macrófagos (LRP, también conocido como CD91) y facilita la fagocitosis de la célula objetivo (27).

La exposición de calreticulina sin la exposición de otras proteínas de retículo endoplásmico ocurre a una etapa temprana de la apoptosis cuando las células todavía conservan una morfología normal y no han expuesto todavía la fosfatidilserina; ya en fase tardía de apoptosis, ocurre también la exposición no específica de otras proteínas de membrana de retículo endoplásmico como calnexina (28).

2.5 Señales anti-fagocíticas: Interacción CD47/SIRP α

CD47 es una proteína integral de membrana tipo 1 compuesta por un dominio inmunoglobulina variable extracelular, cinco segmentos que abarcan la membrana y una cola o extremo citoplásmico terminal de longitud variable que va desde 3 a 36 aminoácidos de tamaño y que presenta 4 isoformas, siendo la isoforma 2 la más ampliamente expresada y la forma dominante encontrada en todas las células circulantes e inmunes. (29, 30)

Descubierta como proteína asociada a 2 integrinas, la ubicua $\alpha v\beta 3$ y $\alpha IIb\beta 3$, se observó tiempo después que era la misma molécula que el marcador de tumor de ovario OA3 y que CD47 (31). CD47 se encuentra presente en todos los leucocitos y tiene varios ligandos y con cada uno ejerce una función diferente; su unión con la integrina $\alpha v\beta 3$ y con CD31 permite la migración de leucocitos a través de las monocapas endoteliales (32,33), participa en la adhesión y migración celular de células epiteliales (34), la unión de CD47 con trombospondina1 inhibe la vía de señalización del óxido nítrico/cGMP, mientras que su unión con SIRP α permite regular la estimulación o inhibición de la activación de células T (30, 35), inhibe la maduración fenotípica y activación de células dendríticas (36) y previene la fagocitosis celular (30, 37, 38, 39).

La inhibición de la fagocitosis mediada por las interacciones CD47/SIRP α lleva a la fosforilación de los motivos inhibitorios inmunorreceptores basados en tirosinas en el dominio citoplásmico de SIRP α y la unión y activación de fosfatasa SHP-1 y posterior fosforilación de la cola autoensamblada de miosina IIA no muscular en la tirosina 1805 impidiendo su localización sináptica en superficie membranal de célula objetivo. (40)

Las interacciones CD47-SIRP α parecen ser especie-específicas al observarse que hay una afinidad de unión 60 veces mayor de SIRP α humana con CD47 humano con respecto a CD47 de ratón (41), también se ha observado tras la incubación de eritrocitos humanos con macrófagos humanos, se detectaba fosforilación en sitios de tirosina en SIRP α expresada en macrófagos humanos, lo cual no se detectaba para el caso de células porcinas al incubarlas con macrófagos humanos lo que derivaba en la fagocitosis de estas células (42); estas interacciones son entre 1 proteína CD47 y 1 proteína SIRP α aunque se ha demostrado la existencia de SIRP α como dímero en la superficie celular de células polimorfonucleares en bajos niveles, sin embargo esta dimerización de SIRP α no es necesaria para la unión con CD47.(43). La unión CD47/SIRP α se da por medio del dominio amino terminal tipo inmunoglobulina variable de SIRP α con el dominio extracelular tipo inmunoglobulina de CD47.

2.6 SIRP α

SIRP α pertenece a una familia de glicoproteínas transmembranales con dominios extracelulares parecidos al de las inmunoglobulinas relacionadas estructuralmente con los receptores de antígenos de células T y células B. (38, 40, 44) Los otros miembros de la familia SIRP son SIRP β y SIRP γ . SIRP β que pueden transmitir señales activadoras a través de su asociación con la proteína adaptora transmembranal DAP12 vía el motivo inmunorreceptor activador basado en tirosinas (ITAM) de DAP12, (38, 39, 44) mientras que SIRP γ no se asocia con proteínas citoplásmicas y se considera que no transmite señal alguna sin embargo Van Beek y colaboradores advierten que la interacción SIRP γ -CD47 media la adhesión celular y soportan el contacto entre células presentadoras de antígeno y células T.

A pesar de las diferencias en las señalizaciones de SIRP α y SIRP β , sus estructuras de inmunoglobulinas variables extracelulares comparten secuencias de aminoácidos altamente homólogas, de hecho sólo 7 aminoácidos son diferentes y de ellos, únicamente la modificación de 3 de ellos provocan la disminución de unión de SIRP α con CD47 (45).

2.7 Señales anti-fagocíticas: Unión homofílica CD31/CD31

CD31 es una glicoproteína de 130 kDa perteneciente a la superfamilia de moléculas de adhesión celular que se encuentra restringida en plaquetas, monocitos, neutrófilos, células T seleccionadas y células endoteliales. Se compone de 6 dominios extracelulares tipo inmunoglobulinas. Una interacción homofílica de CD31 puede discriminar entre células apoptóticas y viables mediante señales de “despego” en células viables y la desactivación de la misma señal en células apoptóticas en leucocitos apoptóticos, promoviendo la unión con macrófagos y su posterior ingestión por lo que puede actuar como señal profagocítica y anti-fagocítica (46, 47).

2.8 La coordinación de señales pro y antifagocíticas en la célula Apoptótica: CD47/SIRP α y Calreticulina

En células apoptóticas se ha observado que los niveles de expresión de CD47 disminuyen, esto se ha observado en neutrófilos aislados de sangre periférica a los cuales se les indujo apoptosis (48), en fibroblastos y en líneas celulares como la Jurkat (47, 48). Lo mismo se ha observado en CD31. (47)

Al mismo tiempo se ha observado que las células apoptóticas disminuyen el nivel de expresión de CD47 y sobreexpresan coordinadamente calreticulina en superficie celular. (40)

2.9 CD47 y sus ligandos

La proteína asociada a integrina CD47, fue descubierta como una molécula de membrana plasmática que fue co-purificada junto con la $\alpha v \beta 3$ de leucocitos de placenta. El CD47 es un miembro poco común de la super familia de las inmunoglobulinas con un

dominio único tipo IgV y un extremo N-terminal altamente hidrofóbico con cinco segmentos transmembranales que se generan por splicing alternativo en el extremo C-terminal que varía de 3 a 36 aminoácidos (*Figura 1*)(49).

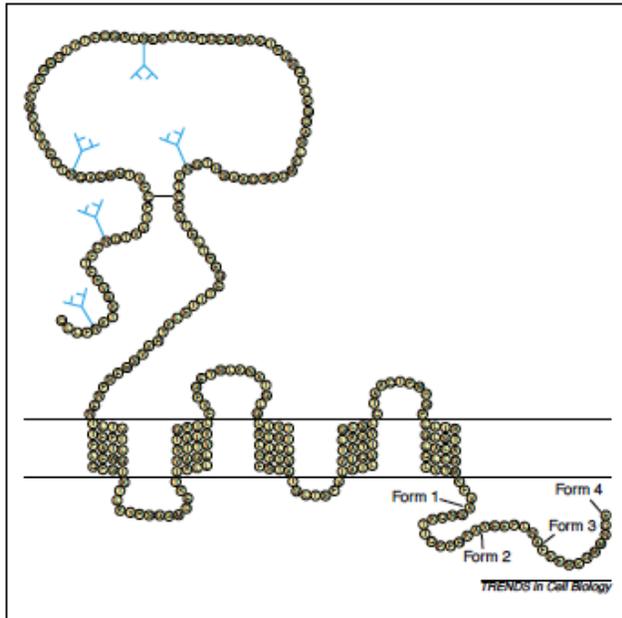


Figura 1. Estructura de la proteína asociada a integrina (IAP o CD47).

Otras moléculas que se han identificado como ligandos de CD47 son la trombospondina 1 (50) y la proteína reguladora de señal alfa, SIRP α . Se sabe que la unión de SIRP α a CD47 media la adhesión celular. SIRP α es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas con tres dominios tipo Ig en su porción extracelular. Su dominio citoplásmico contiene diversas tirosinas que cuando son fosforiladas pueden crear un motivo inmunoreceptor inhibitorio de tirosinas (ITIM)(51). Estos motivos son sitios de unión para las fosfatasas SHP-1, SHP-2 y SHIP. Las células circulantes que son deficientes en CD47, son fagocitadas rápidamente por macrófagos en el bazo debido a que no poseen esta señal inhibitoria (51).

