



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LINFOCITOS T
CD8⁺ TUMOR-ESPECÍFICOS PROVENIENTES DE PACIENTES CON
CÁNCER PULMONAR

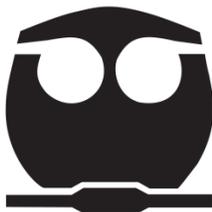
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

CHRISTIAN AXEL PARACHE FACIO

MÉXICO, D.F. JUNIO 2014





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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: José Sulivan López González**

VOCAL: **Profesor: Mario Adán Moreno Eutimio**

SECRETARIO: **Profesor: Heriberto Prado García**

1° SUPLENTE: **Profesor: Sonia Mayra Pérez Tapia**

2° SUPLENTE: **Profesor: Gibran Pérez Montesinos**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: EL PRESENTE TRABAJO FUE DESARROLLADO EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN, LABORATORIO DE CÁNCER PULMONAR, INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS “ISMAEL COSIO VILLEGAS” DE LA SECRETARÍA DE SALUD

ASESOR DEL TEMA:

DR. HERIBERTO PRADO GARCÍA

SUSTENTANTE:

CHRISTIAN AXEL PARACHE FACIO

ÍNDICE

Abreviaturas	i
INTRODUCCIÓN	1
Cáncer	1
“Hallmarks” del cáncer	1
- Potencial replicativo ilimitado	1
- Angiogénesis sostenida	2
- Autosuficiencia en las señales de crecimiento	2
- Insensibilidad a las señales antiproliferativas	2
- Evasión de la apoptosis	3
- Invasión a tejidos y metástasis	3
- Reprogramación metabólica	3
- Evasión del sistema inmunitario.....	4
Estadísticas del cáncer	4
Cáncer de pulmón.....	5
- Clasificación histológica del cáncer de pulmón.....	5
Derrame pleural	7
Derrame pleural maligno.....	8
Linfocitos T CD8 ⁺	9
Proliferación y diferenciación de los linfocitos T CD8 ⁺	10
Mecanismos efectoros de los CTLs	13
Respuesta inmunológica contra el cáncer	14
Generalidades	14
Teoría de la Inmunoedición	14
Mecanismos de evasión tumoral a los CTLs	15
ANTECEDENTES	19
Antígenos tumorales	19
Clasificación de los antígenos tumorales.....	19
Antígeno asociado a melanoma 3A (MAGE-3A).....	13
Proteína del tumor de Wilms (WT-1).....	13

Expresión y función de la molécula CD137 en linfocitos T CD8 ⁺ antígeno específicos.....	14
Agotamiento en linfocitos T CD8 ⁺ y su relación en cáncer	16
Receptor de muerte programada 1 (PD-1) o CD279	18
Proteína 3 que contiene el dominio de mucina y el dominio de inmunoglobulina de las células T (TIM-3)	19
Cooperación de TIM-3 y PD-1 en el agotamiento de los linfocitos T CD8 ⁺	20
Detección de linfocitos T CD8 ⁺ en adenocarcinoma pulmonar	21
HIPÓTESIS	23
OBJETIVO	23
General	23
Particulares.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
Inmunotinción	26
Estimulación de CMNLP y CMNSP	26
Inmunotinción de CMNLP y CMNSP post estimulación.....	27
Análisis citométrico de los linfocitos T CD8 ⁺ y sus subpoblaciones naïve, memoria y efectora	28
RESULTADOS	40
Los péptidos pp65CMV, MAGE-3A o WT-1 aumentan el porcentaje de linfocitos T CD8 ⁺ CD137 ⁺ y T CD4 ⁺ CD137 ⁺	40
Los linfocitos T CD8 ⁺ CD137 ⁺ activados por los péptidos pp65CMV, MAGE-3A y WT-1 son principalmente de fenotipo de memoria	43
PD-1 se expresó predominantemente en los linfocitos T CD8 ⁺ CD137 ⁺	45
La población de los linfocitos T CD8 ⁺ no presentan un fenotipo de agotamiento	48
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFÍA	48

Abreviaturas

Acs	Anticuerpos
APCs	Células presentadoras de antígeno profesionales
CMNs	Células mononucleares
CMNLP	Células mononucleares de líquido pleural
CMNSP	Células mononucleares de sangre periférica
CTLs	Linfocitos T citotóxicos
DCs	Células dendríticas
IDO	Indolamina-2,2-dioxigenasa
IFN	Interferón
IL	Interleucina
MAGE-3A	Antígeno asociado a melanoma 3A
MDSC	Células supresoras de origen mieloide
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
NK	Células asesinas naturales
NKT	Linfocitos T asesinos naturales
PBS	amortiguador de fosfato salino
PD-1	Receptor de muerte programada 1
PD-L1	Ligando de muerte programada 1
PD-L2	Ligando de muerte programada 2
PGE2	Prostaglandina E2
SCLC	Carcinoma pulmonar de células pequeñas
SNCLC	Carcinoma pulmonar de células no pequeñas
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute

TAA	Antígenos asociados a tumor
TAM	Macrófagos asociados a tumor
TCR	Receptor de células T
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
TIL	Linfocitos infiltrantes de tumor
TIM-3	Proteína 3 con dominio de inmunoglobulina y dominio de mucina en células T
TNF	Factor de necrosis tumoral
TP53	Gen que codifica para la proteína p53
TRAIL	Ligando inductor de muerte asociado al TNF
Treg	Célula T reguladora
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento endotelial
VEGF	Factor de crecimiento endotelial
WT-1	Tumor de Wilms

INTRODUCCIÓN

Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizado porque las células neoplásicas presentan alteraciones genéticas y epigenéticas, principalmente en los genes supresores de tumor y protooncogenes. Estas alteraciones genéticas permiten que las células neoplásicas adquieran capacidades y características denominadas “hallmarks”, que les confieren un potencial maligno.^(17,51) Los “hallmarks” que presentan las células malignas son: potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, evasión de la apoptosis, autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales antiproliferativas, invasión de tejido y metástasis. Recientemente, los investigadores han incluido a la reprogramación metabólica y la evasión al sistema inmune, como la séptima y la octava marca del fenotipo maligno.^(17,34,51) En la actualidad no es suficiente definir al cáncer mediante la enumeración de los “hallmarks” que presentan las células malignas, sino también se debe considerar la contribución del microambiente tumoral, la participación de las células del estroma asociadas al tumor y a las células inflamatorias, ya que favorecen el desarrollo del tumor y la aparición de los “hallmarks”.⁽¹⁷⁾

“Hallmarks” del cáncer

- Potencial replicativo ilimitado

Los telómeros están compuestos de hexanucleótidos repetidos en tándem y protegen los extremos del DNA. La longitud del DNA telomérico determina las veces que se puede dividir la célula antes de que los telómeros se erosionen y pierdan su función protectora, provocando la muerte de las células. En las células tumorales (aproximadamente 90%) los niveles de expresión y función de la telomerasa está aumentada, lo que permite el alargamiento del DNA telomérico y favoreciendo la inmortalidad de las células tumorales.^(16,17)

- *Angiogénesis sostenida*

Durante la embriogénesis, el desarrollo de la vasculatura involucra la creación de nuevas células endoteliales y su ensamblaje para formar vasos sanguíneos, además el surgimiento de nuevos vasos de los ya existentes. En el adulto, como parte de procesos fisiológicos tales como la cicatrización y en el ciclo reproductor femenino, la angiogénesis se lleva a cabo de forma transitoria. En contraste, durante la progresión tumoral, un “switch angiogénico” es casi siempre activado y permanece encendido, favoreciendo la invasión y el crecimiento neoplásico. El “switch angiogénico” es regulado por factores que inducen o inhiben la angiogénesis.^(16,17)

- *Autosuficiencia en las señales de crecimiento*

Las células tumorales adquieren su autonomía en la proliferación y crecimiento celular, por mutaciones en los receptores y proteínas intracelulares responsables de la transmisión de las señales de crecimiento. Las señales de crecimiento están desreguladas y la mayoría transmiten la producción de factores de crecimiento que se unen a receptores presentes en la superficie de las células. Las células tumorales producen factores de crecimiento por estimulación autocrina o alternativamente estimulan a las células del estroma asociadas al tumor a producirlas; generando una compleja red de señalización que conduce a la proliferación celular.^(16,17)

- *Insensibilidad a las señales antiproliferativas*

Diversos genes supresores de tumor gobiernan las decisiones de crecimiento y proliferación celular. Los dos genes supresores de tumor mejor caracterizados son RB (retinoblastoma) y TP53 que codifica para la proteína p53. El RB transmite señales de origen extracelulares que inhiben el crecimiento celular, mientras TP53 recibe señales de estrés y detecta anomalías en el funcionamiento de la célula que se mencionaran más adelante. En las células neoplásicas principalmente hay defectos en la vía del RB por hipofosforilación o ausencia de RB, permitiendo el crecimiento y la proliferación de las células tumorales.^(16,17)

- Evasión de la apoptosis

Las células tumorales sobreviven no sólo por la continua proliferación celular, sino también por la reducción en la tasa de eliminación celular, debida principalmente a la apoptosis. El producto del gen supresor de tumor TP53 detecta daños en el DNA, cuando los daños en el DNA no pueden ser reparados, TP53 induce apoptosis aumentando la expresión de Noxa y Puma (proteínas pro-apoptóticas). Comúnmente, las células tumorales pierden la función del producto de TP53 evitando así la apoptosis. Los tumores también pueden evitar la apoptosis aumentando la expresión de reguladores anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-X_L); de señales de supervivencia (IL-3 o factor de crecimiento parecido a la insulina 1/2); por la regulación negativa de los factores pro-apoptóticos (Bax, Bim, Puma) y por fallas en la vía extrínseca (Fas/FasL).^(16,17)

- Invasión a tejidos y metástasis

Es un proceso esquematizado que comienza con la invasión local por las células neoplásicas, seguido de la intravasación, luego extravasación y finalmente con el crecimiento de las lesiones micrometastásicas en el tejido distante, este último paso se ha denominado “colonización”. Está claro que las células neoplásicas presentan alteraciones en su forma y adherencia. Las células de carcinoma presentan alteraciones en la molécula E-cadherina, proteína clave en la adhesión entre células epiteliales. Por el contrario, en células de carcinoma invasivo se ha observado la expresión de N-cadherina, molécula de adhesión que se expresa normalmente en la migración de neuronas y células mesenquimales durante la organogénesis.^(16,17)

- Reprogramación metabólica

Otto Warburg observó por primera vez anomalías en el metabolismo energético en células neoplásicas. Observó que incluso en presencia de oxígeno, las células neoplásicas pueden reprogramar su metabolismo de glucosa, principalmente a glucólisis, lo que lleva a un estado denominado “glucólisis aeróbica o efecto Warburg”. Dicha reprogramación metabólica compensa la menor producción de ATP aumentando la expresión de transportadores de glucosa, en particular GLUT 1. El aumento de la glucólisis desvía intermediarios glucolíticos para ser empleados

en las vías biosintéticas para la síntesis de nucleósidos y aminoácidos, esto favorece, la biosíntesis de macromoléculas y organelos necesarios para el ensamblaje de nuevas células, además de mantener una alta tasa de proliferación de las células neoplásicas.⁽¹⁷⁾

- Evasión del sistema inmunitario

Los componentes celulares del sistema inmunitario innato y adaptativo contribuyen de manera significativa para erradicar la formación y progresión de tumores. Los tumores evaden al sistema inmunitario mediante la inactivación de sus componentes que han sido reconocidos por la respuesta antitumoral.⁽⁵¹⁾ Por ejemplo, la secreción de TGF- β , IL-10, el reclutamiento de células T reguladoras (Tregs), entre otros. Deficiencias en el desarrollo o función de los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CLT), células Th1 y/o linfocitos asesinos naturales (NK) aumenta la incidencia de tumores. Esto se ha observado en ratones modificados genéticamente y de la epidemiología clínica.⁽¹⁷⁾

Estadísticas del cáncer

El cáncer es la principal causa de muerte en países desarrollados y la segunda causa de muerte en países subdesarrollados. Los casos de cáncer en los países subdesarrollados están incrementándose debido al envejecimiento, crecimiento de la población, así como la adopción de estilos de vida asociados al cáncer como el fumar. Se estimaron 56% de casos de cáncer y 64% de muertes en estos países en el 2008; hay que señalar que el cáncer tiende a ser diagnosticado en etapas tardías en muchos países subdesarrollados en comparación con los países desarrollados y esto, combinado con la reducción del acceso a los servicios médicos y prácticas de diagnóstico, tiene un efecto adverso en la supervivencia.⁽²¹⁾

En el 2008 se estimaron cerca de 12.7 millones de casos de cáncer y 7.6 millones de muertes por cáncer en todo el mundo.⁽²¹⁾

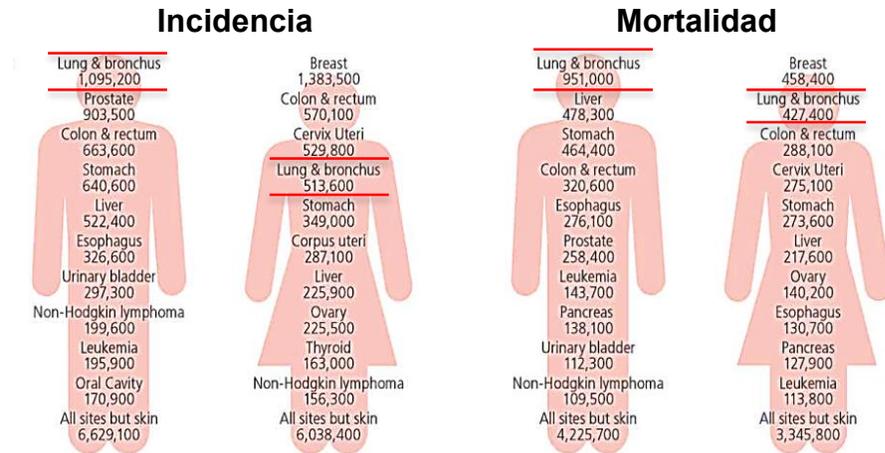


Figura 1. Incidencia y mortalidad del cáncer a nivel mundial de acuerdo a los principales sitios anatómicos que afecta, reportados en el año 2008. Ver referencia (21)

Cáncer de pulmón

Con respecto al cáncer de pulmón, las células del epitelio respiratorio adquieren un fenotipo maligno debido a factores físicos y químicos, que alteran genes implicados en procesos fisiológicos fundamentales de las células que favorece la aparición de los “hallmarks” del cáncer.⁽³⁶⁾

Clasificación del cáncer de pulmón

- Clasificación histológica del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón se clasifica como carcinoma de células pequeñas (SCLC por sus siglas en inglés) o carcinoma de células no pequeñas (NSCLC por sus siglas en inglés) para facilitar el pronóstico y decisiones de tratamiento.⁽⁶⁾

El NSCLC incluye al adenocarcinoma, al carcinoma de células escamosas y el carcinoma de células grandes, representan casi el 85-90% de todos los casos de cáncer de pulmón y junto con el SCLC con un 10-15% son los principales tipos histológicos.⁽⁶⁾ A continuación se mencionan algunas características de estos tipos histológicos:

Adenocarcinoma: Tiene una prevalencia del 40% en los pacientes con cáncer pulmonar. La masa tumoral es muy heterogénea y crece en la periferia del pulmón; además, los pacientes presentan metástasis en etapas temprana.^(6,34)

Carcinoma de células escamosas (epidermoide): Tiene una prevalencia del 25% en los pacientes con cáncer pulmonar. Típicamente su localización es endobronquial y los pacientes pueden presentar hemoptisis, neumonía post-obstrucciona o colapso lobular. A diferencia del adenocarcinoma pulmonar.⁽⁶⁾

Carcinoma de células grandes: Tiene una prevalencia del 10% en los pacientes con cáncer pulmonar. Son tumores pobremente diferenciados y crecen en la periferia del pulmón; se asocia con metástasis temprana.⁽⁶⁾

Carcinoma pulmonar de células pequeñas: Tiene una prevalencia del 20% en los pacientes con cáncer pulmonar. Clínicamente son los más agresivos, su localización son en las vías aéreas centrales extendiéndose al mediastino y se asocia con diseminación extratorácica temprana.⁽⁶⁾

Estadísticas del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón fue el más diagnosticado y la principal causa de muerte en hombres en el 2008 a nivel mundial. Entre las mujeres, fue el cuarto tipo de cáncer diagnosticado y la segunda causa de muerte en el mismo año.⁽²¹⁾ En general el cáncer de pulmón representa el 13% del total de casos de cáncer y el 18% de muertes, también es una enfermedad de adultos mayores con una edad promedio de diagnóstico de aproximadamente 70 años.^(21,36) El cáncer de pulmón se diagnostica en etapas avanzadas en la mayoría de los pacientes, razón de la alta tasa de mortalidad asociada a esta enfermedad.⁽³⁶⁾

Se conocen factores de riesgo como la exposición a carcinógenos ambientales como asbesto, arsénico, radón, níquel, cromo, cloruro de vinilo, hidrocarburos aromáticos policíclicos, radiación y el tabaco.^(21,6) El tabaquismo es el principal factor etiológico responsable del 80% de todos los casos de cáncer en hombres y el 50% de casos en mujeres a nivel mundial^(21,36), pero mucho de estos casos en todo el mundo se podrían evitar mediante la aplicación de campañas de control del tabaco; por ejemplo se ha observado que un aumento en el 10% en el precio de los cigarrillos reduce su consumo de un 3% a un 5%.⁽²¹⁾ Estas campañas han mostrado una reducción positiva del tabaquismo en la población en general, aún así el cáncer de pulmón seguirá siendo un problema de salud para los próximos 40 a 50 años.⁽³⁶⁾

También se han asociado como factores de riesgo para desarrollar cáncer de pulmón a las enfermedades pulmonares no malignas preexistentes, tales como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis pulmonar idiopática y la tuberculosis.⁽⁶⁾

Derrame pleural

Las pleuras son membranas epiteliales húmedas que cubren y protegen a los pulmones. La capa superficial, o pleura parietal, reviste la parte interna de la cavidad torácica. La capa profunda, o pleura visceral, cubre la superficie de los pulmones. Entre la pleura parietal y visceral existe un espacio denominado espacio intrapleural que contiene una película de líquido segregado por la pleura parietal. La principal función del líquido del espacio intrapleural es actuar como lubricante, de forma que los pulmones puedan resbalar con relación al tórax durante la respiración.⁽¹⁵⁾ Normalmente, el espacio pleural contiene de 10 ml a 25 ml de líquido.^(4,34)

El movimiento del líquido entre la pleura parietal y visceral está determinado principalmente por la presión hidrostática y osmótica de los capilares, por el drenaje linfático y el estado de la superficie de las membranas pleurales siendo la pleura visceral mucho más vascularizada que la pleura parietal, por lo que ofrece menos resistencia al desplazamiento del líquido y la capacidad de reabsorción de la pleura visceral es mayor que la capacidad de trasudación de la pleura parietal. Si se alteran uno o varios de estos factores, se produce la acumulación de un exceso de líquido en el espacio pleural. El aumento de la presión hidrostática en los capilares de la pleura visceral o la disminución de la presión oncótica del plasma determinan la acumulación de líquido en forma pasiva en el espacio pleural (trasudado). Por otro lado, el estado de la superficie de las membranas pleurales y el drenaje linfático son los otros dos factores cuya alteración es capaz de provocar derrame pleural. Se denomina derrame pleural a la acumulación de líquido en ese espacio provocando síntomas como disnea, tos y dolor torácico, deteriorando la calidad de vida y limitando la supervivencia de los pacientes.^(34,4,41) Esto se observa en las enfermedades que comprometen la pleura, y la acumulación de líquido se produce

en forma activa por un proceso inflamatorio que altera la permeabilidad de los vasos pleurales o provoca un bloqueo linfático (exudado).⁽⁴⁾

Derrame pleural maligno

El líquido pleural se acumula cuando es mayor su producción que su eliminación a causa del bloqueo del sistema del drenaje linfático por la invasión de los tumores y/o la permeación excesiva del plasma a través de la red de capilares al aumentar la permeabilidad. Estudios han demostrado que el aumento en la permeabilidad de los capilares es debido a la producción de mediadores vasoactivos producidos por los tumores, como el VEGF. Nuevas evidencias sugieren que células inflamatorias, células endoteliales y células mesoteliales, presentes en el microambiente pleural, interactúan con las células tumorales y contribuyen a la formación del derrame pleural maligno.⁽⁴¹⁾

El 40% de los derrames pleurales son de origen neoplásico.⁽⁴⁾ Sus causas más frecuentes son:

- ***Cáncer broncogénico:*** es la neoplasia maligna que más a menudo produce derrame pleural unilateral mediante dos mecanismos: por invasión directa de la pleura o por obstrucción del drenaje linfático.⁽⁴⁾
- ***Carcinomas metastásicos:*** habitualmente provoca derrame bilateral. El carcinoma de mama es por mucho el más frecuente, seguido por los carcinomas de ovario, riñón, estómago y páncreas.⁽⁴⁾
- ***Linfomas y leucemias:*** Después del cáncer broncogénico y de las metástasis de cáncer de mama, siguen en orden de frecuencia como productores de derrame pleural.⁽⁴⁾

El adenocarcinoma pulmonar causa en mayor medida derrame pleural, porque el tumor primario se forma en la periferia del pulmón e invade la cavidad pleural.⁽⁵⁰⁾

En los derrames pleurales malignos hay infiltración de células del sistema inmunitario, así como de células tumorales por lo que es ideal para estudiar la interacción entre el tumor y las células del sistema inmunológico.⁽³⁴⁾

Linfocitos T CD8⁺

Los linfocitos T citotóxicos (CTLs) son células que forman parte de la respuesta inmunitaria adaptativa. Dichas células reconocen y eliminan células que muestran en su superficie péptidos no propios asociados a las moléculas de clase I, codificados por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Estos péptidos pueden derivar de agentes patógenos que se replican dentro de las células, como los virus o las bacterias intracelulares^(32,30), o de células tumorales.

En el organismo, las células nucleadas presentan péptidos endógenos propios asociados a moléculas del MHC Clase I. Cuando la célula es infectada por patógenos intracelulares o presenta mutaciones en su genoma, sintetiza proteínas producidas por estos patógenos o por los genes propios alterados. Los péptidos derivados de estas proteínas no propias desplazan a los péptidos provenientes de las proteínas propias en su asociación a la molécula de Clase I.⁽³²⁾

Para el reconocimiento de los péptidos no propios, los CTLs expresan en su superficie el receptor de la célula T (TCR). Cada clona de CTL lleva a cabo la combinación azarosa de distintos segmentos variables y constantes que codifican cada una de las dos cadenas que forman el TCR. Posterior al reconocimiento del antígeno es necesaria la coestimulación celular apropiada que involucra a distintas moléculas de superficie como a factores solubles.⁽³²⁾ Posteriormente, los CTLs antígeno específicos inician un proceso de expansión clonal y diferenciación a células efectoras, mucho de los cuales entran a sangre periférica y se dirigen al lugar de infección⁽²⁴⁾; en este proceso de activación, los CTLs van modificando sus moléculas de superficie (fenotipo), secretando citocinas como interferón- γ (IFN- γ), factor de necrosis tumoral (TNF); así como adquiriendo la maquinaria citóctica (granzimas y perforinas) que permitirá controlar la infección o eliminarla, destruyendo específicamente a las células que indujeron su activación.^(32,24) En humanos, los marcadores de superficie que se emplean para identificar las subpoblaciones de linfocitos T CD8⁺ se observa en la Tabla 3.

Proliferación y diferenciación de los linfocitos T CD8⁺

La respuesta proliferativa de los linfocitos T a un antígeno se caracteriza por tres etapas: expansión clonal, contracción de la población de los linfocitos T efectores y formación de los linfocitos T de memoria.⁽²⁴⁾ Las APCs que presentan los péptidos derivados de patógenos intracelulares o células tumorales inducen un estímulo que promueve la proliferación y diferenciación de los linfocitos T CD8⁺ naïve. Los linfocitos T CD8⁺ naïve expresan receptores coestimuladores que amplifican las señales del complejo TCR-CD3 para iniciar la activación.

CD28 es la principal molécula coestimuladora necesaria para la activación de los linfocitos T naïve, otros receptores pueden compensar la ausencia de CD28, tal es el caso de CD2 que activa a los linfocitos T naïve de manera dependiente de ZAP70.⁽¹¹⁾ Además, CD27 que está constitutivamente expresado en los linfocitos T naïve puede promover su proliferación, aunque es ineficaz de iniciar el ciclo celular en ausencia de la coestimulación de CD28.⁽¹¹⁾ Los linfocitos T al llevar a cabo las sinapsis inmunológica empiezan a multiplicarse, de manera que un linfocito T naïve da lugar a una clona de aproximadamente 1000 células hijas de especificidad idéntica en un periodo de 3 a 5 días. Estas células se diferencian a células efectoras como los CTLs.⁽³⁰⁾

Después de la eliminación del patógeno, los linfocitos T CD8⁺ efectores presentan una fase de contracción, en la que la mayoría de los linfocitos T CD8⁺ antígeno específicos mueren por apoptosis. Sin embargo, un pequeño porcentaje (aproximadamente 5-10%) sobrevive para diferenciarse a linfocitos T CD8⁺ de memoria.⁽²⁴⁾ Los linfocitos T CD8⁺ de memoria mantienen una tasa de proliferación baja que es dependiente de citocinas, principalmente por IL-7 e IL-15. Al entrar nuevamente en contacto con el antígeno se reactivan con mucha mayor rapidez que los linfocitos T naïve, lo que asegura una respuesta protectora más rápida y eficaz ante un segundo encuentro con su antígeno.^(30,24)

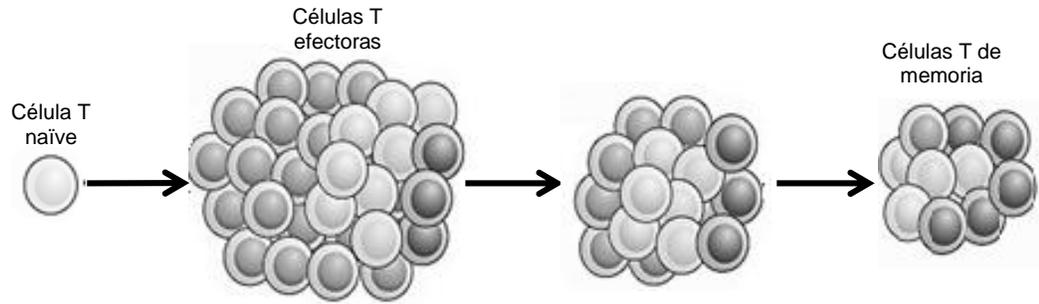


Figura 2. Proceso lineal de diferenciación de las células T posterior a la estimulación con el antígeno específico. Imagen modificada de (24)

Marcadores distintivos de las subpoblaciones de los linfocitos T CD8⁺ en humanos

Tabla 3. Marcadores de superficie y descripción de los linfocitos T CD8⁺

<i>Subpoblación de linfocito T CD8⁺</i>	<i>Marcadores de superficie</i>	<i>Descripción</i>
Naïve	CD3 ⁺ , CD8 ⁺ , CCR7 ⁺ , CD27 ⁺ , CD28 ⁺ , CD44 ⁻ , CD62L ^{hi} , IL-7R (CD127) ⁺ , CD45RO ⁻ , CD45RA ⁺ .	Células que no han estado en contacto con su antígeno. Se encuentran en los nódulos linfáticos donde son activadas por APCs.
Efector	CD3 ⁺ , CD8 ⁺ , CCR7 ⁻ , CD27 ⁻ , CD28 ⁻ , CD44 ⁻ , CD62L ⁻ , IL-7R (CD127) ^{low} , CD45RO ⁻ , CD45RA ⁺ .	Células citotóxicas con la maquinaria para eliminar células infectadas y células malignas, mediante la vía dependiente de gránulos y la vía del receptor, que causa apoptosis en la célula blanco.
Memoria central	CD3 ⁺ , CD8 ⁺ , CCR7 ^{hi} , CD27 ⁺ , CD28 ⁺ , CD44 ⁺ , CD62L ^{hi} , IL-7R (CD127) ⁺ , CD45RO ⁺ , CD45RA ⁻ , IL-15R ⁺ .	Residen en órganos linfoides secundarios, posterior a su función efectora. Proliferan y se diferencian a células efectoras por un segundo contacto con el antígeno. No tienen funciones efectoras inmediatas.
Memoria efectora	CD3 ⁺ , CD8 ⁺ , CCR7 ^{low} , CD27 ⁺ , CD28 ⁺ , CD44 ⁺ , CD62L ^{low} , IL-7R (CD127) ⁺ , CD45RO ⁺ , CD45RA ⁻ , IL-15R ⁺ .	Se localizan en tejidos periféricos. Se diferencian rápidamente a células efectoras, tras un segundo contacto con el antígeno, proporcionando protección inmediata sintetizando citocinas, así como funciones citotóxicas.

Ver referencias (9,32)

Mecanismos efectores de los CTLs

Una vez que los CTLs han adquirido su maquinaria citóctica reconocen a las células que expresan los antígenos que promovieron su activación (célula blanco) y se unen a dichas células para formar conjugados CTL-célula blanco. En esta interacción, los CTLs inducen en la célula blanco un “golpe mortal” en cuestión de minutos. Tras lo cual, los CTLs se disocian de las células blanco, que muere subsecuentemente por apoptosis, mientras que los CTLs pueden seguir destruyendo células adicionales.^(32,31)

Las vías que conducen a la muerte de las células blanco son:

- Vía dependiente de gránulos: Endosomas que contienen granzimas y perforinas, proteínas con alto potencial citotóxico que son liberadas a las células blanco.⁽³¹⁾
- Vía mediada por receptor: La interacción membranal entre las células blanco y los CTLs induce en este último la expresión en su membrana de la molécula FasL, la cual al interactuar con Fas, presente en las células blanco, desencadenan el proceso de muerte por apoptosis.⁽³¹⁾

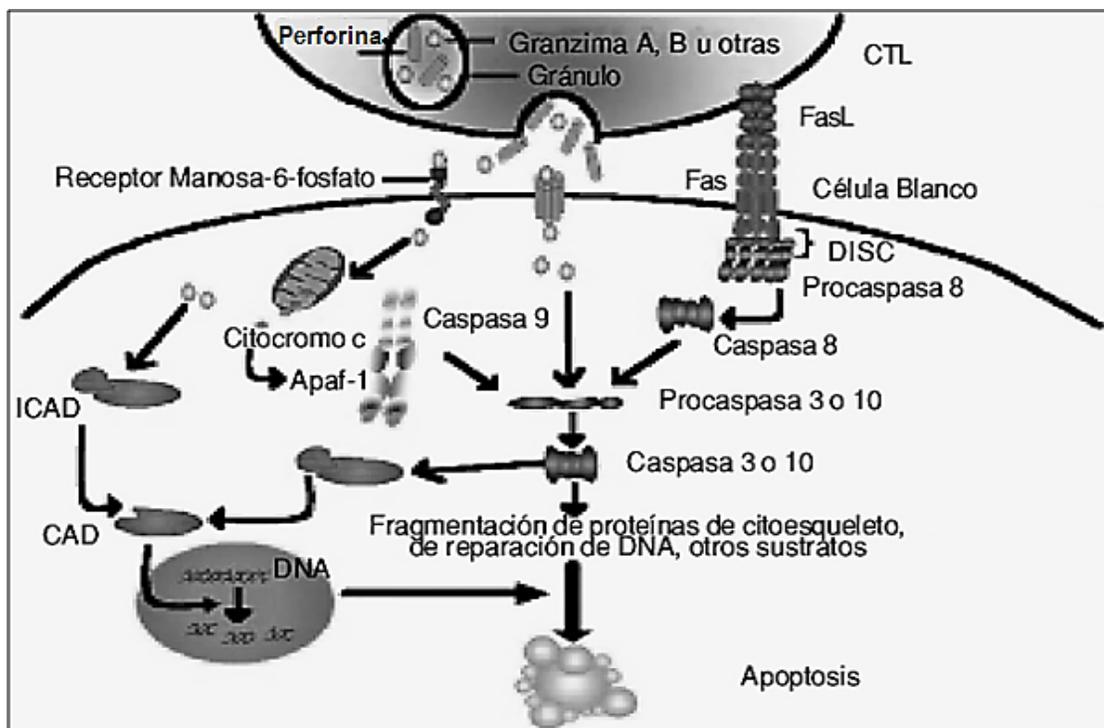


Figura 6. Mecanismos citotóxicos de los linfocitos T CD8⁺ efectores. Ver referencia (33)

Respuesta inmunológica contra el cáncer

Generalidades

El sistema inmunológico es capaz de reconocer antígenos y eliminar a las células que lo expresan.⁽⁸⁾ Durante el desarrollo tumoral, las células presentan cambios genéticos y epigenéticos que causan inestabilidad genómica, característica esencial de la oncogénesis y la tumorigénesis. Estas alteraciones genéticas y epigenéticas inducen cambios en las proteínas propias generando antígenos tumorales. Dichos antígenos son detectados por los sistemas inmunitarios innato y adquirido.^(51,8)

En etapas iniciales pueden liberarse al microambiente tumoral “señales de alarma” que favorecen el reclutamiento de las células del sistema inmunitario. Los linfocitos T, células NK, y linfocitos NKT son las células que principalmente infiltran a los tumores causando regresión tumoral, lo que se asocia con un pronóstico favorable en múltiples neoplasias humanas incluyendo carcinoma pulmonar.^(34,51) En este sentido, la comprensión de la inmunología tumoral y de la inmunopatogénesis del cáncer está progresando rápidamente. Este conocimiento impactará en la aplicación de mejores opciones inmunoterapéuticas contra el cáncer.⁽⁸⁾

Teoría de la Inmunoedición

F.M. Burnet denominó “inmunovigilancia” a la capacidad del sistema inmunitario para detectar células tumorales y destruirlas.^(30,51) Datos acumulados de modelos animales y pacientes con cáncer soportan fuertemente el concepto de Burnet, de que el sistema inmunitario puede reconocer y eliminar células premalignas. Sin embargo, el sistema inmunitario también puede promover la progresión del tumor a través de la inflamación crónica, inmunoselección de variantes pobremente inmunogénicas y la supresión de la inmunidad antitumoral. La teoría que describe las acciones inmunitarias de eliminación y promoción del tumor se conoce como inmunoedición del cáncer.⁽⁴⁶⁾

La inmunoedición es un proceso dinámico que considera tres etapas:

- ✓ “Fase de eliminación”: Los sistemas inmunitario innato y adaptativo detectan y eliminan a las células transformadas.^(46,30,45,51)

- ✓ “Fase de equilibrio”: Ocurre cuando la eliminación de las células tumorales no es completa. Lo anterior se debe a que la inestabilidad genómica de las células tumorales favorece gradualmente el desarrollo de variantes celulares que bloquean los mecanismos de eliminación de las células inmunitarias o producen factores solubles que disminuyen la funcionalidad de las células inmunitarias. Estas poblaciones tumorales prevalecerán como resultado de la presión selectiva impuesta por el sistema inmunitario.^(46,30,45,51)
- ✓ “Fase de escape”: Ocurre cuando las células tumores han acumulado suficientes mutaciones para evadir eficientemente la respuesta del sistema inmunitario, esto es por inmunoselección o inmunosubversión. El crecimiento del tumor es favorecido por el microambiente inmunosupresor, hasta que el tumor se hace clínicamente detectable.^(46,30,45,51)

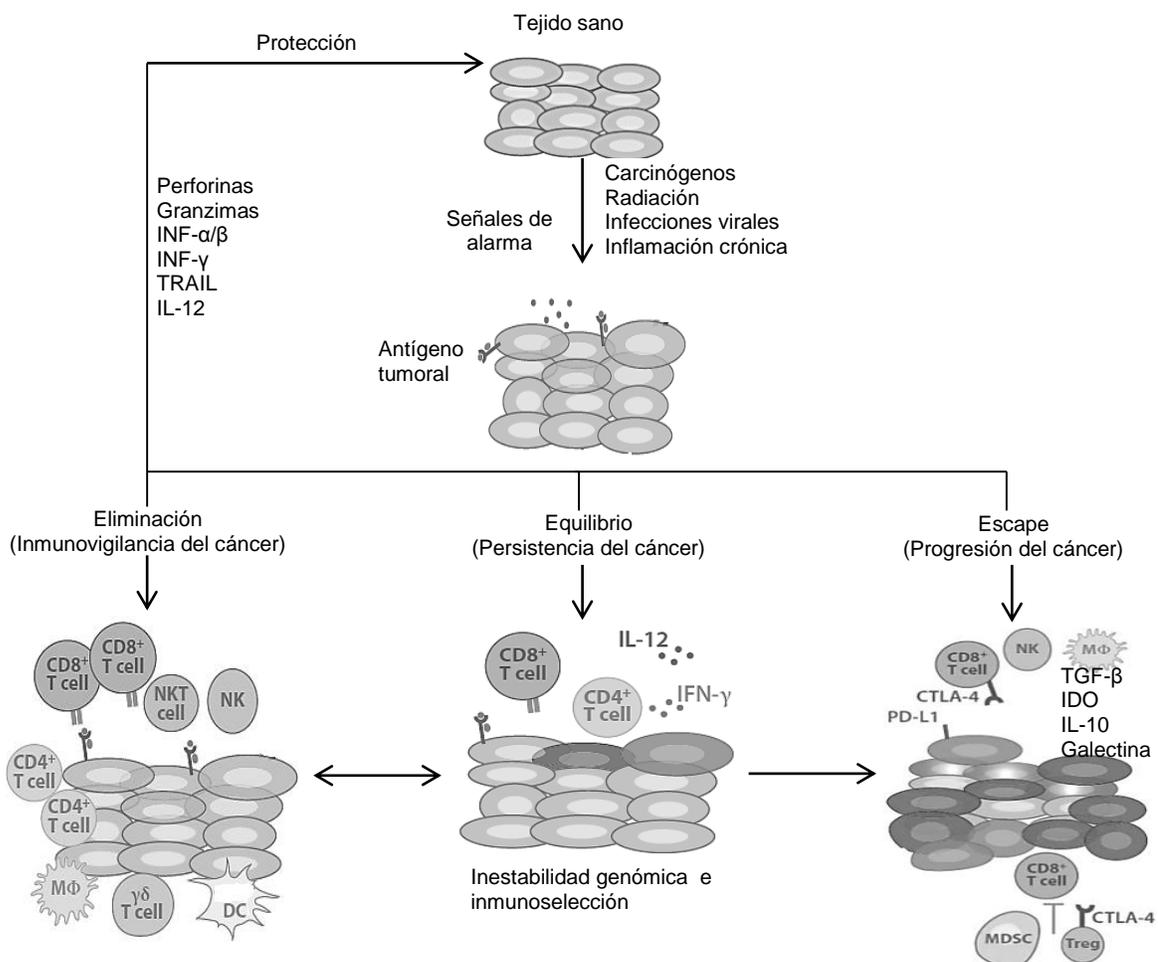


Figura 7. Proceso dinámico de las tres fases de la inmunoección del cáncer: Eliminación, equilibrio y escape. Imagen modificada de (45)