La primera descripción funcional de CD47 se hizo en neutrófilos, donde se asoció su activación con su unión a la integrina α β 3 (52). En monocitos, el complejo CD47- α β 3 se une a CD23 y señala para la síntesis de citocinas (53,54).

2.10 CD47 y la evasión de la fagocitosis en cáncer

Durante los procesos inflamatorios, los macrófagos incrementan su actividad para hacer más efectiva la eliminación de patógenos y células muertas. Se han descrito al menos tres mecanismos concertados de señalización clave que facilitan la fagocitosis de células apoptóticas (24). Esas señales promueven la ingestión de células apoptóticas por los macrófagos residentes. Evidencia reciente sugiere que las células viables previenen su propia ingestión exponiendo receptores de superficie que evita que sean fagocitadas (26). La unión de la proteína SIRP- α expresada en macrófagos al receptor CD47 que se expresa en múltiples tipos celulares, inhibe la fagocitosis por medio de la fosforilación de residuos de tirosina de la molécula ITIM citoplasmática de SIRP- α , convirtiendo dicho mecanismo en un marcador de lo propio (26). Se ha propuesto que uno de los mecanismos de evasión de la fagocitosis de células tumorales, es la imitación de la expresión de receptores propios de células normales (*Figura 2*)(39). Diversos estudios han mostrado que la fagocitosis eficiente de neutrófilos y otras células inflamatorias, puede ser mediada al menos en parte por la unión del receptor CD47 y sus ligandos (6).

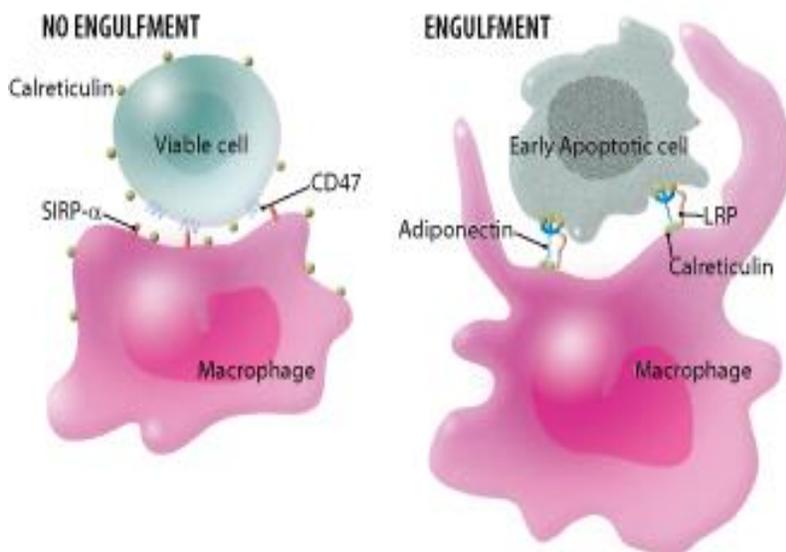


Figura 2. Las células viables expresan CD47 y su unión a SIRP α en macrófagos, previene la fagocitosis. En estados de apoptosis temprana, la expresión de CD47 disminuye y se incrementa la presencia de calreticulina. La adiponecitna reconoce la calreticulina y promueve la fagocitosis de la célula apoptótica mediante su unión con LRP.

2.11 CD47 como blanco terapéutico en cáncer

La sobre-expresión de CD47 en diferentes tipos de tumores y su función como una señal de evasión de la fagocitosis, sugiere que este mecanismo (CD47- SIRP α) puede representar un blanco terapéutico. Con este objetivo, se han realizado diversos estudios inhibiendo la vía CD47- SIRP α , principalmente bloqueando con anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD47 así como con SIRP α recombinante que puede unirse y bloquear CD47. Los anticuerpos anti-CD47 han mostrado tener eficacia terapéutica contra diversos tipos de cáncer *in vitro* e *in vivo* en modelos animales con xenotransplantes. La administración de un anticuerpo anti-CD47 en ratones transplantados con leucemia mielocítica aguda, permitió la eliminación de la enfermedad tanto en sangre periférica como en médula ósea, conduciendo a la remisión a largo plazo de la enfermedad en algunos de los animales estudiados (39, 41).

Otro estudio en linfoma tipo no Hodgkin ha demostrado que la administración de un anticuerpo anti-CD47, redujeron el tamaño del tumor en experimentos *in vitro* e *in vivo* (40) (Figura 3), resultados similares se han descrito en cáncer de vejiga (38) y en cáncer de mama (47).

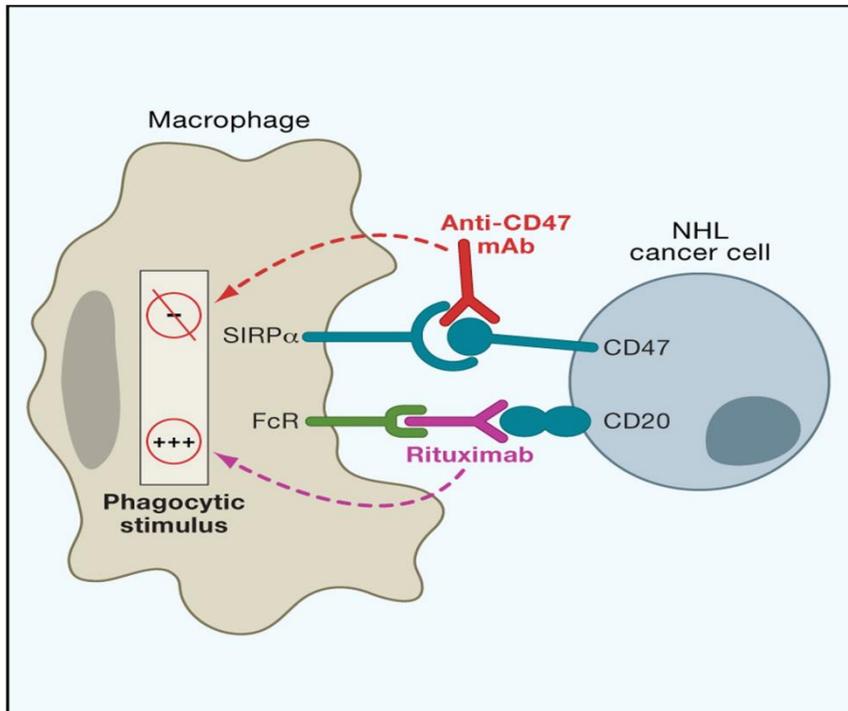


Figura 3. CD47 es un factor pronóstico y blanco terapéutico en linfoma no Hodgkin. El anticuerpo anti-CD47 sinergiza el efecto del rituximab y erradica células tumorales en experimentos *in vitro* e *in vivo*. Este efecto sinérgico del CD47 puede, potencialmente ser investigado en otros tipos de cáncer.

Los anticuerpos anti-CD47 pueden facilitar la eliminación de las células tumorales a través de una variedad de mecanismos (Figura 4). Primero, el anticuerpo anti-CD47 permite la fagocitosis de las células tumorales, bloqueando la unión de CD47 presente en estas células a SIRP α en los fagocitos. En este sentido, se ha demostrado que la adición simultánea de un anticuerpo anti-CD47 y un anticuerpo anti- SIRP α en cocultivos de células tumorales y macrófagos, conduce a una rápida y eficiente fagocitosis en diversos tipos de células tumorales (8, 38 – 41, 55). Segundo, el anticuerpo anti-CD47, puede eliminar células tumorales por otros mecanismos como los dependientes de Fc, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