Mecanismos de evasión tumoral a los CTLs

- **Los tumores pueden tener una baja inmunogenicidad.** Algunos estudios han indicado que hay una expresión disminuida o nula de péptidos y de moléculas del MHC de clase I. Así los tumores evitan ser reconocidos por los CTLs.^(30,32)
- **Células supresoras de origen mieloide (MDSC).** Como su nombre lo dice, las MDSC tienen la capacidad de suprimir la respuesta inmunológica específica y no específica al tumor mediante la producción de arginasa, sintasa de óxido nítrico (NOS) e IL-10. La IL-10 suprime indirectamente la respuesta antitumoral de los linfocitos T al alterar la producción de citocinas, expresión de las moléculas del MHC y moléculas coestimuladoras (CD40) en APCs (DCs y macrófagos), que son requeridas para la activación de los linfocitos T. Las MDSC al ser estimuladas por IL-10 y TGF- β , produce enzimas inmunoreguladoras como arginasa 1 y NOS que metabolizan L-arginina a óxido nítrico (NO) e iones hidróxilo. Estas especies reactivas de oxígeno inhiben directamente las funciones de los linfocitos T e inducen su apoptosis, además que la L-arginina es un aminoácido esencial necesario para el correcto funcionamiento de los linfocitos T, ya que cuando la L-arginina no está disponible disminuye la expresión del TCR y se inhibe la respuesta de los linfocitos T antígeno específicos. Las MDSC también influyen en la producción de indolamina-2,2-dioxigenasa (IDO) derivada de tumor. Esta enzima cataboliza triptófano, aminoácido esencial para la diferenciación de los linfocitos T.⁽⁴³⁾
- **Células Treg:** Las citocinas secretadas en el microambiente tumoral inducen la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ hacia células Treg. Las células Treg suprimen la respuesta específica de los linfocitos T CD8⁺ en contra del tumor, ya que favorecen la tolerancia de antígenos asociados a tumor y secretan citocinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF- β . Además son capaces de eliminar directamente a los linfocitos T y APCs, a través de perforinas y granzimas B.^(43,54) Por otra parte, las células Treg expresan el receptor de

alta afinidad de IL-2. Por lo tanto, la competición por la IL-2 entre las células Treg y células T sugieren un disponibilidad limitada de esta citocina en el microambiente tumoral.⁽⁵⁴⁾ También, las células Treg CTLA-4⁺, provenientes de tumores humanos, median su capacidad supresora induciendo la expresión de IDO (enzima inmunosupresora) en APCs a través de CTLA-4.⁽⁵⁴⁾

- **Citocinas y quimiocinas.** Estos factores pueden ser producidos por células tumorales, células inmunes infiltrantes al tumor, células epiteliales y células del estoma asociadas al tumor. A menudo estas células secretan moléculas, como:

TGF- β . El TGF- β recluta células Treg y MDSC, mejorando en las células Treg sus funciones y supervivencia por la inducción del factor de transcripción FOXP3. También, el TGF- β puede alterar las funciones de las APCs inhibiendo su maduración, la secreción de citocinas (IFN- γ) y en los linfocitos T su citotoxicidad.^(30,43)

IL-10: Además de las MDSC, los macrófagos asociados a tumor (TAMs) y linfocitos infiltrantes de tumor (TILs), son capaces de producir IL-10 provocando los efectos antes ya mencionados.^(30,43)

VEGF: Ha sido asociado con el reclutamiento de MDSC y macrófagos al sitio del tumor, y a la inhibición de la maduración de células mieloides, incluyendo DCs limitando sus funciones.^(34,43)

CCL2 o proteína 1 atrayente de monocitos (MCP-1): CCL2 es una quimiocina producida por muchos tumores que inhiben directamente las funciones de los linfocitos T CD8⁺. Estudios han demostrado una correlación directa e indirecta de la producción de CCL2 en la migración de TAMs de tipo M1 o M2 y de células Treg. Los efectos inmunosupresores de las células Treg ya se han mencionado anteriormente, mientras los TAMs sintetizan citocinas inmunosupresoras como IL-10. CCL2 es considerada una quimiocina protumorigénica e inmunoreguladora.⁽⁴³⁾

- **Otras moléculas inmunosupresoras. Adenosina** es una purina presente en altas concentraciones dentro del tumor. Es sintetizado por el catabolismo

de nucleótidos de adenina por las células tumorales y células Treg. Los receptores de adenosina están expresados en múltiples células del sistema inmunitario de tipo efector, cuando se une la adenosina a su receptor inhibe la respuesta inmunitaria efectora, permitiendo el crecimiento tumoral.⁽⁴³⁾

Prostaglandina E2 (PGE2): Es bien conocida por su capacidad protumorigénica, promueve angiogénesis y metástasis. Es producida por la degradación de ácido araquidónico por la enzima ciclooxigenasa 2 (COX2) que esta sobreexpresada en diferentes tipos de tumores. Los efectos inmunosupresores del PGE2 incluyen: inhibición de la maduración de DCs, inhibe la función y proliferación de los linfocitos T, disminuye la síntesis de quimiocinas pro-inflamatorias y citocinas de tipo 1.⁽⁴³⁾

- **Contra ataque tumoral:** FasL es un miembro de la superfamilia del TNF y activa la apoptosis cuando se une a su receptor Fas. Una gran variedad de tumores expresan FasL en su superficie, los linfocitos T CD8⁺ efectores expresan en su superficie la molécula Fas, siendo sensibles a la apoptosis mediada por Fas. Por lo tanto, la expresión de FasL en tumores humanos se asocia con apoptosis y disminución de CTLs.^(34,26)
- **Formación de sitios inmunoprivilegiados.** Algunos tumores evaden al sistema inmunitario creando sus propios sitios con privilegio inmunitario. Crecen en nódulos rodeados por barreras físicas como colágeno y fibrina, que forman una barrera física alrededor del tumor, impidiendo el acceso de los linfocitos, APCs, etc.⁽³⁰⁾

ANTECEDENTES

Antígenos tumorales

Durante la oncogénesis, las células tumorales adquieren gradualmente mutaciones y alteraciones epigenéticas que resultan en: 1) incremento en la expresión de proteínas propias o 2) expresión de antígenos que presentan nuevos epitopes generados por algunas mutaciones o por deficiencias en el splicing de la maduración del RNA mensajero. Estos antígenos son denominados colectivamente antígenos tumorales.⁽³⁵⁾

Clasificación de los antígenos tumorales

El sistema inmunitario puede reconocer e inducir una respuesta contra las células tumorales empleando dos maneras: reaccionando contra **antígenos específicos de tumor** (moléculas que se expresan únicamente en las células tumorales) o contra **antígenos asociados a tumor** (moléculas que se sobreexpresan en células tumorales y se expresan en células normales).⁽¹⁰⁾

Los **antígenos asociados a tumor** son clasificados dentro de 5 categorías:

1) Antígenos testiculares del cáncer (línea germinal): Son antígenos codificados por genes que se mantienen silenciados en muchos tejidos. Sólo las células en las que se ha detectado expresión significativa de estos antígenos son los trofoblastos placentarios y en las líneas germinales (ovarios y testículos), ya que estos tejidos no expresan moléculas HLA de clase I, por lo que no pueden presentar los antígenos a los linfocitos T. Durante la transformación maligna, los genes son activados y expresados en varios tipos de cánceres, tal es el caso del cáncer de pulmón.^(51,25)

2) Antígenos de diferenciación de melanocitos: En melanoma maligno, se han identificado algunos antígenos asociados a tumor como proteína Melan-A (MART-1), gp100, tirosinasa, y proteína 1 relacionada con la tirosinasa (TRP-1). En tumores pulmonares no se han identificado hasta el momento antígenos de diferenciación.^(51,25)

3) Sobreexpresión de antígenos: Los tejidos normales expresan bajos niveles de antígenos como WT-1, survivina, telomerasa, Tara, SGT1, AL138255 y Her2-neu, pero los CTLs no montan una respuesta inmunitaria en contra de estos antígenos. Durante la transformación maligna estos antígenos son sobreexpresados en los tumores de pulmonares.^(51,25)

4) Antígenos específicos de tumor: Son antígenos únicos que se generan por mutaciones puntuales al azar en los genes encargado de las diversas funciones celulares. Algunos antígenos mutados reportados en cáncer de pulmón son p53, el gen del factor de elongación 2, actinina-4, enzima málico, y NF-YC.^(51,25)

5) Antígenos codificados por virus oncogénicos: Los virus mejor caracterizados son: el virus de papiloma humano 16 (HVP16) que induce carcinoma cervical; el virus Epstein-Bar que se asocia a linfoma de células B, cáncer gástrico o nasofaringe. Sin embargo no hay evidencia entre la incidencia del cáncer de pulmón y cualquier virus oncogénico.⁽⁵¹⁾

Antígenos tumorales identificados en cáncer de pulmón

Se pensaba que el cáncer de pulmón era un cáncer no inmunogénico. Sin embargo, recientes estudios han revelado la presencia de una respuesta inmunológica en contra de los tumores pulmonares como se muestra en la Tabla 5.⁽⁵¹⁾ Los antígenos testiculares del cáncer fueron considerados inicialmente tumor específicos y propuestos como un blanco prometedor para vacunas contra el cáncer. Actualmente se conoce que estos antígenos se expresan en una gran cantidad de neoplasias, además de ser expresados en una proporción variable en los tumores pulmonares, como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 5. Antígenos tumorales identificados usando líneas celulares de cáncer de pulmón

Antígenos	Función	Año reportado
Factor 2 de elongación	Biosíntesis de proteínas	1998
Enzima málica	Enzima convertidora de malato	2001
Actinina 4	Adhesión celular, motilidad	2001
p53 mutado	Supresión de la proliferación celular	2004
AL13825521	Desconocido	2005
SGT1	Regulación del ciclo celular	2005
NF-CY mutado	Promotor del ciclo celular	2006
KK-LC-124	Desconocido	2006
Tara	Organización de actina en el citoesqueleto	2007

Tabla modificada de (51)

Tabla 6. Antígenos testiculares que se expresan en cáncer de pulmón

Antígeno	Locus	Tasa de frecuencia en cáncer pulmonar (%)
MAGE-A1	Xq28	46
MAGE-A3	Xq28	45
MAGE-B2	Xp21	25
MAGE-C1	Xq26	18
BAGE	Cromosoma 13	17
GAGE	Xp11	41
SSX-2	Xq11	10
NY-ESO-1	Xq28	27
KK-LC-1	Xq22	34

Tabla modificada de (51)

Antígeno asociado a melanoma 3A (MAGE-3A)

El antígeno MAGE es codificado por 23 diferentes genes humanos. Estos genes se han dividido en cuatro subfamilias A-D, de acuerdo a sus secuencias homólogas y localización cromosomal. La subfamilia MAGE-A consiste de 12 genes que están localizados en el cromosoma Xq28 y la mayoría de estos genes contienen de 3 a 4 exones.^(13,37) En condiciones fisiológicas la expresión de MAGE-A está restringida principalmente a los testículos y se ha observado que se expresan en una amplia variedad de tumores como tumores mamarios, sarcomas, carcinoma de colon y cáncer de pulmón.⁽²³⁾ En estudios en líneas celulares de cáncer, la localización de las proteínas MAGE es variada. Por ejemplo, MAGE-1A y 3A se encuentran distribuidas en el citoplasma.⁽¹³⁾

Las células neoplásicas que expresan antígenos MAGE asocian péptidos derivados de este antígeno a las moléculas del MHC de clase I que pueden ser reconocido por los CTLs.⁽¹³⁾

En los tejidos se desconocen las funciones y las modificaciones post-traduccionales de las proteínas MAGE; se sugiere que participan en la maduración y diferenciación de las células germinales durante la espermatogénesis.^(13,23) Se ha sugerido que la actividad promotora de los genes MAGE son regulados por metilaciones. En tumores y células germinales, la expresión constitutiva de los genes MAGE se debe a la desmetilación y no de factores de transcripción.⁽¹³⁾

Proteína del tumor de Wilms (WT-1)

El gen WT-1 se localiza en el cromosoma 11q13, este gen codifica para un factor de transcripción con cuatro dedos de zinc que se une a regiones ricas en GC del DNA.⁽¹⁸⁾ El gen WT-1 es expresado en un número limitado de tejidos durante el desarrollo fetal. En tejidos que derivan del mesodermo como: riñón (mesénquima metanéfrico), gónadas (células Sertoli en testículos y células granulosas en ovarios), bazo y mesotelio. Por esta razón, se ha sugerido que WT-1 sea considerado un gen de diferenciación del mesodermo, con excepción de que

también se expresa en la médula espinal y regiones específicas del cerebro durante su desarrollo, ambos tejidos derivan del ectodermo.^(18,42)

Se ha observado que la proteína WT-1 interactúa con muchas proteínas. Estas proteínas se clasifican de manera general en 3 categorías: 2 categorías involucradas en la regulación de la transcripción y la otra categoría está involucrada en el procesamiento del RNA (Ver Figura 8).⁽⁴²⁾

Las funciones de WT-1 como factor de transcripción son inhibir la expresión de genes requeridos para mantener el estado proliferativo de las células madres y activar genes requeridos para la diferenciación de células epiteliales del riñón y otros tejidos. En humanos, la mutación del gen WT-1 contribuye al desarrollo de tumores, por esta razón WT-1 puede ser clasificado como un gen supresor de tumor donde la pérdida de su función conduce al desarrollo de tumores.⁽¹⁸⁾

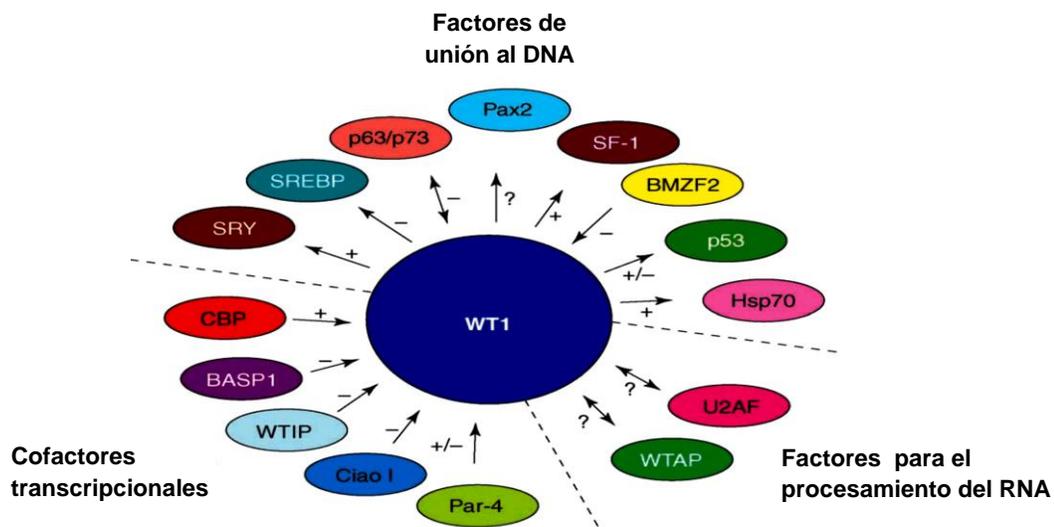


Figura 8: Categorías de las proteínas que interactúan con WT-1. Las flechas indican la dirección de la influencia. Los símbolos +, - y ? indican efectos positivos, negativos y desconocidos, respectivamente. Imagen modificada de (42)

Expresión y función de la molécula CD137 en linfocitos T CD8⁺ antígeno específicos

En humanos, el gen que codifica para la molécula CD137 se encuentra en el cromosoma 1p36. La molécula CD137 (4-1BB) es una glicoproteína transmembranral de tipo I con un dominio rico en cisteínas (seis cisteínas) que

forman tres puentes disulfuro y es miembro de la familia del TNFR.⁽⁷⁾ La moléculas CD137 se expresa en monocitos/macrófagos, células NK, linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD8⁺ activados. CD137 tiene funciones coestimuladoras y antiapoptóticas, en las células T activadas por el antígeno promueve la proliferación y supervivencia, al unirse con su ligando.⁽⁴⁹⁾ CD137 tiene un único ligando denominado CD137-Ligando, perteneciente a la familia del TNF que se expresa en la membrana de las APCs (células dendríticas, células B y macrófagos).⁽⁴⁹⁾

CD137 se une a proteínas adaptadora denominadas factores asociados al receptor TNF (TRAF 1, TRAF2 y TRAF3) que activan otras moléculas señalizadoras (Ver Figura 9). CD137 actúa aumentando la expresión de factores antiapoptóticos, que incluyen a BCL-2, BCL-XL y BFL, y activa la vía AKT para promover el ciclo celular a través de la regulación de ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas, por lo que promueve la proliferación y supervivencia de las células T antígeno específicas.⁽¹¹⁾ Además, CD137 promueve la expansión de los linfocitos T CD8⁺ de memoria en respuesta a una infección secundaria. La coestimulación de las células T CD8⁺ de memoria empleando anticuerpos agonistas contra CD137 induce la proliferación y producción de citocinas en ausencia de estimulación del TCR.⁽¹¹⁾

Se ha reportado que CD137 se expresa, dependiendo del estímulo de las células T, desde las 12 horas hasta 5 días después de la estimulación. Por otra parte, en linfocitos T naïve la molécula CD137 muestra nulos o bajos niveles de expresión, aumenta su expresión en la superficie de las subpoblaciones de linfocitos T antígeno-específicos, después del contacto con su antígeno y presenta un incremento en su expresión en células T después de que son estimuladas con su antígeno (máxima expresión a las 24h), por lo que la molécula CD137 ha sido empleada para identificar y aislar linfocitos T antígeno-específicos.^(49,47)