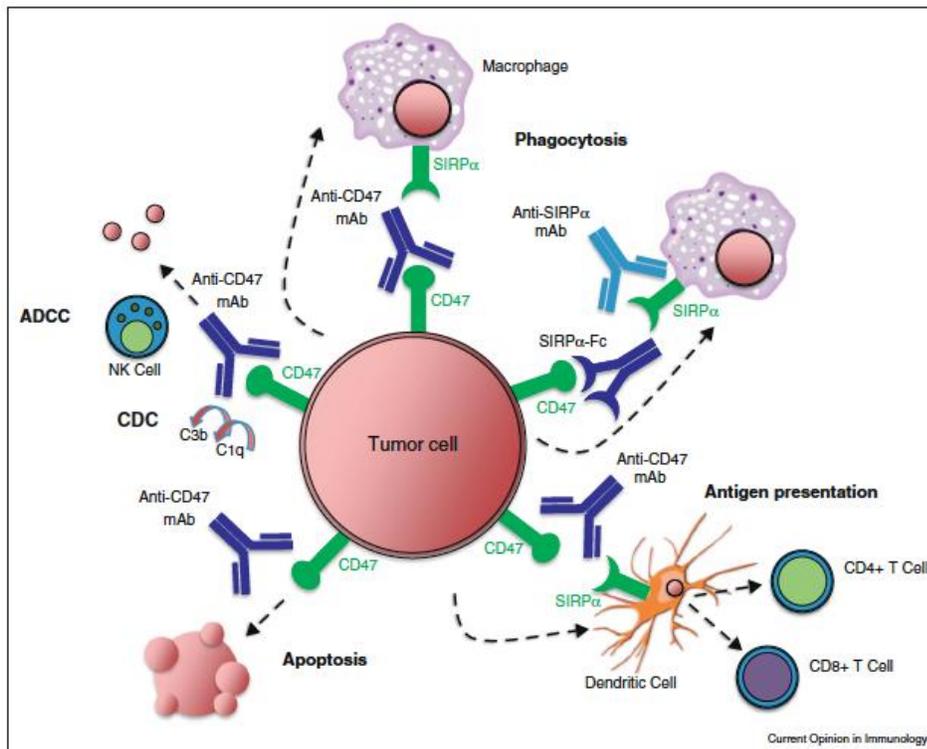


Figura 4. Mecanismos de inhibición de la unión CD47- SIRP α en cáncer.

Por otra parte, se ha observado que, el nivel de expresión de CD47 se correlaciona inversamente con el pronóstico del paciente, de tal manera, que a un nivel alto de expresión de CD47, el pronóstico clínico es desfavorable para el paciente (4, 27, 55, 56).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Un dato preocupante respecto al cáncer de pulmón es que su incidencia está relacionada al nivel socioeconómico; es decir, en países en desarrollo se diagnostican más casos nuevos de cáncer pulmonar en comparación con los países desarrollados en donde la incidencia ha comenzado a disminuir (26).

A pesar de los esfuerzos por detectar el cáncer de pulmón en etapas tempranas, éste se diagnostica por lo general en etapas avanzadas y con un pronóstico pobre (26) lo que da lugar a que más del 90% de los pacientes se presenten en los estadios clínicos III o IV. Esta situación epidemiológica pone en evidencia la necesidad de estudiar diversos tipos celulares que intervengan en la regulación de los procesos inmunológicos involucrados en el desarrollo del cáncer pulmonar.

Este estudio propuso conocer la expresión del receptor CD47 en células de sangre periférica así como realizar una correlación con la supervivencia de los pacientes de acuerdo a los niveles de expresión de CD47 y proponer un posible blanco terapéutico que incremente la efectividad de los tratamientos actuales para este tipo de patología.

IV. JUSTIFICACIÓN

Debido a la alta tasa de mortalidad del cáncer de pulmón a nivel mundial y a la poca efectividad que se logra con los tratamientos actuales es necesario investigar la posibilidad de desarrollar nuevas terapias que incrementen las tasas de supervivencia así como de respuesta al tratamiento.

Una línea importante de investigación en la mayoría de los tumores sólidos y hematológicos es conocer que papel tiene el sistema inmune en la prevención de la iniciación y en el control del crecimiento tumoral.

Se ha comprobado en diversos tipos de tumores hematológicos el papel que tiene la expresión de CD47 para evitar la fagocitosis y en algunos ya se utiliza un anticuerpo monoclonal humanizado anti CD47 con respuestas favorables.

En este momento no se cuenta con ningún estudio que reporte tanto la expresión de CD47 como su posible relación con la supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón.

V. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Hipótesis nula

La sobre-expresión del receptor CD47 en células de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón en estadios avanzados no regula negativamente la fagocitosis de las mismas.

Hipótesis Alterna

La sobre-expresión del receptor CD47 en células de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón en estadios avanzados regula negativamente la fagocitosis de las mismas.

VI. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Evaluar la sobre-expresión del receptor CD47 total en células de sangre periférica de pacientes con cáncer pulmonar (adenocarcinoma) en estadios clínicos IIIA, IIIB, IV, así como sujetos sanos y describir si dicha sobre-expresión se correlaciona con las características clínicas de los pacientes estudiados.

6.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la expresión de CD47 total en células de sangre periférica de los grupos estudiados
2. Evaluar la expresión de CD47 en neutrófilos de sangre periférica de los grupos estudiados.
3. Estudiar las posibles correlaciones de la expresión diferencial del receptor CD47 y los parámetros clínicos estudiados.
4. Evaluar el valor pronóstico de la sobre expresión de CD47.

VII. METODOLOGÍA:

7.1 Diseño del estudio

Se realizó un estudio de cohorte prospectivo que se llevó a cabo incluyendo a pacientes con cáncer pulmonar de estirpe adenocarcinoma en estadios IIIB y IV de la Clínica de Cáncer de Pulmón del Instituto Nacional de Cancerología [INCan]. Se realizó un estudio observacional con muestreo transversal que permitió evaluar si la sobre-expresión del receptor CD47 correlacionaba con alguna o algunas variables clínicas. Se analizó también si dicha sobre-expresión puede representar un biomarcador potencial.

7.2 Población del estudio

Pacientes:

Criterios de inclusión

1. Se incluyeron aquellos pacientes que entendieron y firmaron el consentimiento informado.
2. Se incluyeron aquellos pacientes que junto con un cuadro clínico-radiológico compatible con cáncer de pulmón, cumplieran al menos una de las siguientes condiciones y que no hubieran recibido radioterapia y/o quimioterapia previa a la obtención de las muestras a analizar.
 - a) Citología positiva para malignidad en esputo, aspirado bronquial, cepillado bronquial, punción aspirativa pulmonar, líquido pleural o punción de otras localizaciones metastásicas.
 - b) Biopsia positiva para malignidad de origen bronquial, transbronquial, pleural, pulmonar percutánea, pulmonar por toracotomía o de localizaciones metastásicas.
3. Edad ≥ 18 años.
4. Estado general con puntuación según ECOG entre 0 y 2 ó con un Karnofsky $\geq 60\%$.

Criterios de exclusión

1. Se excluyeron aquellos sujetos con un tipo histológico diferente al adenocarcinoma .

2. Aquellos que hayan recibido tratamiento quirúrgico, radiológico o de quimioterapia previo.
3. Sujetos con inflamaciones agudas.
4. Sujetos con infección por VIH u otras inmunodeficiencias.
5. Sujetos con infecciones no controladas.

Los criterios de exclusión 4, 5 y 6, se han indicado con el fin de evitar posibles interacciones inmunológicas sobre los factores estudiados. La subpoblación de estudio puede estar incrementada en las patologías descritas, lo que interferiría con la descripción de los resultados.

Criterios de eliminación:

1. Retiro del consentimiento informado.

Sujetos sanos:

Criterios de inclusión

1. Se incluyeron aquellos pacientes que hayan entendido y firmado el consentimiento informado
2. Se incluyeron aquellos que no reporten hábito tabáquico al menos en los últimos 10 años.
3. Se incluyeron sujetos sin síntomas de cualquier enfermedad respiratoria en las dos semanas anteriores a la toma de la muestra.
4. Aquellos que presentaron una espirometría normal.
5. Aquellos cuya evaluación radiológica (radiografía de torax) se haya considerada como normal.
6. Aquellos que presentaron valores normales en biometría hemática.

Criterios de exclusión

1. Aquellos sujetos que tuvieran antecedentes familiares de cáncer de pulmón.
2. Sujetos con otro diagnóstico oncológico.
3. Sujetos con enfermedades autoinmunes (VIH, artritis, lupus, etc).
4. Pacientes con enfisema pulmonar.

Criterios de eliminación:

1. Retiro del consentimiento informado

7.3 Diseño estadístico del estudio

Análisis estadístico del estudio

Los eventos o variables de desenlace que se evaluaron fueron:

1. Proporción de células totales que expresan CD47 en pacientes con cáncer de pulmón y en sujetos sanos.
2. Proporción de neutrófilos que expresan CD47 en pacientes con cáncer de pulmón y en sujetos sanos.

Variable independiente: adenocarcinoma.

La variable primaria de estudio fue la sobre-expresión del receptor CD47.