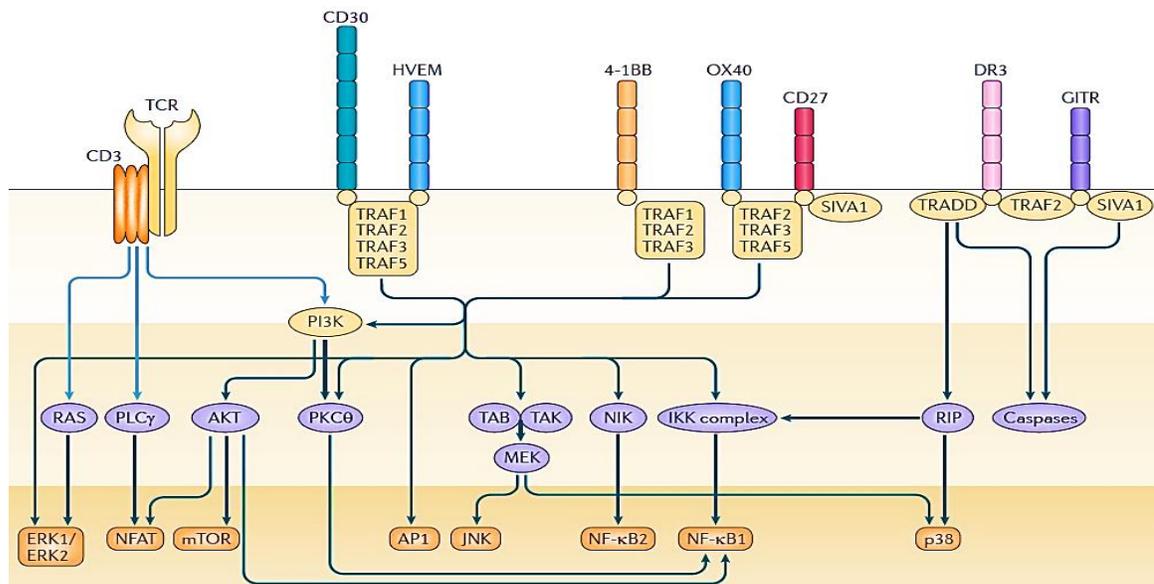


Figura 9: Vías de señalización de los receptores del TNF. Las moléculas TRAFs unidas a la molécula CD137 (4-1BB) activan las siguientes vías de señalización. Cuando 4-1BB (CD137) se une a su ligando, TRAF2 activa a JNK, a NF-κB y promueve la expresión de factores antiapoptóticos. Las moléculas adaptadoras TRAF1 y TRAF3 también participan en la coestimulación de los linfocitos T y promueven la expresión de factores antiapoptóticos. Imagen tomada de (11)

Agotamiento en linfocitos T CD8⁺ y su relación en cáncer

La estimulación crónica con el antígeno puede inducir en los linfocitos T un estado de no respuesta llamado agotamiento, como resultado de la exposición constante a su antígeno. Se ha demostrado que los linfocitos T presentan un agotamiento en modelos animales y en humanos con infecciones crónicas causadas por virus, bacterias y parásitos, así como en cáncer.^(27,48) Los linfocitos T con agotamiento son incapaces de proteger contra infecciones secundarias, disminuye su alta tasa de proliferación, disminuyen su capacidad de producir citocinas (IL-2, TNF-α) y su capacidad citotóxica.⁽²⁷⁾ En infecciones crónicas, se ha correlacionado el agotamiento en los linfocitos T con una alta carga viral. El agotamiento en los linfocitos T antígeno-específicos conduce a la pérdida parcial o, en algunos casos, total de la capacidad de producir IFN-γ, quimiocinas o la capacidad de degranularse.⁽⁴⁸⁾

El agotamiento en los linfocitos T se asocia con la expresión de algunos receptores inhibitorios extracelulares, miembros de la familia CD28, y factores de transcripción que se mencionan a continuación en la Figura 10.

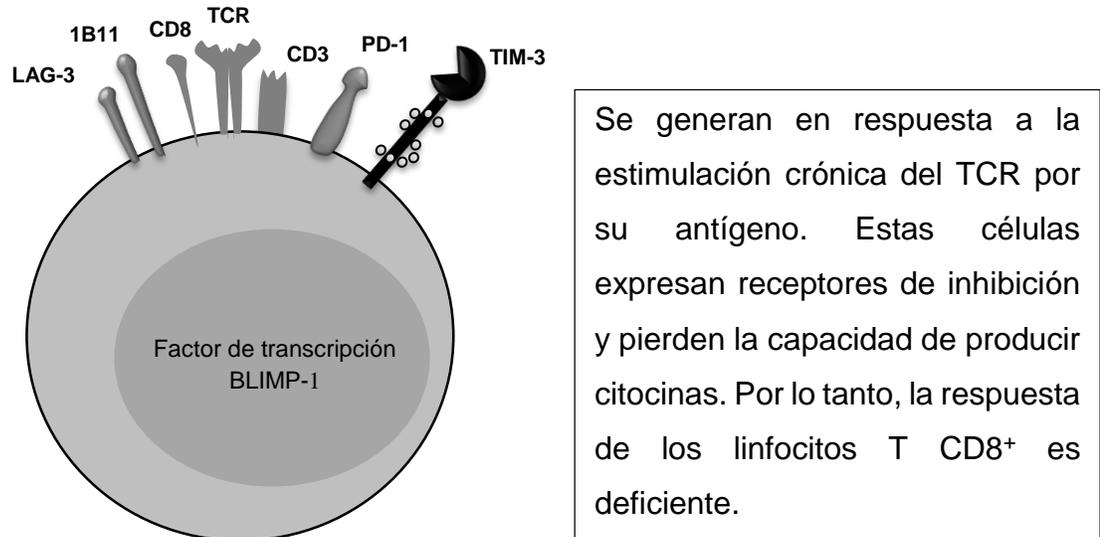


Figura 10. Marcadores característicos y descripción de los linfocitos T CD8⁺ con fenotipo de agotamiento. Imagen modificada de (9)

El patrón de co-expresión de los distintos receptores inhibitorios y el número de ellos expresados simultáneamente por los linfocitos T CD8⁺ pueden incrementar substancialmente la severidad de su funcionalidad, como se ha reportado con los receptores inhibitorios CTLA-4 y PD-1 que suprimen la proliferación y funciones de los linfocitos T estimulados crónicamente.⁽²⁷⁾ Además, la disfunción de los linfocitos T específicos de tumor se ha reportado la co-expresión de PD-1 y LAG-3 o PD-1 y TIM-3. En contraste, se recobra la función de los linfocitos T al bloquear simultáneamente la vía de PD-1 y LAG-3, la vía de PD-1 y CTLA-4, o la vía de PD-1 y TIM-3.⁽⁴⁸⁾

Se ha sugerido que un metabolismo deficiente de glucosa contribuye al agotamiento en los linfocitos T.⁽²⁷⁾ Las citocinas también juegan un papel importante al regular el metabolismo de glucosa mediante el transportador GLUT1 y las enzimas que participan en la glucólisis. Por ejemplo, la IL-2 promueve la expresión de GLUT-1 y el transporte de glucosa de los linfocitos T activados. Sin embargo, los linfocitos T con un fenotipo de agotamiento tienen reducida la síntesis de IL-2, por lo tanto en

estas células está limitado el metabolismo de glucosa.⁽²⁷⁾ Además, las citocinas inmunoreguladoras favorecen el agotamiento en los linfocitos T. Por ejemplo, la síntesis de IL-10 y TGF- β están aumentadas en algunas infecciones crónicas donde se han observado una disfuncionalidad en los linfocitos T. Por otra parte, la IL-10 está ligada a una disfunción de los linfocitos T, y el bloqueo de la IL-10 mejora el control viral y la respuesta de los linfocitos T, mientras al inhibir las señales del TGF- β mejora la funcionalidad de los linfocitos T CD8⁺ y bloquea el agotamiento más severo de los linfocitos T CD8⁺ antígeno-específicos, así como su eliminación.⁽⁴⁸⁾

Receptor de muerte programada 1 (PD-1) o CD279

La molécula PD-1 se descubrió en 1992 y es miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas (B7/CD28). Esta molécula tiene la capacidad de regular negativamente la activación de los linfocitos y macrófagos por lo que su acción es coinhibitoria. Participa manteniendo la tolerancia central y periférica, ya que la deficiencia o polimorfismos de PD-1 en ratones y humanos se asocia a enfermedades autoinmunes.^(44,20,12)

PD-1 es una proteína compuesta por un dominio extracelular globular, un dominio transmembranal y un dominio intracelular que contiene un ITIM y un ITSM que al fosforilarse, por unión a su ligando (PD-L), una proteínas adaptadoras con dominios SH2 y desfosforila a PI3K^(44,12). PI3K desfosforilada es incapaz de fosforilar a AKT, protein cinasa que promueve la activación, proliferación y supervivencia de los linfocitos T.

AKT activa a NF- κ B, un factor de transcripción que aumenta la expresión de Bcl-2 y c-myc, e induce la producción de IL-2. También AKT, inactiva directamente a proteínas pro-apoptóticas como Bad y a factores de transcripción que transcriben para proteínas pro-apoptóticas. Ya que PD-1 no permite la activación de AKT, los eventos descritos no se llevan a cabo.^(44,20,12) Además, las señales coinhibitorias de PD-1 anulan la señalización del TCR bloqueando la fosforilación de CD3 ζ , ZAP70 y PKC θ . En general, PD-1 induce un estado anti-proliferativo y pro-apoptótico en los linfocitos T.⁽¹²⁾

Se han descrito dos ligandos de PD-1: PD-L1 (B7-H1 o CD274) y PD-L2 (B7-DC o CD273), ambos ligandos son glicoproteínas transmembranales de tipo 1 con dominios extracelulares tipo IgC e IgV.^(44,20,12)

Los linfocitos T naïve expresan bajos niveles de PD-1; la activación de los linfocitos T, linfocitos B, monocitos y DCs induce la expresión de PD-1, limitando la duración y extensión de la respuesta inmunológica. PD-1 al interactuar con sus ligandos envía señales intracelulares que se traducen en la disminución de: i) la producción de citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-2, ii) la proliferación celular y funcionalidad citotóxica de los linfocitos T, iii) induce tolerancia y iv) muerte celular inducida por activación (AICD).

PD-L1 se expresa en linfocitos T, linfocitos B, monocitos, DC plasmacitoides y mieloides, células epiteliales y células endoteliales; sin embargo, la expresión constitutiva de PD-L1 sólo se ha reportado en macrófagos y DCs; así como en tejidos periféricos para mantener la tolerancia periférica. La expresión de PD-L2 está restringida a macrófagos activados por citocinas y DCs.⁽¹²⁾ Se ha demostrado que hay una elevada expresión de PD-L1 en células tumorales y una alta expresión de PD-1 en TIL, lo que se correlaciona con un mal pronóstico en pacientes con cáncer y la progresión del tumor. El bloqueo de PD-1 y su ligando PD-L1 aumenta, al menos in vitro, la respuesta de los linfocitos T antitumorales.^(44,20,12,28)

Ensayo clínicos sugieren que el bloqueo de la vía de PD-1/PD-L1 puede ser una estrategia terapéutica para el control, mediante el sistema inmunológico, de los tumores en humanos.^(48,28)

Proteína 3 que contiene el dominio de mucina y el dominio de inmunoglobulina de las células T (TIM-3)

TIM-3 se expresa principalmente en linfocitos Th1, pero no en Th2.⁽²²⁾ Además, se expresa en linfocitos T CD8⁺, DCs, macrófagos, células NK y en bajos niveles en células Th17. Su ligando es galectina-9, la cual se expresa predominantemente en linfocitos Treg, aunque podemos encontrarla expresada en linfocitos B, mastocitos, células endoteliales y fibroblastos.⁽²⁸⁾

El bloqueo de TIM-3 en linfocitos T CD4⁺ naïve incrementa su proliferación y producción de IFN- γ ; por otra parte, el IFN- γ aumenta la expresión de TIM-3 y galectina-9 formando un sistema de retroalimentación.^(28,19) Tras la unión de galectina-9, el dominio intracelular de TIM-3 es fosforilado por ITK (cinasa de células T inducible por interleucina), promoviendo la entrada de calcio a la célula y su muerte por apoptosis.⁽²⁸⁾

El incremento en la expresión de TIM-3 en los linfocitos T CD8⁺ se ha asociado con un fenotipo de agotamiento, por lo tanto en una disfunción en los linfocitos T CD8⁺. En este contexto, la disminución de la proliferación, citotoxicidad y producción de interleucinas como IL-2, TNF- α e IFN- γ , específicamente cuando se coexpresan TIM-3 y PD-1, conducen a una reducción en la inmunidad antitumorales.^(28,22,14,38)

TIM-3 ha sido detectado dentro del microambiente tumoral en células tumorales, DCs, TIL CD4⁺ y CD8⁺. En humanos, la expresión de TIM-3 en células tumorales se ha correlacionado con un mal pronóstico y con la progresión del cáncer. El bloqueo mediante anticuerpos contra TIM-3, en combinación con otras moléculas inhibitorias como PD-1 y BTLA, revierte el agotamiento en los linfocitos T CD8⁺ tumor específicos y restaura la inmunidad antitumoral en ensayo preclínicos, en modelos de cáncer in vivo y ex vivo.^(28,22,14,38)

Cooperación de TIM-3 y PD-1 en el agotamiento de los linfocitos T CD8⁺

El agotamiento de los linfocitos T CD8⁺ fue inicialmente caracterizado en infecciones virales crónicas en ratones infectados con el virus de coriomeningitis linfocítica (LCMV) y en humanos infectados con HIV, virus de la hepatitis B o virus de la hepatitis C (HCV).^(22,38)

Durante una infección viral aguda con LCMV en el tejido pulmonar de ratones, un pequeño porcentaje de la población de linfocitos T CD8⁺ virus-específicos (1.2%) coexpresan TIM-3 y PD-1. En contraste, la infección viral crónica con LCMV en el tejido pulmonar de ratones, resulta en una alta frecuencia de linfocitos T CD8⁺TIM-3⁺PD-1⁺ (77.8%), que persisten incluso después de 90 días de la infección. También se sugiere que los linfocitos T CD8⁺TIM-3⁺PD-1⁺ virus-específicos, representan a

una subpoblación con el fenotipo más severo de agotamiento al tener una nula o baja capacidad proliferativa y baja secreción de citocinas, con respecto a las subpoblaciones de linfocitos T CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁻, linfocitos T CD8⁺PD-1⁻TIM-3⁺ y linfocitos T CD8⁺PD-1⁻TIM-3⁻. Además, los linfocitos T CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁺ tienen un papel inmunosupresor, observándose que esta subpoblación secreta IL-10 al estimularlas con péptidos de LCMV. Dicho fenómeno también se ha observado en linfocitos T CD8⁺ específico para el HIV.⁽²²⁾

En cáncer, *Fourcade et al* han demostrado que los linfocitos T CD8⁺ específicos para NY-ESO presentan una alta expresión de TIM-3 (28.8%). Una gran proporción de estos linfocitos T CD8⁺TIM-3⁺ específicos para NY-ESO coexpresan PD-1 (24.8%), estas subpoblaciones parecen estar asociadas con el agotamiento de los linfocitos T NY-ESO-específicos en sangre periférica de pacientes con melanoma avanzado.⁽¹⁴⁾ *Sakuishi et al* también observó agotamiento en TILs, asociándolo con la expresión de PD-1 y/o TIM-3 en ratones con cáncer de colon, mama y melanoma.⁽³⁸⁾

Estudios recientes han atribuido un papel crucial de los receptores inhibitorios en el agotamiento en los linfocitos T CD8⁺ durante infecciones virales crónicas y cáncer. Por lo tanto, la importancia de entender la participación de estos receptores inhibitorios (TIM-3 y PD-1) puede revelar un blanco terapéutico potencial que conduzca a la restauración de las funciones de los linfocitos T CD8⁺.^(22,38)

Detección de linfocitos T CD8⁺ en adenocarcinoma pulmonar

En estadios avanzados del adenocarcinoma pulmonar, es frecuente que presenten derrame pleural. En el derrame pleural se encuentran un gran número de células mononucleares (CMNLP) y células tumorales, siendo una muestra ideal para el estudio de la respuesta inmune antitumoral.⁽³⁵⁾ Estudios han mostrado que las CMNLP presentan defectos funcionales, tal es el caso de los linfocitos T CD8⁺.⁽³²⁾

En los pacientes con adenocarcinoma pulmonar se ha documentado que la subpoblación de memoria (CD45RA⁻CD27⁺) de linfocitos T CD8⁺ está aumentada y la de linfocitos T CD8⁺ efectores (CD45RA⁺CD27⁻) está disminuida en el derrame pleural con respecto a la sangre periférica. Esto podría depender de: 1) bloqueo en

el proceso de diferenciación terminal de los linfocitos T CD8⁺, 2) expresión temprana de Fas en la subpoblación T CD8⁺ naïve que puede conducir a un incremento en la susceptibilidad a la apoptosis, cuando los linfocitos T naïve llegan a su estadio terminal de diferenciación, o 3) por ambos procesos. Además, los linfocitos T CD8⁺ en el derrame pleural tienen reducida la expresión de perforinas al comparar con linfocitos T CD8⁺ de sangre periférica.^(32,35)

Estos resultados sugieren que los linfocitos T CD8⁺ en contacto o próximos al tumor, son afectados por los factores producidos en el microambiente tumoral, comparados con aquellos linfocitos T CD8⁺ en sitios distantes al tumor.

Hasta el momento no hay estudios que identifiquen linfocitos T CD8⁺ específicos para MAGE-3A o WT-1 en los derrames pleurales de pacientes con adenocarcinoma pulmonar, sólo se sabe que estos antígenos son expresados en los tumores pulmonares.