Con el fin de describir los valores de las variables continuas se emplearon como medidas de tendencia central la media o la mediana y como medidas de dispersión la desviación estándar o los valores mínimo y máximo, dependiendo de la distribución paramétrica o no de los datos. La comparación entre las características generales de controles y pacientes con Cáncer Pulmonar de Células no Pequeñas (NSCLC) (adenocarcinoma) de variables continuas se realizó con la prueba t de Student o con su alternativa no paramétrica U de Man-Whitney cuando esté indicado de acuerdo a su distribución. El análisis de variables nominales u ordinales se efectuó con prueba de X² o prueba exacta de Fisher. Se consideró un valor significativo de p cuando éste sea ≤ 0.05 . No se ajustó por comparaciones múltiples. En el grupo de pacientes se asoció la expresión de CD47 con las variables clínico-patológicas como edad, género, histología y estadio clínico. Y las variables significativas se utilizaron en un análisis multivariado de regresión logística. Se analizó la sobrevida global de pacientes de acuerdo a la mediana de la expresión de CD47 con Kaplan-Meier y comparado con log-Rank. Las variables estadísticamente significativas que presentaron una $p < 0.1$, fueron incluidas en análisis multivariados utilizando el modelo de Cox. Se utilizó el programa de análisis estadístico SPSS (V. 14.0; SPSS, Inc., Chicago, IL).

7.4 Metodología experimental

Inmunofenotipificación de células mononucleares de sangre periférica

Se obtuvo muestra de sangre periférica de 8 ml de cada sujeto incluido en el estudio, (pacientes y controles). El estudio de la expresión de CD47 en células totales y en poblaciones de origen granulocítico se realizó a partir de 50 μ l de sangre completa por cada combinación de anticuerpos.

Evaluación de la expresión del receptor CD47 por citometría de flujo

a) Anticuerpos. Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de superficie de células de humano: anti-CD47, anti-CD15 y anti-CD66b.

b) Evaluación del fenotipo en las subpoblaciones de neutrófilos por citometría de flujo. Se utilizaron células mononucleares (CMN) de los pacientes y controles en estudio para las tinciones de antígenos de superficie. Se incubaron con 20 μ l de anticuerpo durante 30 minutos, según el protocolo adecuado. Las células fueron analizadas en el citómetro de flujo FACSAria con el software FACSDiva 6.5.

7.5 Consideraciones éticas

Este protocolo así como las cartas de consentimiento informado para sujetos sanos y pacientes se sometieron a los comités de bioética de las instituciones participantes y fueron aprobados antes de su implementación.

7.6 Proceso de obtención de muestras

Previo consentimiento informado y antes de recibir algún tratamiento, se obtuvo una muestra de sangre periférica de 8 ml de cada sujeto incluido en el estudio, (pacientes y controles).

7.7 Destino final de las muestras

Las muestras que se obtuvieron en el marco del desarrollo de este proyecto, se almacenaron solo en caso de contar con remanente de las mismas. Las células de sangre periférica, se almacenaron a -170°C en nitrógeno líquido de manera indefinida. Este procedimiento asegura la conservación del material biológico útil al menos por un periodo de 5 años. En su caso, cualquier remanente de las muestras empleadas en este estudio, podrán ser utilizadas en futuros proyectos.

7.8 Proceso de obtención del consentimiento informado

En entrevista amable y directa con el paciente y familiar, se informó en que consiste el estudio. Fue responsabilidad de los investigadores, obtener el consentimiento informado por escrito de cada individuo que participó en este estudio, después de una explicación adecuada de la finalidad, métodos, objetivos y riesgos potenciales del estudio. Asimismo, se explicó a los sujetos que son completamente libres de negarse a entrar en el estudio o de retirarse de él en cualquier momento por cualquier razón.

En el caso de sujetos no calificados o incapaces de dar un consentimiento legal, el consentimiento por escrito fue obtenido de un representante legalmente aceptable. En el caso de que tanto el sujeto como su representante legalmente aceptado fueran incapaces de leer, un testigo imparcial debió estar presente durante toda la discusión del consentimiento informado. Una vez que el sujeto y su representante hubieran consentido verbalmente la participación en el estudio, la firma del testigo avaló que la información del formulario fue explicada con precisión y comprometida.

VIII. RESULTADOS

8.1 Características socio-demográficas de los pacientes estudiados:

Se incluyeron en este estudio 40 pacientes (61.5%) con cáncer pulmonar de células no pequeñas, la mediana de edad fue de 58.5 años, 23 mujeres y 17 hombres, el 42.5% de los pacientes presentaban antecedente de tabaquismo (17 pacientes), mientras el 57.6% no presentaban antecedente de tabaquismo (23 pacientes). Adicionalmente 25 personas libres de cáncer (38.46%) corresponden al grupo de casos, la edad mediana fue de 61.46 años, 19 mujeres y 6 hombres, el 88% no presentaba antecedente de tabaquismo (22 pacientes), mientras que el 12% presentaba antecedente de tabaquismo (3 pacientes). Tan sólo 7 pacientes de la población presentaban antecedente de diabetes mellitus 2 (5 pacientes en el grupo de casos y 2 pacientes en el grupo de controles) y con antecedente de hipertensión arterial sistémica 16 pacientes (12 en el grupo de casos y 4 en el grupo de controles). (Tabla 1)

Para este estudio sólo se incluyeron pacientes en estadios clínicos III y IV.

Tabla 1. Características clínico-demográficas de los sujetos estudiados.

	Casos (N=40)	Controles (N= 25)	p
Género (M/F)	17/23	6/19	0.129
Edad (mediana)	58.53 (-5.24 a 11.10)	61.46 (-5.34 a 11.21)	0.708
Edad			
< 60 años	20	14	0.350
> 60 años	20	10	
Tabaquismo (SÍ/NO)	17/23	3/22	0.010
Enfermedades crónico- degenerativas			
DM2 Presente	5	2	0.471
HTAS Presente	12	4	0.164

DM2: Diabetes mellitus tipo 2; **HTAS:** Hipertensión arterial sistémica

8.2 Frecuencia de la expresión del receptor de CD47 total y en neutrófilos en sangre periférica de sujetos control y pacientes con Cáncer de pulmón de células no pequeñas

Se evaluó la expresión de superficie del receptor CD47 total por citometría de flujo en células de sangre periférica y en específicamente en neutrófilos. Estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado la presencia incrementada de neutrófilos en pacientes con cáncer de pulmón avanzado (datos no publicados) por lo que nos interesó saber si esta subpoblación en particular sobre-expresaba CD47.

La estrategia de análisis, consistió en realizar una región donde se localizan las células sanguíneas, según su patrón de expresión de tamaño y complejidad (FSC-A vs SSC-a) (*Figura 5*). De esta región se realizó una ventana para la expresión de CD47 total analizando la intensidad media de fluorescencia en un histograma para ambos tipos de sujetos. En la *figura 6* se muestra la distribución de la frecuencia de este receptor en los dos grupos estudiados. No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células que lo expresan. Sin embargo la evaluación por intensidad media de fluorescencia indicó que los pacientes con adenocarcinoma pulmonar expresan un mayor número de receptores por célula ($p < 0.0001$) (*Figura 6*) (*Tabla 2*). Analizamos la expresión del marcador CD66b que caracteriza a la subpoblación de sangre periférica de neutrófilos (*Tabla 2*). Esta subpoblación se encontró incrementada significativamente en pacientes con CPCNP comparado con sujetos sanos ($p < 0.0001$) (*Figura 7*). La intensidad media de fluorescencia de CD47 en la subpoblación CD66b+ se encontró incrementada en pacientes comparada con controles ($p < 0.0001$).