HIPÓTESIS

Si los linfocitos T CD8⁺ presentes en el derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar reconocen a los péptidos tumorales MAGE-3A o WT-1, entonces se activarán y expresarán la molécula CD137

OBJETIVO

GENERAL

Determinar si los linfocitos T CD8⁺, provenientes del derrame pleural y sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma pulmonar se activan al estimularlos con los antígenos tumorales MAGE-3A y WT-1, así como determinar el fenotipo de los linfocitos T CD8⁺ activados por estos antígenos tumorales

PARTICULARES

Determinar el porcentaje de linfocitos T CD8⁺CD137⁺ posterior al tratamiento con los péptidos tumorales MAGE-3A o WT-1, en muestras de derrame pleural y sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma pulmonar

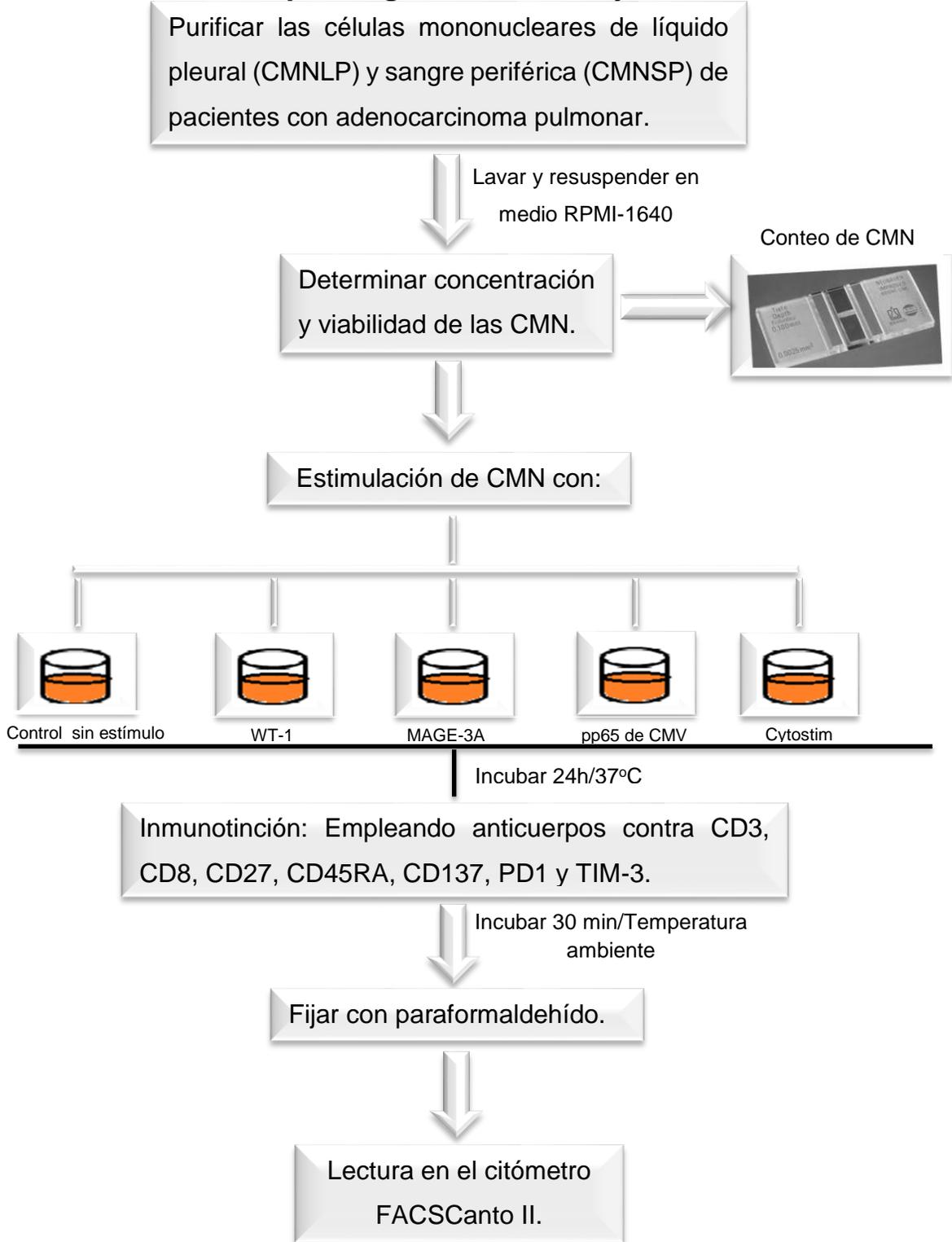
Determinar la subpoblación de linfocitos T CD8⁺ naive, memoria o efectora que expresan CD137, post tratamiento con los péptidos tumorales MAGE-3A o WT-1

Determinar el porcentaje de linfocitos T CD8⁺PD1⁺ en muestras de derrame pleural y sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma, posterior a los estímulos con los péptidos tumorales MAGE-3A o WT-1

Determinar la subpoblación de linfocitos T CD8⁺PD-1⁺TIM3⁺ que expresan la molécula de activación CD137 al estimularlos con los péptidos tumorales MAGE-3A o WT-1

MATERIALES Y MÉTODOS

Esquema general de trabajo



Población estudiada

Se incluyeron 20 pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar en estadios IIIb y IV, sin tratamiento antitumoral previo. El promedio de edad fue de 65 años (intervalo: 39-84 años). De los pacientes se obtuvieron 20 muestras del líquido pleural y 6 muestras de sangre periférica previo consentimiento y aceptación de participación por medio de la carta de consentimiento informado. El Comité de Ciencia y Bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” aprobó el protocolo para la obtención de las muestras biológicas con el número de registro B28-09

Separación de las células mononucleares

Las células mononucleares (CMN) provenientes de sangre periférica se purificaron mediante un gradiente de Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Axis-Shield, Oslo, Noruega), por medio de centrifugación a 1500 rpm por 30 min. El líquido pleural se obtuvo por toracocentesis por personal médico adscrito al hospital, el derrame se centrifugó a 2000 rpm por 15 minutos. El paquete celular resultante fue resuspendido en medio RPMI-1640. Las CMN del líquido pleural y las células tumorales (CT) fueron separadas por centrifugación a 1500 rpm por 30 min en un gradiente discontinuo de Ficoll-Hypaque, como ha sido previamente reportado.⁽³²⁾ Las células tumorales y las CMN del líquido pleural fueron recolectadas de cada interfase y lavadas dos veces con medio RPMI-1640.

Inmunotinción

Se emplearon las siguientes combinaciones de anticuerpos:

Anticuerpos	Marca fluorescente	Clona	Casa comercial
Anti-CD3	PE CF594	<i>UCTH1</i>	<i>BD Bioscience, USA</i>
Anti-CD3	PE Texas Red	<i>UCTH1</i>	<i>Invitrogen, USA</i>
Anti-CD8	APC/Cy7	<i>SK1</i>	<i>BioLegend, USA</i>
Anti-CD45RA	PE/Cy7	<i>HI100</i>	<i>BioLegend, USA</i>
Anti-CD27	PerCP/Cy5.5	<i>O323</i>	<i>BioLegend, USA</i>
Anti-CD137	PE o APC	<i>4B4-1</i>	<i>BioLegend, USA</i>
Anti-PD-1	FITC	<i>M1H4</i>	<i>eBioscience, USA</i>
Anti-TIM-3	APC	<i>F38-2E2</i>	<i>eBioscience, USA</i>
Controles de isotipo			
IgG1K	PE	<i>MOPC-21</i>	<i>BioLegend, USA</i>
IgG1K	APC	<i>P3.6.2.8.1</i>	<i>eBioscience, USA</i>
IgG1K	FITC	<i>P3.6.2.8.1</i>	<i>eBioscience, USA</i>

PE: Ficoeritrina, FITC: Isotiocianato de fluoresceína, APC: Alofocianina, PE/Cy7: Fluorocromo en tándem de PE y cianina, APC/Cy7: Fluorocromo en tándem de APC y cianina

Péptidos de CMV, MAGE-3A y WT-1 humanos

Los péptidos MAGE-3A, WT-1 y CMV se reconstituyeron con agua inyectable quedando a una concentración de 30 nmol/mL. Se guardaron alícuotas de trabajo en un ultracongelador a -70 °C para su uso posterior.

Estimulación de CMNLP y CMNSP

Las CMNLP y CMNSP se contaron en la cámara de Neubauer, distinguiendo las células muertas de las células vivas con un colorante supravital (azul de tripano),

para obtener la concentración de células y el porcentaje de viabilidad de la muestra de CMN.

Las CMN se estimularon con Cytostim (MACS Miltenyi Biotec), péptidos MAGE-3A, WT-1 o CMV en placas de 96 pozos. Se emplearon CMN sin estímulo como control negativo y se incluyeron CMNLP tratadas con Cytostim para emplearse como control de isotipo de la inmunotinción. Al estimularse con los péptidos los linfocitos T CD8⁺ antígeno-específicos, en caso de estar presentes, expresarán la molécula CD137. Como control positivo de activación de linfocitos T se empleó Cytostim, el cual actúa como superantígeno al interaccionar con la región V β del TCR de los linfocitos T y las moléculas principales de histocompatibilidad (MHC) de las APCs, específicamente MHC de clase I, induciendo la activación y la expresión de la molécula de activación CD137 en la superficie de los linfocitos T CD8⁺.

Cada estímulo se realizó en pozos diferentes, la concentración de CMNLP o CMNSP se ajustó a una concentración de 1×10^7 células/mL en un volumen final de 150 μ L con medio RPMI-1640. La cantidad de péptidos y Cytostim que se empleó para el estímulo de las CMNs se obtuvo de la relación de 20 μ L de péptidos o Cytostim por mL de suspensión de CMN proveniente de sangre periférica o líquido pleural. Las CMNs con los diferentes estímulos fueron incubados durante 24h en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C.

Inmunotinción de CMNLP y CMNSP post estimulación

Después de las 24h de estimulación, las CMNSP y CMNLP se recolectaron mediante agitación mecánica suave, se lavaron los pozos con un amortiguador salino de fosfatos (PBS 1X)/albúmina sérica bovina al 1% (BSA)/Azida de sodio al 0.1% (NaN₃) y colocando las CMN sometidas a cada condición en tubos Eppendorf de 1.5 mL.

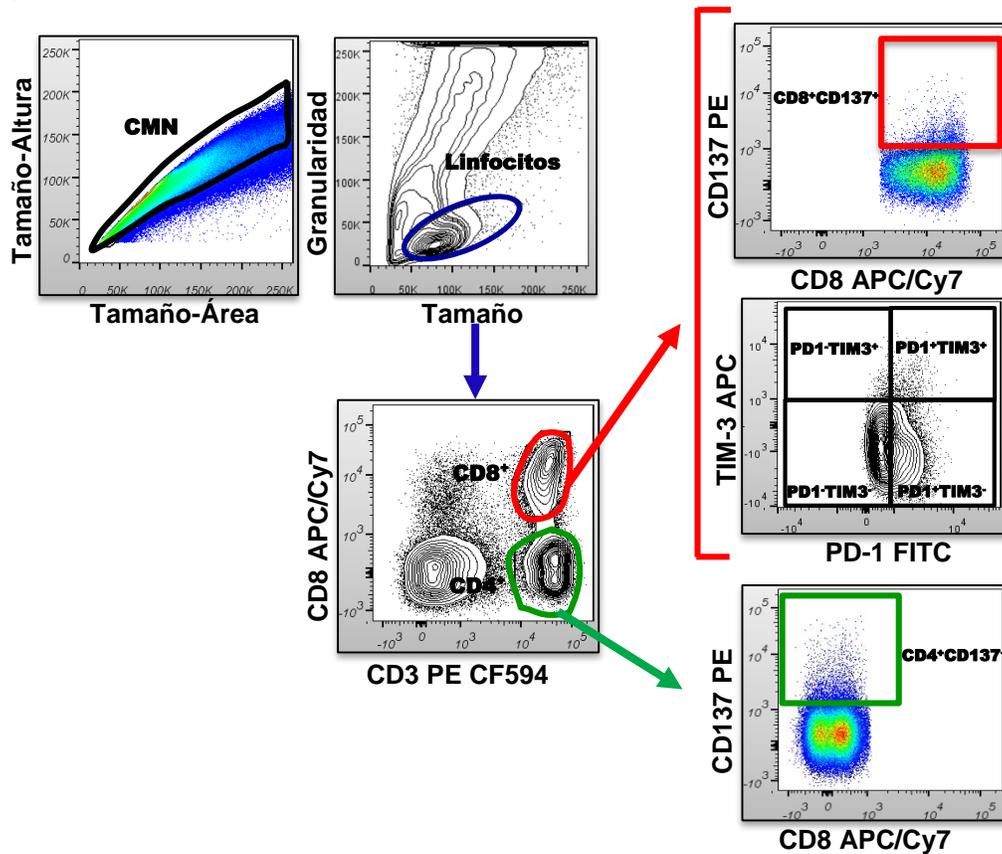
Se preparó una mezcla de anticuerpos (Acs) acoplados a diferentes fluorocromos para identificar las moléculas: CD3, CD8, CD27, CD45RA, CD137, PD-1 y TIM-3 en un volumen final de 20 μ L por pozo empleando la técnica de microescala o de volúmenes mínimos de Acs.⁽⁴⁰⁾ Se incubó por 30 min a temperatura ambiente protegiendo de la exposición de la luz. Transcurrido este tiempo se lavó con

PBS/BSA 1%/NaN₃ 0.1% para quitar el exceso de Acs y las CMN se fijaron con paraformaldehído (1% p/v) para ser adquiridas en el citómetro FACSCanto II (Becton Dickinson) con el programa FACSDiva. Los datos se analizaron con el software FlowJo versión 10.0.6.

Análisis citométrico de los linfocitos T CD8⁺ y sus subpoblaciones naïve, memoria y efectora

Mediante el gráfico de tamaño-área vs. tamaño-altura se discriminaron los agregados y de la región resultante se realizó otro gráfico con los parámetros tamaño vs. granularidad. Se obtuvo la región de los linfocitos y de ésta se seleccionó la población CD3⁺CD8⁺ y la población CD3⁺CD8⁻, correspondiente a los linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ respectivamente, para evaluar la expresión de la molécula de activación CD137. A partir de los linfocitos T CD8⁺CD137⁺, se graficó CD27 vs. CD45RA para distinguir las subpoblaciones naïve (CD27⁺CD45RA⁺), memoria (CD27⁺CD45RA⁻) y efectora (CD27⁻CD45RA⁺). A la población de linfocitos T CD8⁺ totales (CD3⁺CD8⁺) y antígeno específica (CD3⁺CD8⁺CD137⁺) se determinó el porcentaje de células T CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁺ y CD8⁺CD137⁺PD-1⁺TIM-3⁺ con el fin de identificar si presentan un fenotipo de agotamiento (Ver Figura 11).

A) Análisis citométrico



B) Fenotipificación de células T CD8⁺CD137⁺

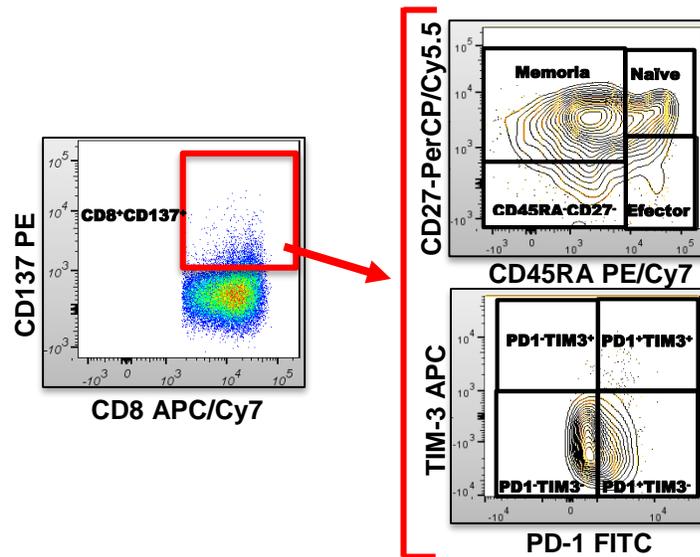


Figura 11. Activación y fenotipificación de linfocitos T CD8⁺ al estímulo con pp65CMV: Análisis citométrico de CMNLP de un paciente con adenocarcinoma pulmonar. Las CMNLP fueron estimuladas con pp65CMV.

RESULTADOS

Los péptidos pp65CMV, MAGE-3A o WT-1 aumentan el porcentaje de linfocitos T CD8⁺CD137⁺ y T CD8⁻CD137⁺

Se sabe que la subpoblación de los linfocitos T CD8⁺ presentes en el derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar está disminuida y presenta alteraciones en sus funciones citotóxicas.⁽³²⁾ Ya que se desconoce si esta población de linfocitos T CD8⁺ es o no tumor específica, se estimularon las CMNLP de 20 pacientes con adenocarcinoma pulmonar con los péptidos tumorales MAGE-3A y WT-1, los cuales suelen expresarse en los tumores pulmonares.^(25,51,28) Como controles se emplearon la estimulación con: a) Cytostim, superantígeno que permitió activar y evaluar la expresión de la molécula de activación CD137 en los linfocitos T; b) el péptido pp65CMV, para conocer el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ antígeno específicos, ya que la gran mayoría de la población adulta ha estado en contacto con el virus CMV, ver Figura 12. La activación de los linfocitos T se determinó mediante el porcentaje de células T CD137⁺. Los resultados de activación de los linfocitos T CD3⁺CD8⁻ (células T CD4⁺) y CD3⁺CD8⁺ de todas las muestras de pacientes con adenocarcinoma pulmonar se observan en la Figura 13.

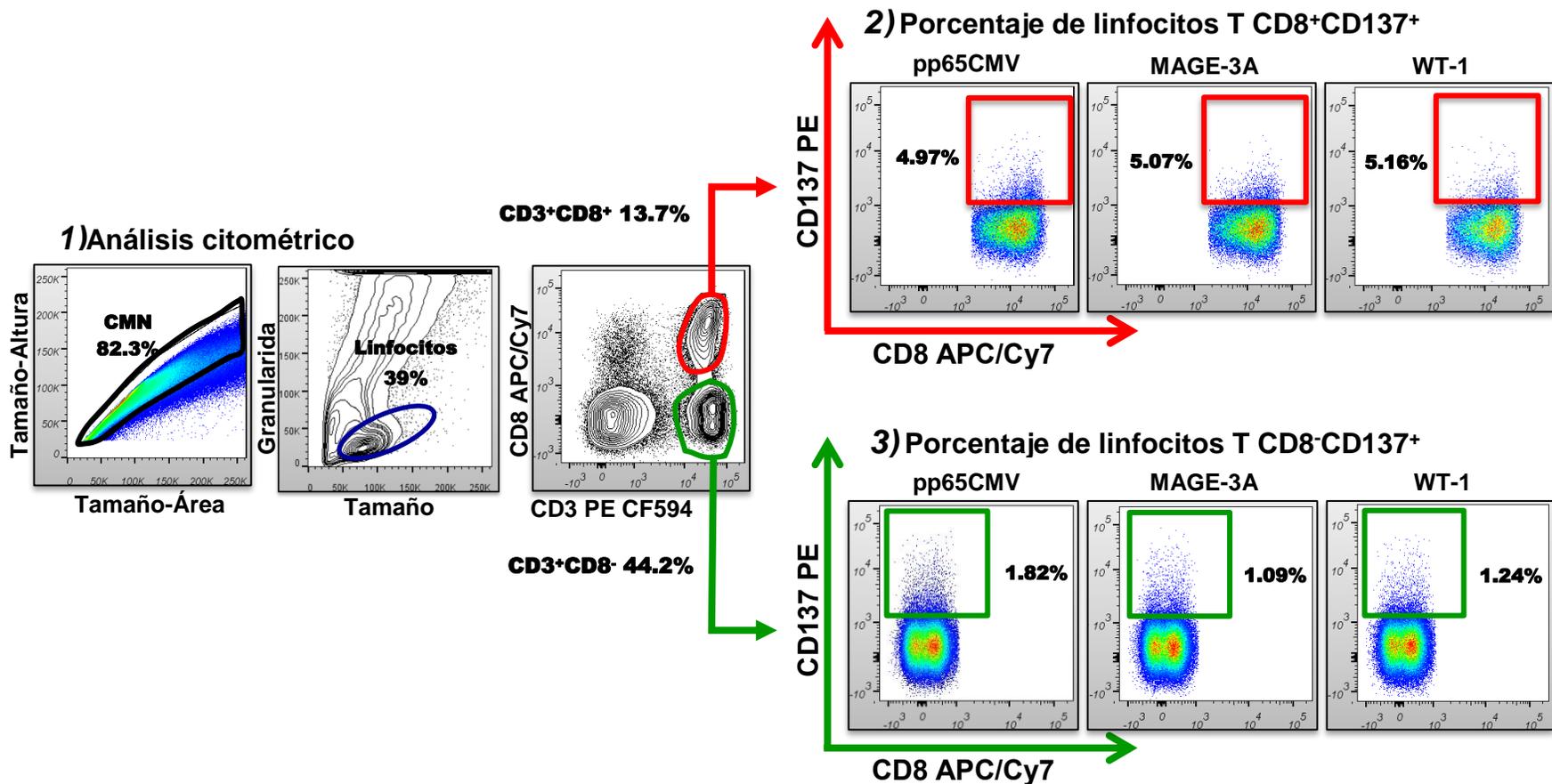


Figura 12: Análisis representativo para determinar el porcentaje de activación de linfocitos T CD8⁺ y linfocitos T CD8⁻ en una muestra de líquido pleural de un paciente con adenocarcinoma pulmonar. **1)** Determinación de la región de los linfocitos T CD8⁺ (CD3⁺CD8⁺ óvalo rojo) y la región de los linfocitos T CD4⁺ (CD3⁺CD8⁻ óvalo verde). **2) y 3)** Porcentaje de linfocitos T CD8⁺CD137⁺ (cuadro rojo) y linfocitos T CD8⁻CD137⁺ (cuadro verde) estimulados con los péptidos pp65CMV, MAGE-3A o WT-1, las regiones de los linfocitos T CD8⁺CD137⁺ y linfocitos T CD8⁻CD137⁺ fueron establecidas de acuerdo al control de isotipo