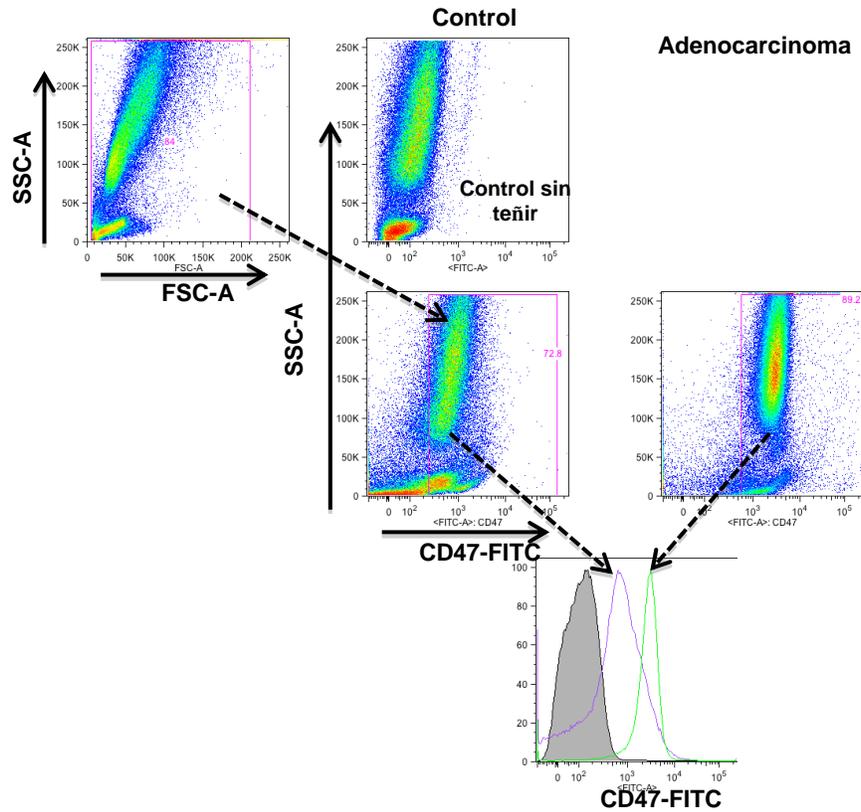


Figura 5. Estrategia de análisis de la expresión de CD47 en sujetos control y pacientes con adenocarcinoma.

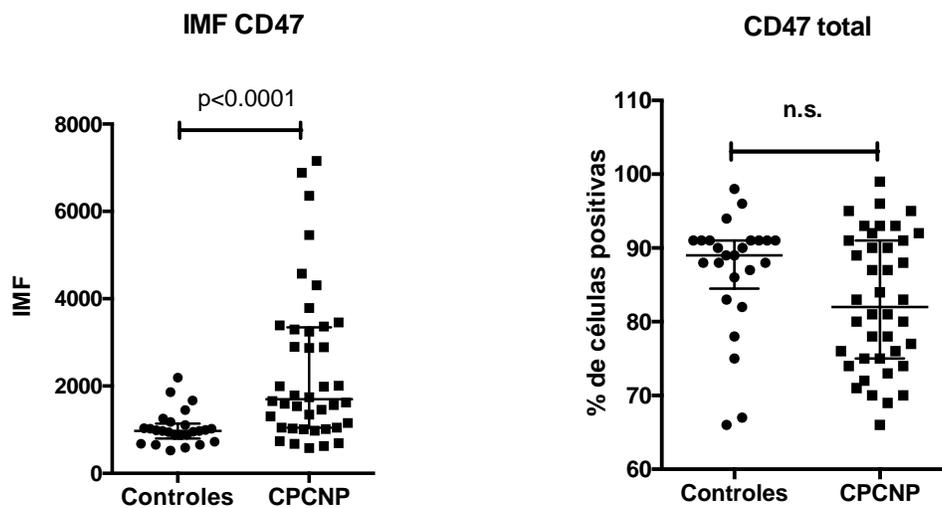


Figura 6. Distribución de la frecuencia de la expresión membranal de CD47 e intensidad media de fluorescencia.

Tabla 2. Frecuencia de la expresión de CD47 total y en neutrófilos.

	Casos (N=40)	Controles (N= 25)	p
IMFCD47	1698 (579-7155)	971.0 (523-2192)	<0.0001
%CD47⁺*	83.1%	87.2%	0.058
%CD66b⁺	58.2%	37.5%	0.0001
IMFCD47de %CD66b⁺	589.07 (-)	255.9 (-)	0.0001

IMF: Intensidad Media de Fluorescencia. *Los valores corresponden a la mediana (min-max)

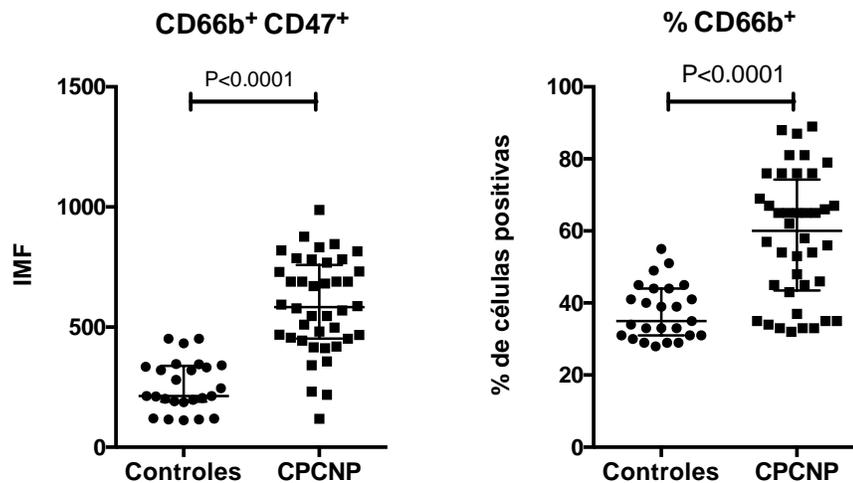


Figura 7. Distribución de la frecuencia de la expresión membranal de CD47 e intensidad media de fluorescencia en neutrófilos CD66b⁺.

8.3 Correlación de características generales de los pacientes con cáncer de pulmón con la densidad de expresión del receptor CD47

Se realizó la correlación de las características generales de la población con la densidad de expresión del receptor CD47 (intensidad media de fluorescencia) del grupo de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas, encontrando mayor densidad de expresión de acuerdo al estadio clínico (III vs IV; 1000.60 vs 2602.34; p=0.0001), enfermedad oligometastásica (Ausente vs presente; 1620.66 vs 2694.37;

p=0.002) y con la cantidad de albúmina (Hipoalbuminemia vs normal; 2817.75 vs 1778.68; p=0.047).

No se encuentran diferencias entre el resto de las características clínicas y la densidad de expresión del receptor CD47, así como la cantidad de neutrófilos (CD66b) y de la subpoblación de CD66 pero que coexpresa CD47 (CD47MFI de CD66b). (Tabla 3)

Tabla 3. Características clínicas de los pacientes estudiados.

	IMF CD47	p	%CD47 ⁺	p	%CD66 b+	p	CD66b ⁺ IMFCD47	p
Genero								
Femenino	2540.52	0.562	84.98	0.138	57.70	0.815	546.95	0.102
Masculino	221.88		80.57		59.09		646.05	
Edad								
< 60 a	2843.25	0.111	81.30	0.211	61.23	0.299	591.15	0.948
> 60 a	1961.00		84.91		55.36		587.00	
Tabaquismo								
Ausente	22.14.39	0.464	84.04	0.446	59.41	0.643	567.82	0.428
Presente	2656.11		81.84		56.78		617.82	
Humo de leña								
Ausente	2814.73	0.082	84.58	0.238	59.05	0.758	570.52	0.482
Presente	1843.88		81.10		57.27		614.17	
Diabetes								
mellitus tipo 2	2260.34	0.310	82.91	0.738	58.34	0.976	601.54	0.496
Ausente	3394.60		84.46		58.00		501.80	
Presente								
Hipertensión								
Ausente	2622.03	0.159	82.87	0.816	60.5	0.185	600.32	0.589
Presente	1889.00		83.64		53.1		562.83	
Histología								
Adenocarcinoma	2383.60	0.90	83.80	0.198	59.38	0.306	594.37	0.584
Otros	2531.80		78.20		50.66		552.00	
Estadio Clínico								
III	1000.60	0.0001	82.60	0.906	54.00	0.438	584.8	0.960
IV	2602.34		83.17		58.91		589.68	

Oligometástasis								
No	160.66	0.002	78.46	0.357	68.43	0.356	675.33	0.454
Si	2694.37		83.61		50.01		581.65	
AT SNC								
Ausente	2694.10	0.463	84.09	0.150	59.68	0.549	590.26	0.968
Presente	2051.80		77.7		54.26		586.20	
Derrame pleural								
Ausente	2737.43	0.686	82.60	0.73	64.22	0.118	604.31	0.702
Presente	2488.57		83.68		54.43		577.36	
ECOG								
0	2440.88	0.743	83.87	0.206	57.99	0.801	579.85	0.499
I	2182.80		78.76		60.00		641.33	
Respuesta								
P/C	2313.41	0.627	82.50	0.165	62.31	0.061	582.29	0.667
PR/EE	2717.44		87.57		48.70		619.88	
Albumina								
Baja	2817.75	0.047	82.30	0.496	61.60	0.148	584.70	0.866
Normal	1778.68		84.31		53.33		565.62	

AT SNC:Actividad tumoral en Sistema Nervioso Central, **ECOG:** Eastern Cooperative Oncology Group
P/C: Parcial/Completa; **PR/EE:** Progresión/Enfermedad estable.

8.5 Supervivencia Global

La supervivencia global se analizó de acuerdo a la densidad de expresión del receptor CD47, así como la cantidad de neutrófilos (CD66b) y de la subpoblación de CD66 pero que coexpresa CD47 (CD47MFI de CD66b). (Tabla 4)

Tabla 4. Supervivencia global.

	Supervivencia (mediana en meses)	Intervalo de confianza 95%	p
IMF CD47			
Bajo	No se alcanza	11.54 – 18.57	0.001
Alto	9.67	6.16 – 13.18	
%CD47⁺			
< 83%	13.7	9.9 – 17.4	0.801
> 83%	12.9	2.2 – 23.5	
%CD66b⁺			
< 60	15	9.2 – 20.8	0.593
> 60	12.9	2.5 – 23.3	
IMFCD47de %CD66b⁺			
< 582	21.5	11.0 – 30.5	0.011
> 582	5.5	0– 13.2	

IMF: Intensidad media de fluorescencia

En los pacientes que presentaron disminución de la densidad de expresión del receptor CD47, no se alcanzó la mediana supervivencia, por lo que se realizó la medición de supervivencia a 1 año siendo ésta del 62.5% (IC 95% 41.8-62.5, p= 0.015) a diferencia de aquellos pacientes que presentaron incremento de la densidad de expresión del receptor de CD47, siendo la mediana de supervivencia de 9.67 meses (IC 95% 6.16– 13.18, p=0.001), la supervivencia a 1 año fue del 36.7% (IC 95% 15.1-58.2, p=0.015) siendo esta diferencia estadísticamente significativa (*Figura 8*).

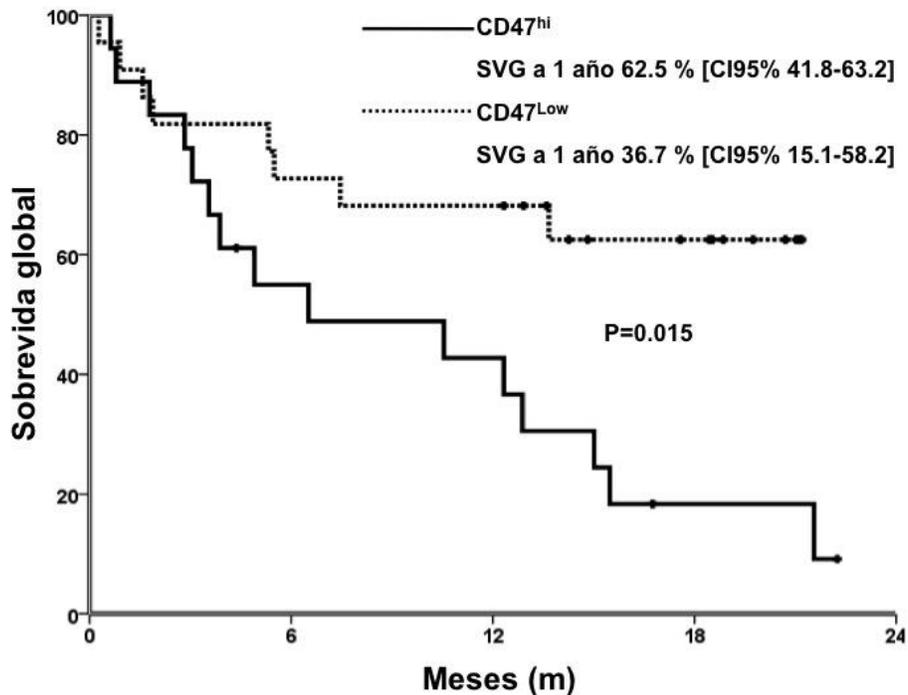


Figura 8. Supervivencia global a 1 año en pacientes con expresión alta y baja de CD47.

Se buscó si existían diferencias en la supervivencia global de acuerdo a la cantidad de neutrófilos encontrados en sangre periférica, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos. La cantidad disminuida de CD66 presentó una mediana de supervivencia global de 15 meses (IC 95% 9.2-20.8, $p=0.593$) a diferencia de los pacientes que presentaron una mayor cantidad de CD66 en sangre periférica, siendo la supervivencia global de 12.9 meses (IC 2.5-23.32, $p=0.593$) (*Figura 9a*).

Del mismo modo se analizó la intensidad media de fluorescencia del receptor CD47, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas en la mediana de supervivencia 13.7 meses (IC 95% 9.9-17.4) vs 12.9 meses (IC 95% 2.2-23.5), $p=0.801$ (*Figura 9b*).

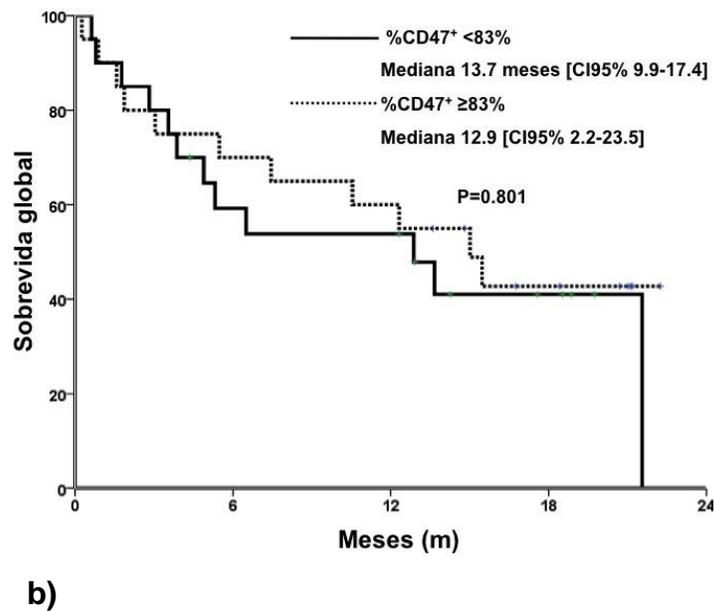
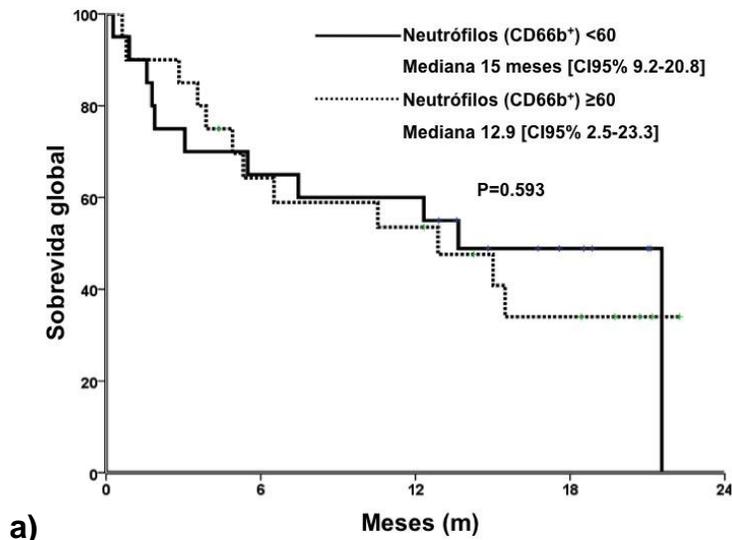


Figura 9. Supervivencia global a 1 año en relación al porcentaje de a) neutrófilos y de b)CD47 evaluados en los pacientes con CPCNP.

En cuanto a la relación de la supervivencia global con la subpoblación de CD66 pero que co-expresa CD47 (CD47MFI de CD66b) se encontró que aquellos pacientes que presentan disminución de la co-expresión de CD47 presentaron una mediana de supervivencia de 21.5 meses (IC 95% 11.0-30.5) a diferencia de aquellos pacientes que presentaron sobreexpresión de CD47MFI de CD66b cuya supervivencia fue de 6.5

meses (IC 95% 0.0-13.2), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0.011$) (Figura 10).