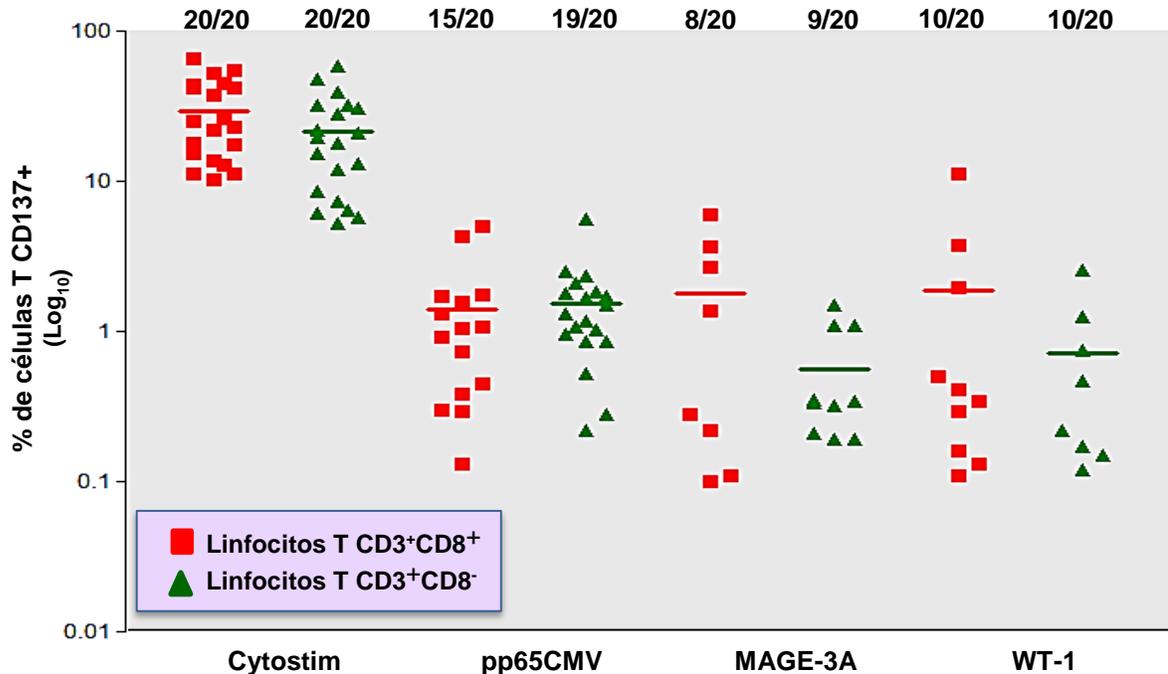


Figura 13. Porcentaje de células CD137⁺ (Log₁₀) provenientes de derrames pleurales de pacientes con adenocarcinoma pulmonar. Cytostim: estímulo policlonal; pp65CMV: control positivo de activación de linfocitos T antígeno-específicos; MAGE-3A y WT-1: Antígenos tumorales. La barra representa la media. En la parte superior de la gráfica se indica el número de pacientes cuyas células respondieron al estímulo

Los porcentajes de las células T CD8⁺CD137⁺ y CD8⁻CD137⁺ se obtuvieron al restar el porcentaje de células T CD8⁺CD137⁺ y CD8⁻CD137⁺ del control sin estímulo y del pegado inespecífico detectado en el control de isotipo.

El Cytostim indujo en el 100% de los pacientes un incremento de las células T CD8⁺CD137⁺ y CD8⁻CD137⁺ (T CD4⁺). Mientras que la estimulación con el pp65CMV indujo que el 50% de los pacientes respondieran al antígeno. El porcentaje de células T CD8⁺CD137⁺ fue de $1.4 \pm 1.4\%$ y de células T CD8⁻CD137⁺ fue de $1.5 \pm 1.2\%$. Para los péptidos tumorales MAGE-3A y WT-1 hubo una tendencia a presentar un mayor porcentaje de células T CD8⁺CD137⁺ con respecto a las células T CD8⁻CD137⁺.

Por otra parte, nosotros encontramos porcentajes de células T CD8⁺CD137⁺ en las condiciones sin estimular en 3/20 muestra. Dos muestras con porcentajes menores de 0.6% de células T CD8⁺CD137⁺ y la tercera muestra con un porcentaje de 27.9% de células T CD8⁺CD137⁺ (datos no mostrados).

Para conocer si la población de células CD137⁺ se incrementa en los linfocitos T CD8⁺ cercanos al tumor y si está ausente a nivel sistémico, se evaluó la expresión de la molécula de activación CD137 en linfocitos T CD8⁺ en la sangre periférica de 6 pacientes con adenocarcinoma pulmonar. Las células se estimularon con los antígenos tumorales MAGE-3A y WT-1. Dada a la poca cantidad de material biológico de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma pulmonar con que se disponía, se evaluó sólo la estimulación con los péptidos tumorales MAGE-3A o WT-1. No se encontraron células T CD8⁺CD137⁺ en 4/6 muestras de sangre periférica, mientras que en 2 muestras se presentaron células T CD8⁺CD137⁺ con un porcentaje menor del 1% en ambos péptidos tumorales. Los pacientes cuyas muestras de sangre periférica que no presentaron células T CD137⁺ tampoco presentaron a esta subpoblación en el derrame pleural (datos no mostrados). Tal vez estos pacientes no presentan los péptidos tumorales MAGE-3A y WT-1 en sus tumores pulmonares, es necesario realizar la determinación de estos antígenos en tejido tumoral.

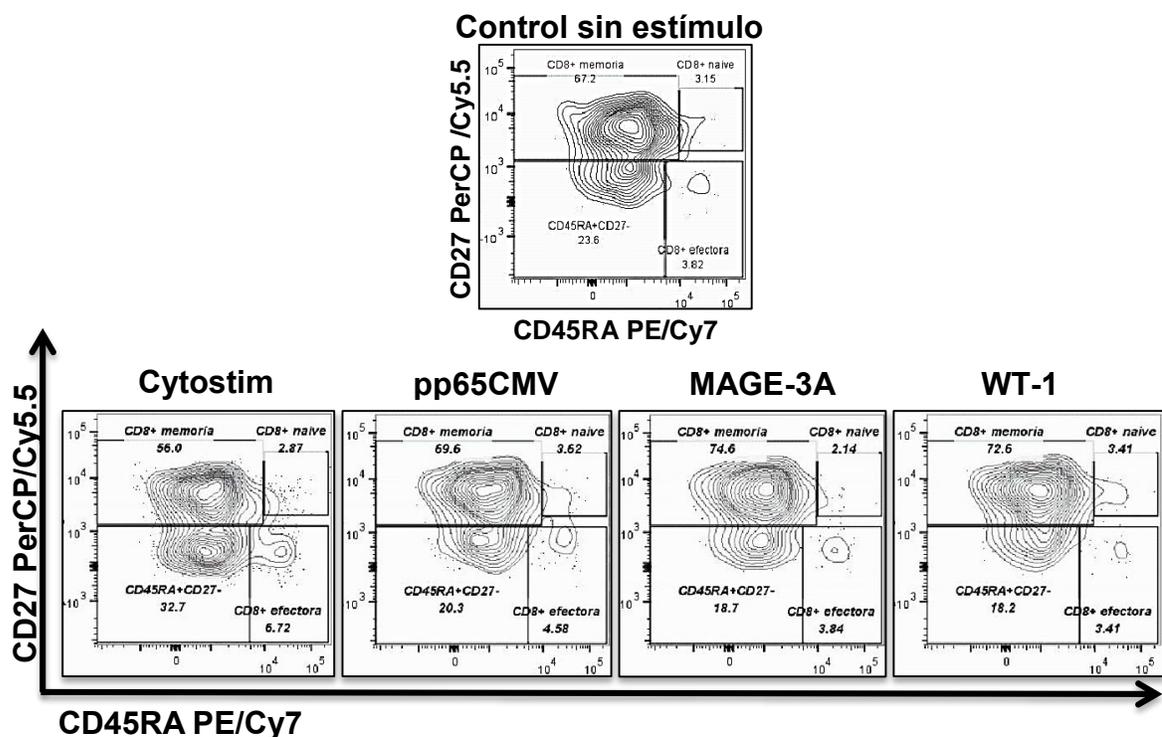
Los linfocitos T CD8⁺CD137⁺ activados por los péptidos pp65CMV, MAGE-3A y WT-1 son principalmente de fenotipo de memoria

El análisis de las subpoblaciones de linfocitos T CD8⁺ naïve, memoria y efectora que reconocieron a los péptidos de CMV, así como a los péptidos tumorales, se realizó en los pacientes que presentaron linfocitos T CD8⁺ antígeno específicos con porcentajes de células T CD8⁺CD137⁺ mayor al 1%. Considerando lo anterior, se analizó el fenotipo de las células T CD8⁺CD137⁺ para MAGE-3A en 4 muestras, para WT-1 en 3 muestras y para pp65CMV en 10 muestras.

Se determinó el porcentaje de las subpoblaciones naïve (CD27⁺CD45RA⁺), memoria (CD27⁺CD45RA⁻), efectora (CD27⁻CD45RA⁺) y la subpoblación doble negativa (CD27⁻CD45RA⁻), a partir de los linfocitos T CD8⁺CD137⁺ se realizó la gráfica de CD27 vs. CD45RA (Ver Figura 14A). El principal fenotipo observado en las células T CD8⁺CD137⁺ proveniente de los tratamientos con los péptidos de MAGE-3A, WT-1 y pp65CMV fue la subpoblación de memoria (CD27⁺CD45RA⁻) con un porcentaje mayor al 65%, mientras que para el Cytostim la subpoblación de

memoria fue mayor al 45%. La subpoblación doble negativa (CD45RA⁻CD27⁻) fue la segunda más abundante, que es una subpoblación intermedia entre linfocitos T CD8⁺ de memoria y efectora, con un porcentaje menor del 15% para los péptidos, mientras para el Cytostim fue la subpoblación naïve con un porcentaje menor del 30%. (Ver Figura 14B). El porcentaje de células T CD8⁺CD137⁺ con fenotipo de memoria tendió a ser mayor posterior al tratamiento con los péptidos tumorales y de pp65CMV con respecto al Cytostim. Sin embargo, los porcentajes de células T CD8⁺CD137⁺ con el fenotipo efector tendieron a ser menores para los tratamientos con los péptidos tumorales MAGE-3A y WT-1 comparado con las células provenientes de los tratamientos con Cytostim o péptidos de CMV.

A) Región de Linfocitos T CD8⁺CD137⁺ post estimulación



B) Fenotipo de los linfocitos T CD8⁺CD137⁺

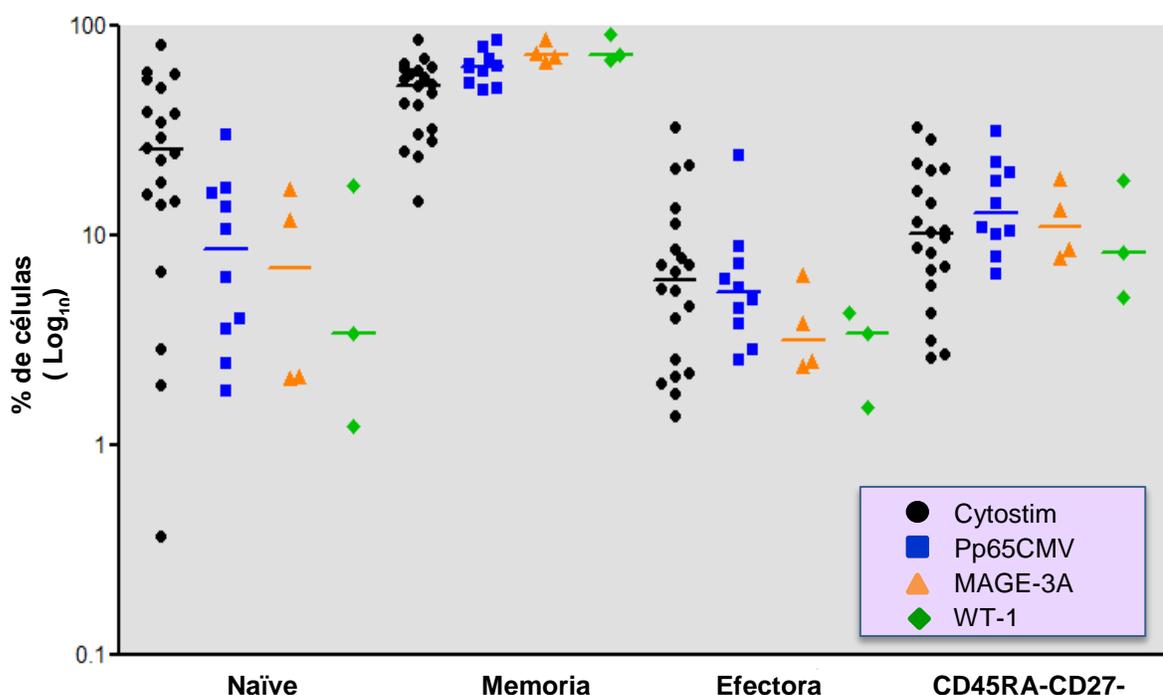


Figura 14. A) Análisis citométrico de las subpoblaciones naïve (CD45RA⁺CD27⁺), memoria (CD45RA⁻CD27⁺), efectora (CD45RA⁺CD27⁻) y doble negativa (CD45RA⁻CD27⁻) de los linfocitos T CD8⁺CD137⁺ estimulados con Cytostim, pp65CMV, MAGE-3A y WT-1 de un paciente con adenocarcinoma pulmonar. **B)** Subpoblaciones naïve, memoria y efectora en linfocitos T CD8⁺CD137⁺ provenientes de líquido pleural en función de los estímulos empleados. La barra representa la mediana

PD-1 se expresó predominantemente en los linfocitos T CD8⁺CD137⁺

Una constitutiva y alta expresión de la molécula coinhibitoria PD-1 es asociada con una disfuncionalidad de los linfocitos T CD8⁺ efectores.^(14, 22, 52) Por esta razón, se determinó el porcentaje de las células PD-1⁺ en la población total y específica de los linfocitos T CD8⁺ de pacientes con adenocarcinoma pulmonar al estimularlos con los péptidos de MAGE-3A, WT-1, pp65CMV y Cytostim. Se encontraron porcentajes por arriba del 20% de linfocitos T CD8⁺PD-1⁺ post-tratamientos. El Cytostim indujo un aumento significativo en el porcentaje de linfocitos T CD8⁺PD-1⁺ con relación al porcentaje de linfocitos T CD8⁺PD-1⁺ de las CMN sin estimular (Ver Figura 16A). Adicionalmente, los linfocitos T CD8⁺CD137⁺ mostraron un porcentaje considerable de células PD-1⁺ en todos los estímulos empleados, sugiriendo que

PD-1 se expresa en los linfocitos T CD8⁺ activados y en ambientes pro-inflamatorios. Por otra parte, se observó un incremento no significativo en el porcentaje de células T CD8⁺CD137⁺PD-1⁺ al estimular con los péptidos tumorales de MAGE-3A o WT-1, al comparar los porcentajes de células T CD8⁺CD137⁺PD-1⁺ estimuladas con Cytostim o péptidos de pp65CMV (Ver Figura 16B).