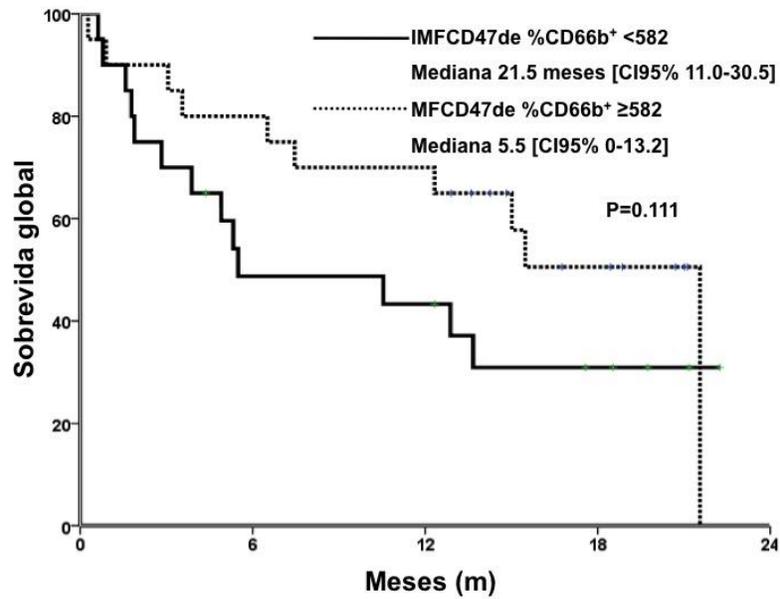


Figura 10. Supervivencia global a 1 año en pacientes con CPCNP en relación a la intensidad medida de fluorescencia de CD47 sobre neutrófilos (CD66b⁺).

IX. DISCUSIÓN

En nuestro estudio la densidad de expresión del receptor CD47 (intensidad media de fluorescencia) se encontró incrementada en los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (2402.12 vs 1042, $p=0.001$) en estadio clínico IV con tres o más metástasis e hipoalbuminemia, correlacionando éstas variables clínicas con la disminución de la supervivencia global de los pacientes (9.67 meses vs supervivencia global no alcanzada en este estudio, $p=0.001$), siendo ésta diferencia estadísticamente significativa. No se encontró ninguna relación con otros parámetros estudiados incluso no se encontró relación con la respuesta al tratamiento a base de quimioterapia.

A pesar de la mayor frecuencia en el grupo estudiado de tabaquismo y de enfermedades crónico degenerativas que en el grupo control (*Tabla 1*) estas diferencias eran de esperarse encontrar ya que estas características son factores de riesgo para presentar cáncer de pulmón, aun así estas características no influenciaron en las diferencias encontradas en la supervivencia global.

CD47 es una proteína integral de membrana tipo 1 compuesta por un dominio inmunoglobulina variable extracelular, cinco segmentos que abarcan la membrana y un extremo citoplásmico terminal de longitud variable que presenta 4 isoformas, siendo la isoforma 2 la más expresada y encontrada en todas las células circulantes e inmunes. (29, 30), su unión con SIRP α permite regular la estimulación o inhibición de la activación de células T (30, 35), y previene la fagocitosis celular (30, 37, 38, 39).

En células apoptóticas se ha observado que los niveles de expresión de CD47 disminuyen (48), las células circulantes que son deficientes en CD47, son fagocitadas rápidamente por macrófagos en el bazo debido a que no poseen esta señal inhibitoria (51).

Se ha observado que, el nivel de expresión de CD47 se correlaciona inversamente con el pronóstico del paciente, de tal manera, que a un nivel alto de expresión de CD47, el pronóstico clínico es desfavorable para el paciente. (4, 27, 55, 56) así como la sobre-

expresión de CD47 en diferentes tipos de tumores y su función como una señal de evasión de la fagocitosis.

En nuestro estudio se confirma al igual que en la literatura que la sobreexpresión de CD47 es inversamente proporcional con la supervivencia global de los pacientes, esto es explicado a que la sobreexpresión de CD47MFI esta relacionada directamente con la resistencia de la fagocitosis, que también se ve traducido en un incremento de la subpoblación de CD66b+CD47

Es de relevancia ya que es la primera vez que se realiza este tipo de análisis en pacientes exclusivamente con cáncer de pulmón de células no pequeñas. Traducido a la practica clínica es de importancia ya que esta sobreexpresión de CD47 puede ser un potencial factor de mal pronóstico para la supervivencia de los pacientes independientemente del tratamiento que se reciba.

En base a los hallazgos también encontrados principalmente en neoplasias hematológicas se han llevado a cabo estudios fase I con anticuerpos anti-CD47, proponiendo mejoría en las tasas de supervivencia de los pacientes

X. BIBLIOGRAFÍA:

1. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. International journal of cancer. Journal international du cancer, 2010. **127**(12): p. 2893-917.
2. 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.
3. Goldstraw, P., et al., *The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours*. Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer, 2007. **2**(8): p. 706-14.
4. Digital, M. *Diario de Salud*. 2008 [cited 2010 10-09-2010]; Available from: <http://www.medicinadigital.com/index.php/salud-pública-en-méxico/18075-inicia-el-incan-protocolo-con-pacientes-mexicanos-con-cancer-de-pulmon.html>.
5. Grimsley, C. and K.S. Ravichandran, *Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals*. Trends in cell biology, 2003. **13**(12): p. 648-56.
6. Lawrence, D.W., et al., *Decreased CD47 expression during spontaneous apoptosis targets neutrophils for phagocytosis by monocyte-derived macrophages*. Early human development, 2009. **85**(10): p. 659-63.
7. Oshima, K., et al., *SHPS-1, a multifunctional transmembrane glycoprotein*. FEBS letters, 2002. **519**(1-3): p. 1-7.
8. Jaiswal, S., et al., *CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis*. Cell, 2009. **138**(2): p. 271-85.
9. Majeti, R., et al., *CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells*. Cell, 2009. **138**(2): p. 286-99.
10. Manna, P.P. and W.A. Frazier, *CD47 mediates killing of breast tumor cells via Gi-dependent inhibition of protein kinase A*. Cancer research, 2004. **64**(3): p. 1026-36.
11. Nagahara, M., et al., *Correlated expression of CD47 and SIRPA in bone marrow and in peripheral blood predicts recurrence in breast cancer patients*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2010. **16**(18): p. 4625-35.

12. Congote, L.F. and N. Temmel, *The C-terminal 26-residue peptide of serpin A1 stimulates proliferation of breast and liver cancer cells: role of protein kinase C and CD47*. FEBS letters, 2004. **576**(3): p. 343-7.
13. Medina-Morales F y Salazar-Flores M. Frecuencia y patrón cambiante de cáncer pulmonar en México. *Salud Pública Mex.* 2000; 42(4): 333-336.
14. Jemal A, Siegel R, Ward E, et ál. Cancer Statistics 2008. *CA Cancer J Clin.* 2008; 58: 71-96.
15. Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers: a different disease. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7: 778-790.
16. Ramírez CE, Cicero SR, Zúñiga CG, Novelo V, Navarro F, Casanova JM. El cáncer broncogénico en el Hospital General de México. Estudio de dos décadas. *Salud Pública Mex.* 1995; 37: 155-161.
17. Franco-Marina F y Villalba-Caloca J. La epidemia de cáncer pulmonar en México. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 2001; 14(4): 207-214.
18. Reynales-Shigematsu LM, Juárez-Márquez SA, Valdés-Salgado R. Costos de atención médica atribuibles al tabaquismo en el IMSS, Morelos. *Salud Pública Mex.* 2005; 47: 451-457.
19. Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest.* 1997; 111: 1710-1717.
20. Alva LLF, Corcho VA, García-Sancho FC, et ál. Epidemiología del cáncer pulmonar en México; hallazgos por imagen. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 2003; 16: 197-204.
21. Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas. Compendio: mortalidad y morbilidad 2001. Secretaría de Salud, Epidemiología. 2001. Fecha de Consulta: 10 de agosto, 2009. Accesible en: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/RHNM.htm>
22. Franco-Marina F y Villalba-Caloca J. La epidemia de cáncer pulmonar en México. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 2001; 14(4): 207-214.
23. Ravichandran, Kodi S. Beginnings of a good apoptotic meal: The find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity.* 2011. Vol 35:445-455.
24. Chao MP, Majeti R y Weissman IL. Programmed cell removal: a new obstacle in the road to developing cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2012; 12 (1): 58-67.
25. Ravichandran K.S. Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *J.Exp.Med.* 2010. vol 207.No 9. 1807-1817.

26. Grimsley C y K.S. Ravichandran. Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat me and come and get me signals. *Trends in Cell Biology*.2003. 13(12): 648-656
27. Gardai S.J, McPhillips K.A, Frasch S.C, Janssen W.J, Starefeldt A, Murphy-Ullrich J.E, Bratton D.L, Oldenborg Per-Arne, Michalak M y Peter M. Henson. Cell-surface calreticulina initiates clearance of viable or apoptotic cells through *trans*- activation of LRP on the phagocyte. *Cell*. 2005. Vol.123. 321-334.
28. Zitvogel L, Kepp O, Senovilla L, Menger L, Chaput N y Guido Kroemer. Immunogenic tumor cell death for optimal anticancer therapy: the calreticulina exposure pathway. *Clin.Cancer.Res.* 2010. 16(12): 3100-3105.
29. Brown Eric J y William A. Frazier. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends in Cell Biology*.2001. Vol. 11. No.3: 130-135
30. Frazier W.A, Isenberg J.S, Kaur S y David. D. Roberts. CD47. 2010. 1:25.
31. Mawby W.J, Holmes C.H, Anstee D.J, Spring F.A y Michael J.A Tanner. Isolation and characterization of CD47 glycoprotein: a multispinning membrane protein which is the same as integrin-associated protein (IAP) and the ovarian tumour marker OA3. *Biochem J*. 1994. 304: 525-530.
32. Cooper D, Lindberg F.P, Gamble J.R, Brown E.J y M.A Vadas. Transendothelial migration of neutrophils involves integrin-associated protein (CD47). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995. Vol 92. 3978-3982.
33. Porter J.C y Nancy Hogg. Integrins take partners: cross-talk between integrins and other membrane receptors. *Trends in Cell Biology*. 1998. Vol.8.390-396.
34. Matozaki T, Murata Y, Okazawa H y Hiroshi Ohnishi. Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRP α signalling pathway. *Trends in Cell Biology*.2009. Vol. 19. No.2. 72-80
35. Barclay Neil. Signal regulatory protein alpha (SIRP α)/CD47.*Current Opinion in Immunology*.2009. 21: 47-52
36. Takizawa Hiroshi y Markus G Manz. Macrophage tolerance: CD47-SIRP α mediated signals matter. *Nature Immunology*.2007. Vol 8. No 12. 1287-1289.
37. Jaiswal Siddhartha, Jamieson Catriona H.M., Pang Wendy W, Park Christopher Y, Chao Mark P, Majeti Ravindra, Traver David, Van Rooijen Nico y Irving Weissman. 2009. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell* 138, 271-285.

38. Chan K.S, Espinosa I, Chao M, Wong D, Ailles L, Diehn M, Gill H, Presti J, Chang H.Y., Van de Rijn M, Shortliffe L y Irving L. Weissman. Identification, molecular characterization, clinical prognosis and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. *PNAS*. 2009. Vol.206. No.33. 14016-14021.
39. Majeti R, Chao M.P, Alizadeh A. A, Pang W.W, Jaiswal S, Gibbs Jr K.D, Van Rooijen N y Irving L. Weissman. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells *Cell*. 2009. 138: 286-299.
40. Chao M.P, Alizadeh A.A, Tang C, Myklebust J.H, Varghese B, Gill S, Jan M, Cha A.C, Chan C.K, Tan B.T, Park C.Y, Zhao F, Kohrt H.E, Malumbres R, Briones J, Gascoyne R.D, Lossos I.S, Levy R, Weissman I.L y Ravindra Majeti. Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate Non-Hodgkin Lymphoma *Cell*. 2010. 142:699- 713.
41. Chao Mark P, Alizadeh Ash A, Tang Chad, Jan Max, Weissman-Tsukamoto Rachel, Zhao Feifei, Park Christopher Y, Weissman Irving L y Ravindra Majeti. Therapeutic antibody targeting of CD47 eliminates human acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*. 2011. 71(4): 1374- 1384
42. Edris B, Weiskopf K, Volkmer A.K, Volkmer J.P, Willingham S.B, Contreras-Trujillo H, Liu J, Majeti R, West R.B, Fletcher J.A, Beck A.H, Weissman I.L y Matt van de Rijn. Antibody therapy targeting the CD47 protein is effective in a model of aggressive metastatic leiomyosarcoma. *PNAS*. 2012.
43. Willingham S.B, Volkmer J.P, Gentles A.J, Sahoo D, Dalerba P, Mitra S.S, Wang J, Contreras-Trujilla H, Martin R, Cohen J.D, Lovelace P, Scheeren F.A, Chao M.P, Weiskopf K, Tang C, Volkmer A.K, Naik T.J, Storm T.A, Mosley A.R, Edris B, Schmid S.M, Sun C.K, Chua M.S, Murillo O, Rajendran P, Cha A.C, Chin R.K, Kim D, Adorno M, Raveh T, Tseng D, Jaiswal S, Enger P.O, Steinberg G.K, Li G, So S.H, Majeti R, Harsh G.R, Van de Rijn M, Teng N.H., Sunwoo J.B, Alizadeh A.A, Clarke M.F y Irving L. Weissman. The CD47- signal regulatory protein alpha (SIRP α) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *PNAS*. 2012.
44. Zhao X.W, van Beek E.M, Schornagel K, Van der Maaden H, Van Houdt M, Otten M.A, Finetti P, Van Egmond M, Matozaki T, Kraal G, Birnbaum D, Van Elsas A, Kuijpers T.W, Bertucci F y Timo K. Van den Berg. CD47-signal regulatory protein alpha (SIRP α) interactions form a barrier for antibody-mediated tumor cell destruction. *PNAS*. 2011. Vol.108. No.45. 18342-18347
45. Nagahara M, Mimori K, Kataoka A. Correlated Expression of CD47 and SIRPA in bone marrow and in peripheral blood predicts recurrence in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2010. 16(18): 4625-4635.

46. Danielsen J.M.R, Knudsen L.M, Dahl I.M, Lodahl M y Thomas Rasmussen. Dysregulation of CD47 and the ligands thrombospondin 1 and 2 in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*. 2007. 138: 756-760.
47. Manna PP, Frazier WA: CD47 mediates killing of breast tumor cells via GI-dependent inhibition of protein kinase A. *Cancer Res*. 2004; 64:1026-1036.
48. Iacopetta B, Grieu F, Phillips M, et al. Methylation levels of LINE-1 repeats and CpG island loci are inversely related in normal colonic mucosa. *Cancer Sci* 2007; 98:1454– 60.
49. Lindberg, F.P. et al. Molecular cloning of Integrin-Associated Protein: an immunoglobulin family member with multiple membrane spanning domains implicated in $\alpha v\beta 3$ -dependent ligand binding. *J. Cell Biol*. 1993; 123, 485–496.
50. Zhuqing Li, Maria J. Calzada, John M. Sipes, Jo Anne Cashel, Henry C. Krutzsch, Douglas S. Annis, Deane F. Mosher, David D. Roberts. Interactions of thrombospondins with $\alpha 4\beta 1$ integrin and CD47 differentially modulate T cell behavior. *The Journal of Cell Biology*. 2002; 157(3): 509-519.
51. Oldenborg, P.A. et al. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science*. 2000; 288, 2051–2054.
52. Lindberg, F.P. et al. Decreased resistance to bacterial infection and granulocyte defects in CD47-deficient mice. *Science*. 1996; 274, 795–798.
53. Hermann, P. et al. The vitronectin receptor and its associated CD47 molecule mediates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes by interaction with soluble CD23. *J. Cell Biol*. 1999; 144, 767–775
54. Brown EJ and Frazier WA. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends in Cell Biology*, 2001; 11(3): 130-135
55. Scannell M, Flanagan MB, deStefani A, Wynne KJ, Cagney G, Godson C, Maderna P. Annexin-1 and peptide derivatives are released by apoptotic cells and stimulate phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages. *J Immunol*. 2007;178:4595– 605.
56. Arrieta, O., et al., Association of nutritional status and serum albumin levels with development of toxicity in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with paclitaxel-cisplatin chemotherapy: a prospective study. *BMC Cancer*. 2010; 10: p. 50- 61.