A) Región de linfocitos T CD8⁺ post-estimulación

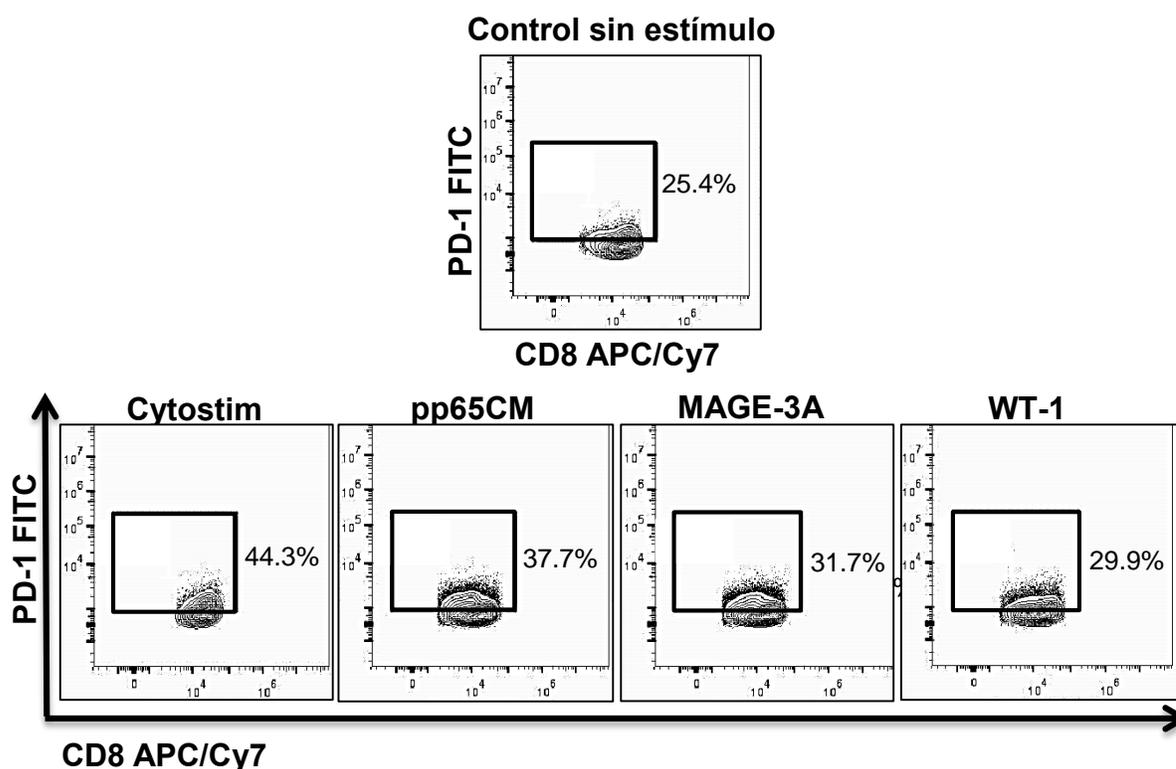


Figura 15. A) Análisis citométrico de las células PD-1⁺ en la población total de linfocitos T CD8⁺ al estimular con Cytostim, pp65CMV, MAGE-3A o WT-1. La región de las células T CD8⁺PD-1⁺ fueron establecidas de acuerdo al control de isotipo

B) Región de linfocitos T CD8⁺CD137⁺ post-estimulación

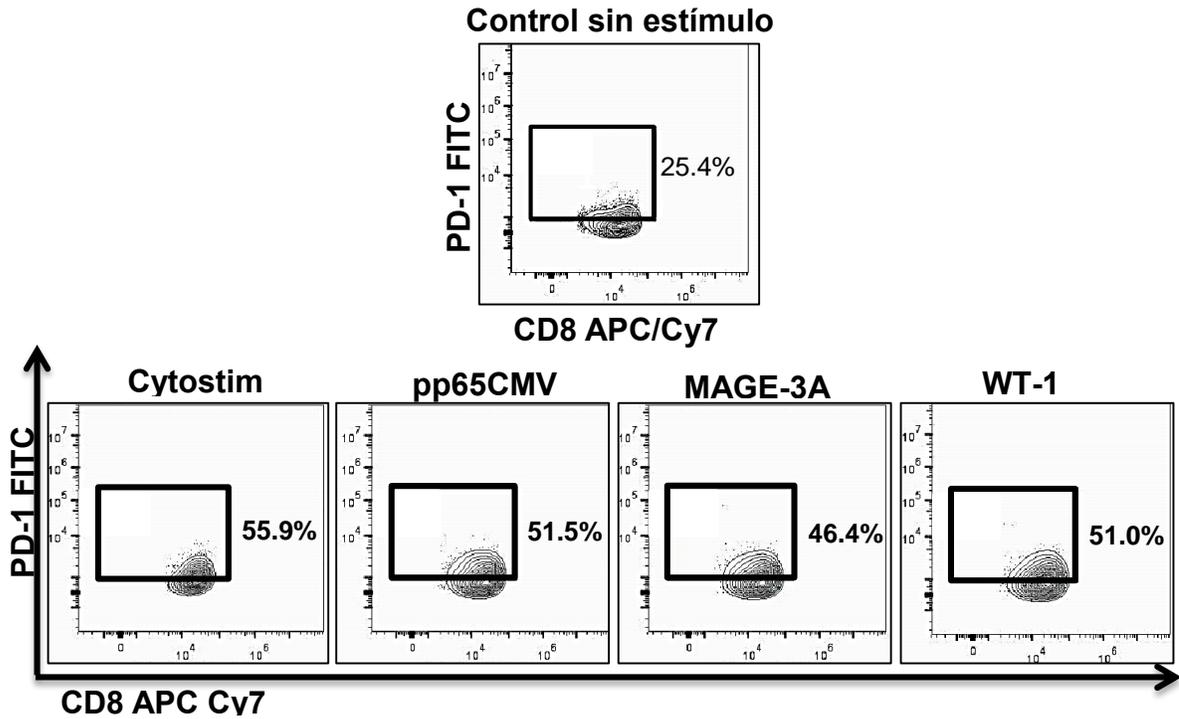


Figura 15. B) Análisis citométrico de las células PD-1⁺ en la población de linfocitos T CD8⁺CD137⁺ al estimular con Cytostim, pp65CMV, MAGE-3A o WT-1. La región de las células T CD8⁺CD137⁺PD-1⁺ fueron establecidas de acuerdo al control de isotipo

A) Región de linfocitos T CD8⁺ post-estimulación

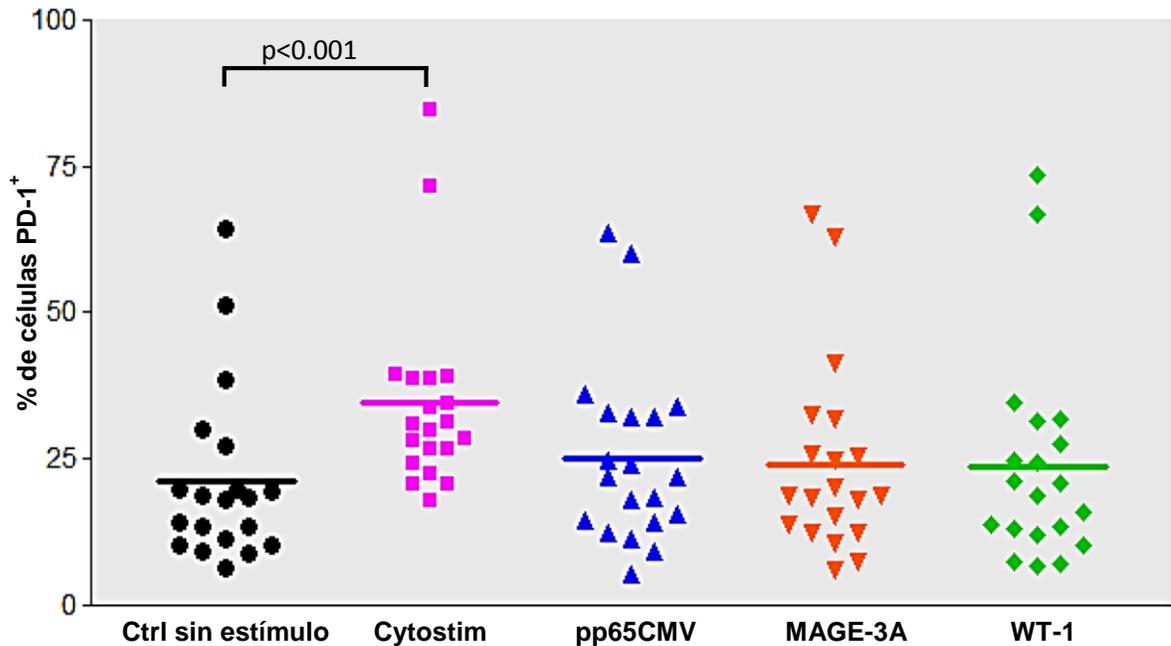


Figura 16. A) Porcentaje de linfocitos T CD8⁺PD-1⁺ en líquido pleural en función de los estímulos empleados. La barra representa la media.

B) Región de linfocitos T CD8⁺CD137⁺ post-estimulación

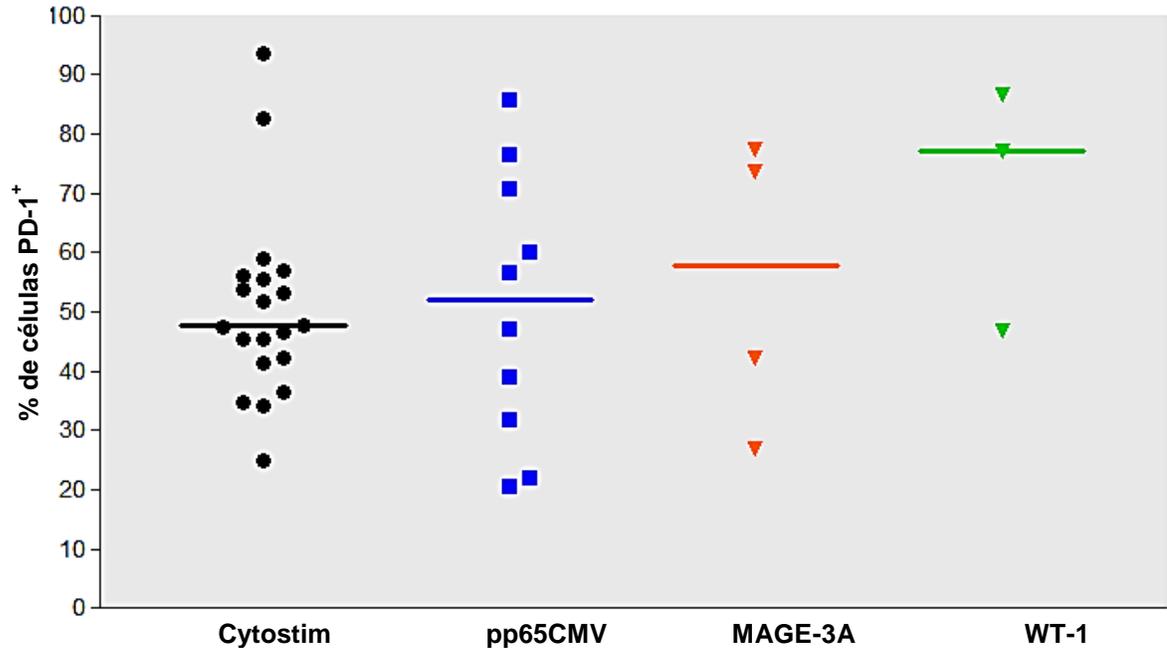


Figura 16. B) Porcentaje de linfocitos T CD8⁺CD137⁺PD-1⁺ en líquido pleural en función de los estímulos empleados. La barra representa la mediana

La población de los linfocitos T CD8⁺ no presentan un fenotipo de agotamiento

La co-expresión de PD-1 y TIM-3 en linfocitos T CD8⁺ se ha descrito como el fenotipo más severo de agotamiento en enfermedades crónicas y cáncer.^(14,19,22) Con base a esto, se evaluó la co-expresión de estas moléculas en linfocitos T CD8⁺ de pacientes con adenocarcinoma pulmonar estimulados con péptidos de MAGE-3A, WT-1, pp65CMV o Cytostim. Los porcentajes de linfocitos T CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁺ fueron menores al 10% en todos los tratamientos. Sin embargo, el porcentaje de linfocitos T CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁺ tendió a incrementarse al estimular con Cytostim, con respecto al porcentaje de linfocitos T CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁺ provenientes de la condición sin estímulo (Ver Figura 17B). Sugiriendo que la población total de linfocitos T CD8⁺ no presentan un fenotipo de agotamiento.

A partir de la subpoblación de linfocitos T CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁺ se determinó el porcentaje de células CD137⁺. El análisis mostró que menos del 10% de los linfocitos con el fenotipo PD-1⁺TIM-3⁺ expresan la molécula CD137 al estimular con

los péptidos de MAGE-3A, WT-1, pp65CMV, mientras que para el Cytostim el 42.5% de los linfocitos T CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁺ expresan la molécula CD137 (Ver Figura 18 para datos representativos). Lo anterior sugiere que la población antígeno-específica de los linfocitos T CD8⁺ no presenta un fenotipo de agotamiento.

A) Región de linfocitos T CD8⁺ post-estimulación

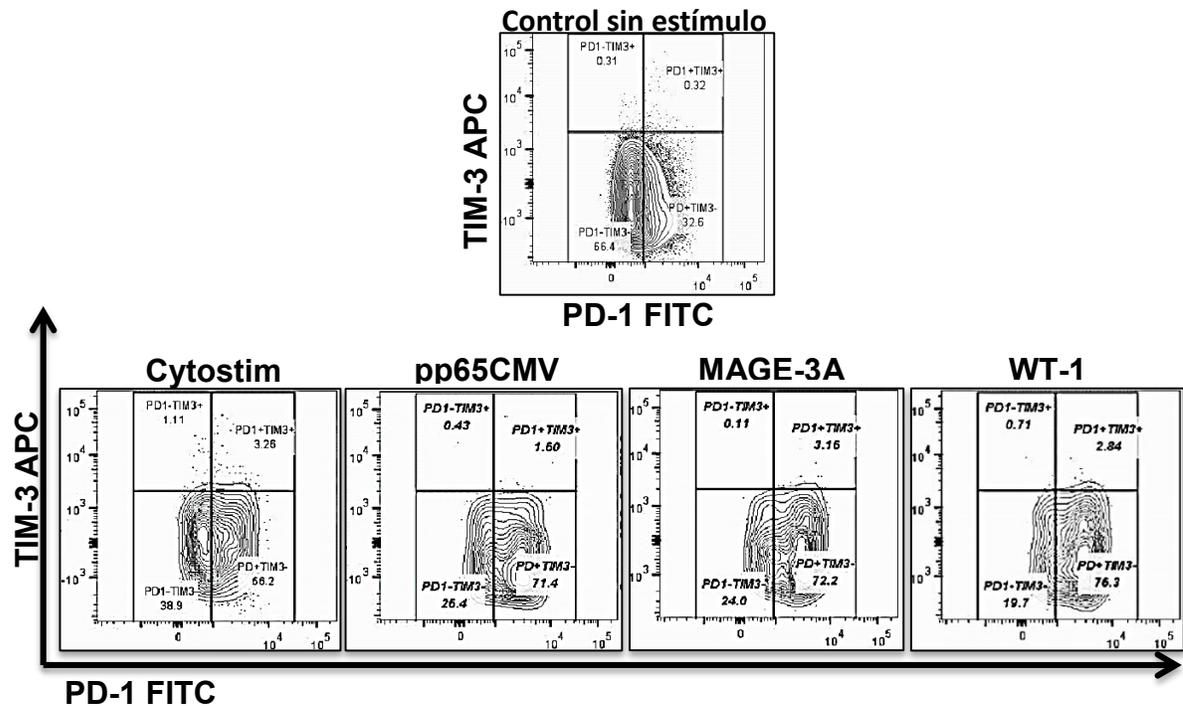


Figura 17. A) Análisis citométrico de las células PD-1⁺TIM-3⁺ en la población total de linfocitos T CD8⁺ al estimular con Cytostim, pp65CMV, MAGE-3A o WT-1 de un paciente con adenocarcinoma pulmonar. Los cuadrantes fueron establecidos de acuerdo al control de isotipo.

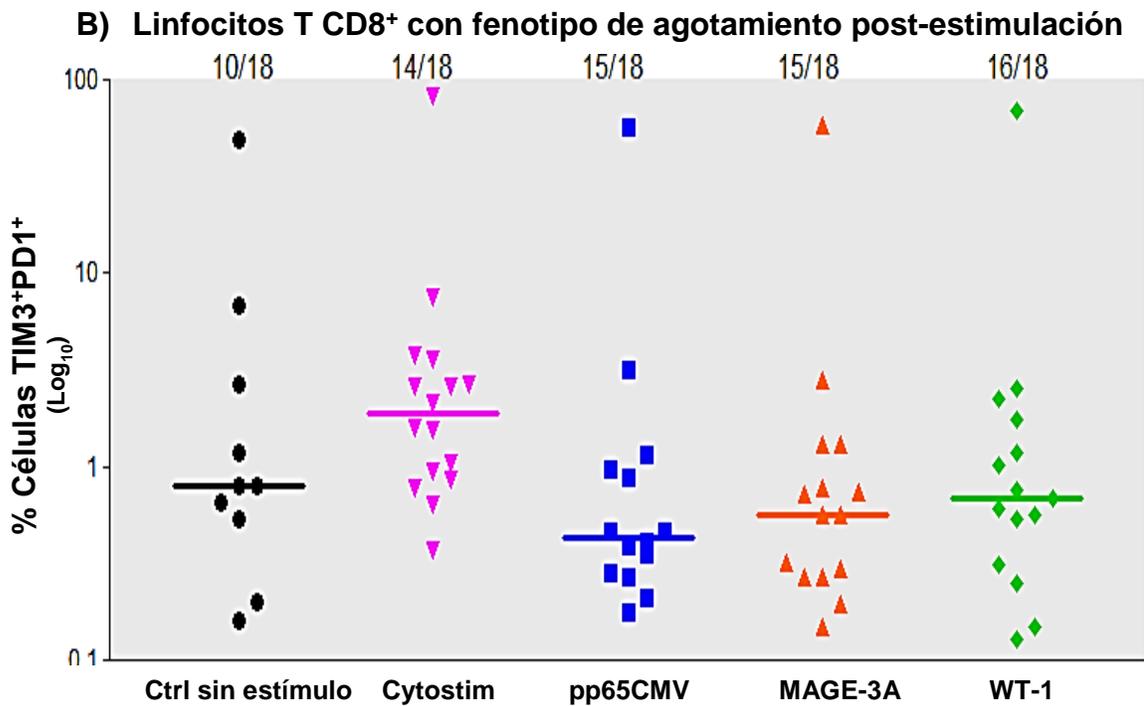


Figura 17. B) Porcentaje de células PD-1⁺TIM-3⁺ en la población total de linfocitos T CD8⁺ al estimular con Cytostim, pp65CMV, MAGE-3A o WT-1 de un paciente con adenocarcinoma pulmonar. La barra representa la mediana

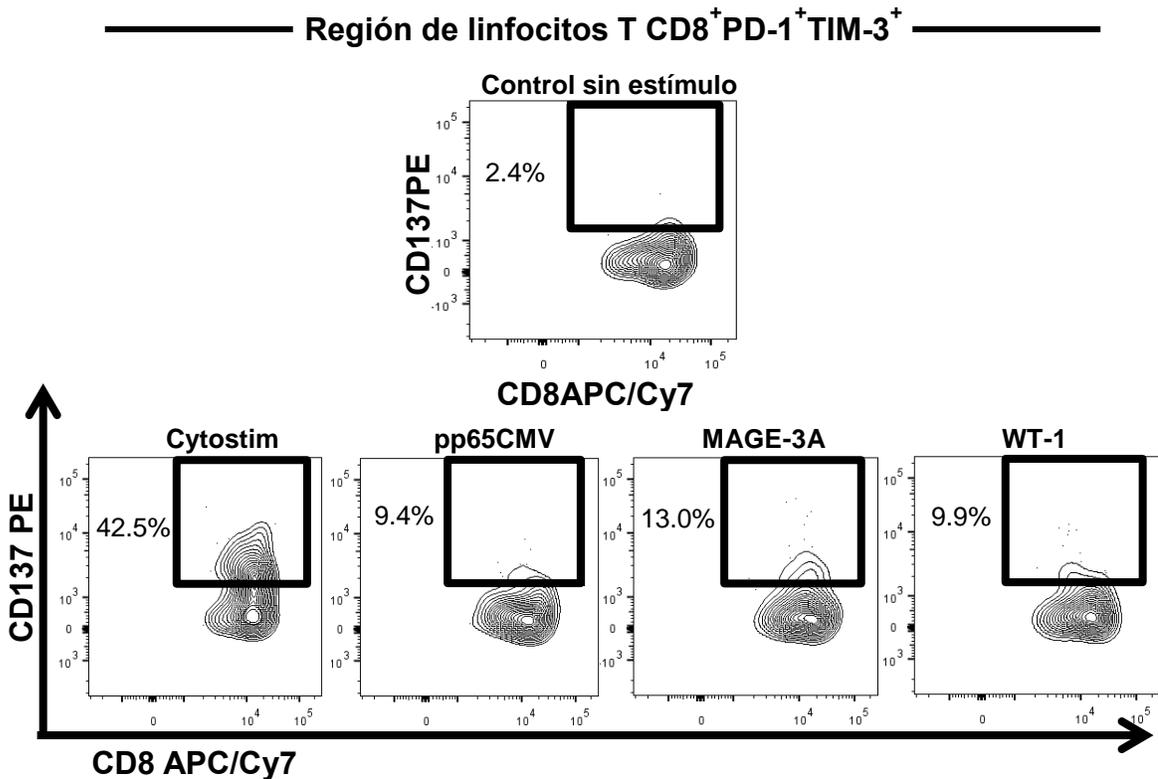


Figura 18. Análisis citométrico de las células T CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁺ en función de los siguientes tratamientos: Control sin estímulo, Cytostim, pp65CMV, MAGE-3A y WT-1 de un paciente con adenocarcinoma pulmonar. La región de las células CD137⁺ fue establecida de acuerdo al control de isotipo

DISCUSIÓN

Las células T tienen efectos antitumorales y son el principal mecanismo por el cual se pueden eliminar los tumores, esto ha sido demostrado en modelos preclínicos y clínicos de cáncer.^(8,25) En humanos, se ha demostrado que distintos tipos de cánceres contienen linfocitos infiltrantes de tumor, dichos linfocitos presentan fenotipo de memoria y efectora, sugiriendo que estas subpoblaciones son reclutadas y activadas en el sitio del tumor. Por lo anterior, se han realizado esfuerzos para emplear a los linfocitos T en la inmunoterapia de los pacientes con cáncer, ya que la persistencia de células T CD8⁺ de memoria y efectora, tanto en el sitio del tumor como en circulación, correlacionan con resultados clínicos favorables.⁽⁵⁾

Se ha reportado que el miembro de la familia del TNF CD137 (4-1BB) presenta las siguientes características: i) muestra bajos niveles de expresión en células T sin estimular, ii) aumenta su expresión en la superficie de las subpoblaciones de linfocitos T antígeno-específicos, después del contacto con su antígeno y iii) un incremento transitorio en la expresión de esta molécula en células T después de que son estimuladas con su antígeno (máxima expresión a las 24h). Por lo anterior, se ha sugerido que la molécula CD137 puede ser empleada como marcador de activación de los linfocitos T CD8⁺, permitiendo detectar a los linfocitos T antígeno-específicos.^(49,47) Nosotros encontramos en 3/20 muestras de líquido pleural maligno la expresión de la molécula CD137 en los linfocitos T CD8⁺ sin estimular, esto pudo deberse a la interacción entre las células tumorales presentes en las muestras de líquido pleural y los linfocitos T CD8⁺, provocando en esta última subpoblación su activación y expresión de la molécula CD137.

Con respecto a los datos de activación de los linfocitos T, todas las muestras de derrames pleurales presentaron linfocitos T CD8⁺CD137⁺ y CD8⁻CD137⁺ (T CD4⁺) al estimularlas con el estímulo policlonal Cytostim. Estos resultados indican que bajo nuestras condiciones experimentales es posible detectar la activación de linfocitos T por medio de la molécula CD137. El fenotipo que presentaron las células T

CD8⁺CD137⁺ fue predominantemente de memoria. Aunque también, se encontraron células naïve y efectoras.

Por otra parte, dado que el estímulo con Cytostim es policlonal y el objetivo del trabajo es analizar poblaciones T CD8⁺ antígeno-específicas, como control de este tipo de respuesta empleamos el estímulo con CMV, ya que la mayoría de las personas adultas ha estado en contacto con este virus. Se ha reportado que el virus CMV infecta entre el 50-85% de la población adulta.⁽²⁾ Bajo nuestras condiciones experimentales se pudo detectar linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ que reconocen a los péptidos de CMV en muestras de derrames pleurales. Se ha reportado que en sangre periférica de sujetos sanos el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ que responden al estímulo con péptidos de CMV es alrededor del 5% en ambas subpoblaciones⁽⁴⁷⁾, nuestros resultados con respecto a la relación de células T CD4⁺ y CD8⁺ que responden a los péptidos de CMV son similares.

A diferencia del estímulo con Cytostim, en donde se observó un porcentaje considerable de células naïve activadas, el fenotipo predominante fue el células de memoria (CD45RA⁻CD27⁺ y CD45RA⁻CD27⁻) y efectoras, lo que indica que se están activando clonas de células T CD8⁺ que previamente han estado en contacto con el CMV.

Con respecto a los antígenos MAGE-3A y WT-1, *Melloni G. et al.* encontró una tasa de frecuencia del 45% del antígeno MAGE-3A en biopsias de tumores pulmonares de pacientes con NSCLC.⁽²⁸⁾ Este reporte concuerda con el porcentaje del 45% de muestras de pacientes cuyos linfocitos T CD8⁺ expresaron CD137⁺ al estimularlos con MAGE-3A, en las muestras de los derrames pleurales de pacientes con adenocarcinoma pulmonar. Por otro lado, el 50% de los pacientes presentaron linfocitos T CD8⁺CD137⁺ en líquido pleural al estimularlos con los péptidos WT-1 y para esta proteína no se encontraron reportes que indique la prevalencia en pacientes con adenocarcinoma pulmonar. Es importante determinar si en las biopsias o en las células tumorales, de los pacientes analizados en este trabajo, la presencia de los antígenos tumorales MAGE-3A y/o WT-1 mediante inmunohistoquímica.

A diferencia de lo observado con los estímulos con Cytostim y los péptidos de CMV, hubo una tendencia a presentar un mayor porcentaje de células T CD8⁺ que T CD4⁺ que respondieron a los péptidos tumorales, lo cual sugiere que se está llevando una respuesta mediada por linfocitos T CD8⁺ y que estos se están reclutando preferentemente al compartimento pleural. Además, nuestros datos indican que se presentaron dos grupos de pacientes, aquellos cuyo porcentaje de células T CD8⁺CD137⁺ fue mayor al 1% y el otro grupo cuyo porcentaje fue menor al 1%.

La subpoblación de linfocitos T CD8⁺CD137⁺ (antígeno-específicos) presentó una elevada proporción de células de memoria y una baja proporción de la subpoblación de linfocitos efectores, resultados similares han sido descritos previamente por nuestro grupo de trabajo en linfocitos T CD8⁺ totales.^(35,32) Cabe señalar que la subpoblación de linfocitos T CD8⁺CD137⁺ efectora específica para los péptidos tumorales MAGE-3A y WT-1 se encontró disminuida, al compararla con la subpoblación de linfocitos T CD8⁺CD137⁺ efectora específica para pp65CMV, estos datos sugieren que los linfocitos T CD8⁺CD137⁺ terminalmente diferenciados que están en contacto con las células tumorales son activados crónicamente y mueren por apoptosis, mecanismo conocido como AICD y que involucra tanto a linfocitos T CD8⁺ específicos de tumor y no específicos de tumor.^(34,35) Es posible que a causa del AICD se deba a la reducida cantidad de la subpoblación de linfocitos T CD8⁺ efectores en el derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar. También, las células tumorales podrían bloquear el proceso de diferenciación de los linfocitos T CD8⁺ de memoria a linfocitos T CD8⁺ efectores. Este bloqueo puede ser mediado por componentes inmunosupresores en el microambiente tumoral (citocinas y poblaciones celulares inmunosupresoras).^(35,5) Otra explicación al bajo porcentaje de los linfocitos T CD8⁺CD137⁺ efectores puede ser por el bajo porcentaje de los linfocitos T CD4⁺CD137⁺, pues se sabe que los linfocitos T CD4⁺ son importantes para la formación y mantenimiento de los linfocitos T CD8⁺ de memoria y efectora, mejorando la respuesta inmune antitumoral. Church S. *et al.* reportaron en un modelo murino de melanoma que la presencia de linfocitos T CD4⁺ tumor-específicos aumentaron las funciones efectoras antitumorales y persistencia

de linfocitos T CD8⁺ tumor específicos, además de disminuir la expresión del marcador de agotamiento PD-1 y de la expresión del receptor TRAIL.⁽⁵⁾

Una estimulación crónica resulta en una pérdida progresiva de las funciones de los linfocitos T y a la expresión de marcadores asociados al agotamiento TIM-3 y PD-1. Se han reportado que los linfocitos T provenientes de pacientes con melanoma en estadios avanzados^(1,14), cáncer colorectal⁽³⁾ y en modelos murinos con cáncer de colon, mama y melanoma⁽³⁸⁾ adquieren este fenotipo de agotamiento. Adicionalmente, un estudio previo de nuestro grupo de trabajo ha reportado que en sangre periférica y líquido pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar, está incrementado el porcentaje de linfocitos T CD8⁺PD-1⁺ al compararlo con grupos control (sujetos con patologías crónicas y sujetos sanos).⁽³⁹⁾ Por lo que se analizó la expresión de PD-1 y la co-expresión con TIM-3 en los linfocitos T CD8⁺ de derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar.

Se ha reportado que la estimulación antigénica de linfocitos T CD8⁺ conduce a un aumento en la expresión de PD-1 de forma transitoria.⁽¹⁴⁾ Nuestros resultados empleando el estímulo con Cytostim son similares a lo reportado. Mientras que la estimulación con los péptidos pp65CMV, MAGE.3A y WT-1 no incrementó el porcentaje de células T CD8⁺PD-1⁺ al comparar con las células sin estimular. Lo que puede deberse al bajo porcentaje de células T CD8⁺CD137⁺ inducidas por el reconocimiento de los péptidos tumorales y de los péptidos de CMV.

Por otra parte, nosotros observamos que el porcentaje de los linfocitos T CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁺ en las condiciones sin estimular fue menor al 1% en las muestras de los derrames pleurales de pacientes con adenocarcinoma pulmonar, en contraste con los reportado en pacientes con melanoma.⁽¹⁴⁾ Además, las células T CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁺ expresaron CD137 al estimular con Cytostim, lo que indica que bajo nuestras condiciones experimentales es posible determinar la activación vía TCR de los linfocitos T CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁺. Sin embargo, la mayoría de los linfocitos T CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁺ no expresaron CD137 al estimularlos con pp65CMV, MAGE-3A o WT-1; lo cual sugiere que, a diferencia de otros tumores, los linfocitos T CD8⁺ tumor-específicos no presentan un fenotipo de agotamiento.

La transferencia o adopción de linfocitos T tumor-específicos puede ser empleada como alternativa terapéutica para los pacientes con tumores pulmonares que expresen MAGE-3A o WT-1. Posteriormente sugerimos purificar y reactivar ex vivo las células T CD8⁺CD137⁺ específicas para los antígenos tumorales MAGE-3A o WT-1. Adicionalmente, se requieren estudios para determinar el péptido o los péptidos de MAGE-3A o WT-1 que activan a las clonas de linfocitos T CD8⁺, empleando la tecnología de tetrámeros.

Por otra parte, se requiere analizar si se recuperan las funciones efectoras de los linfocitos T CD8⁺ específicos-MAGE-3A o WT-1 bloqueando la vía de PD-1/PD-L1 con anticuerpos monoclonales anti-PD-1, ya que nuestros datos indican que la mayoría de la subpoblación de linfocitos T CD8⁺ específicos para los antígenos tumorales expresan la molécula inhibitoria PD-1. Lo anterior con el fin de poder utilizar a los linfocitos T CD8⁺ antígeno-específicos en la inmunoterapia para los pacientes con adenocarcinoma pulmonar.

CONCLUSIONES

- ❖ Se identificaron y cuantificaron a los linfocitos T CD8⁺CD137⁺ al ser estimulados con los péptidos tumorales de MAGE-3A o WT-1, en muestras de líquido pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar
- ❖ El fenotipo de las células T CD8⁺CD137⁺ provenientes de los estímulos con antígenos tumorales corresponde a los linfocitos T CD8⁺ de memoria y CD45RA⁻CD27⁻
- ❖ La molécula PD-1 se expresó predominantemente en linfocitos T CD8⁺CD137⁺, en muestras de líquido pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar
- ❖ La población total y tumor-específica de linfocitos T CD8⁺ no presentaron un fenotipo de agotamiento, ya que no co-expresaron las moléculas PD-1 y TIM-3

BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmadzadeh M.; Johnson L. A.; Heemskerk B.; et al.; Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired; *Blood* 2009;114:1537-1544
2. Alcina A. V.; Capítulo 10: Citomegalovirus; *Asociación Española de Pediatría* 2007:684-696
3. Arai Y.; Saito H. y Ikeguchi M.; Upregulation of TIM3- and PD-1 on CD4+ and CD8+ T cells associated with dysfunction of cell-mediated immunity after colorectal cancer operation; *Yonago Acta Medica* 2012;55:1-9
4. Argente H. A.; Alvarez M. E.; *Semiología médica. Fisiopatología, semiotecnia y propedéutica. Enseñanza basada en el paciente*; Editorial Médica Panamericana; pág. 592-596
5. Church E.S.; Jensen M. S.; Antony A. P.; et al.; Tumor-specific CD4⁺ T cells maintain effector and memory tumor-specific CD8⁺ T cells; *European Journal of Immunology* 2013;00:1-11
6. Collins G. L.; Haines C.; Perkel R. et al.; Lung cancer: diagnosis and management; *American Academy of Family Physicians* 2007;75:56-63
7. Croft. M.; Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity?; *Nature Reviews Immunology* 2003;6:609-620
8. Curiel T. J.; *Cancer immunotherapy. Paradigms, practice and promise*; Springer, 2013.
9. <http://www.nature.com/reviews/posters/Tcellsubsets> (Fecha de consulta: 20/10/2013)
10. Finn O. J.; Cancer immunology; *The New England Journal of Medicine* 2008;358:2704-2715
11. Flies L. C.; Dallas B.; Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition; *Nature Reviews Immunology* 2013;13:227-242
12. Folkl A.; Bienzle D.; Structure and function of programmed death (PD) molecules; *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2010;134:33-38
13. Forslund O. K.; Nordqvist K.; The melanoma antigen genes-any clues to their functions in normal tissues?; *Experimental Cell Research* 2001;265:185-194
14. Fourcade J.; Sun Z.; Benallaoua. et al.; Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ cell dysfunction in melanoma patients; *The Journal of Experimental Medicine* 2010;207:2175-2186
15. Fox S. I.; *Fisiología humana*; Editorial Mc Graw Hill 2008
16. Hanahan D.; Weinberg R. A.; Hallmarks of cancer; *Cell*. 2000;100:57-70
17. Hanahan D.; Weinberg R. A.; Hallmarks of cancer: The next generation; *Cell*. 2011;144:646-674
18. Hastie N. D.; Wilm's tumor gene and function; *Current Opinion in Genetics and Development* 1993;3:408-413
19. Heusschen R.; Griffioen A. W.; Thijssen V. L.; Galectin-9 in tumor biology: A jack of multiple trades; *Biochimica et Biophysica Acta* 2013;1836:177-185
20. Iglesias M. C.; Crabtree B.; Reyes G.; ¿Una nueva vía terapéutica para controlar el VIH? la molécula PD1 en la inhibición de la respuesta inmune celular; *Gaceta Médica México* 2008;144:75-78

21. Jemal A.; Bray F.; Center M. M. et al.; Global cancer statistics; CA: A Cancer Journal for Clinicians; 2011;61:69-90
22. Jin H. T.; Anderson A. C.; Tan W. G. et al.; Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T cell exhaustion during chronic viral infection; Proceedings of the National Academy of Sciences 2010;107:14733-14738
23. Jungbluth A. A.; Busam J. K.; Kolb D. et al.; Expression of MAGE-antigens in normal tissues and cancer; International Journal of Cancer 2000;85:465-465
24. Kaech S. M.; Cui W.; Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation; Nature Reviews Immunology 2012;12: 749-761
25. Kirkwood J. M.; Butterfield L. H.; Tarhini A. A. et al.; Immunotherapy of cancer in 2012; CA: A Cancer Journal for Clinicians 2012;5:309-3335.
26. Leen A. M.; Rooney C. M.; Foster A. E.; Improving T cell therapy for cancer; The Annual Review of Immunology 2007;25:243-265
27. MacIver N. J.; Michalek R. D.; Rathmell J. C.; Metabolic Regulation of T lymphocytes; The Annual Review of Immunology 2013;31:259–283
28. Melloni G., Ferreri A. J., Russo V., Gattinoni L., Arrigoni G., Ceresoli G.L. et al.; Prognostic significance of cancer-testis gene expression in resected non-small cell lung cancer patients; Oncology Reports 2004;12:145–151.
29. Mocellin S.; Benna C.; Pilati P.; Coinhibitory molecules in cancer biology and therapy; Cytocine & Growth Factor Reviews 2013;24:147-161
30. Murphy K.; Travers P.; Walport M.; Inmunología de Janeway; Editorial Mc Graw Hill 2009
31. Parkin J.; Cohen B. An overview of the Immune system; The lancet 2001;357:1777-1789
32. Prado H.; Aguilar D.; Flores H. et al.; Effector, memory and naïve CD8+ T cell in peripheral blood and pleural effusion from lung adenocarcinoma patients; Lung Cancer 2005;47:361-371
33. Prado H.; Ávila F.; López J.S.; Linfocitos T citotóxicos en cáncer y autoinmunidad; Revista de Investigación Clínica 2004;56:629-639
34. Prado H.; García V.; Romero S.; Muerte inducida por activación de linfocitos T CD8+ en cáncer de pulmón: Determinación de la vía inductora de la apoptosis. Editorial Academia Española 2012
35. Prado. H.; Romero S.; Aguilar D. et al.; Tumor-induced CD8+ T cell dysfunction in lung cancer patients; Clinical and Developmental Immunology 2012; doi:10.1155/2012/741741;1-11
36. Ramalingam S. S.; Owonikoko T. K.; Khuri F. R.; Lung cancer: New biological insights and recent; American Cancer Society 2011;61:91-112
37. Rogner U. C.; Wilke K.; Steck E. et al.; The melanoma antigen gene (MAGE) family is clustered in the chromosomal band Xq28; Genomics 1995;25:725-731
38. Sakuishi K.; Apetoh L.; Sullivan J. M. et al.; Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity; The Journal of Experimental Medicine 2010;207:2187-2194
39. Sandoval Vazquez. 2009. Determinación de la expresión de los ligandos PD-L1 y PD-L2 en células tumorales y el receptor PD-1 en linfocitos T CD4+ y CD8+ provenientes de pacientes

- con adenocarcinoma pulmonar. Tesis de licenciatura; Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. pp 67
40. Sharma D.; Eichelberg M. R.; Haag J. D. et al.; Effective flow cytometric phenotyping of cells using minimal amounts of antibody; *Biotechniques* 2012; 53:57-60
 41. Stathopoulos T. G.; Kalomenidis L.; Malignant pleural effusion. Tumor-host interactions unleashed; *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2012;186:487-492
 42. Stefan R.; Transcriptional regulation by WT1 in development; *Current Opinion in Genetics and Development* 2005;15:542-547
 43. Stewart T. J.; Smyth M. J.; Improving cancer immunotherapy by targeting tumor-induced immune suppression; *Cancer and Metastasis Reviews* 2011;30:125-140
 44. Vargas M. I.; Jiménez L.; Ramírez G. et al.; PD-1 y sus ligandos como reguladores de la respuesta inmune; *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias México* 2008;21:235-240
 45. Vesely M. D.; Kershaw M. H.; Schreiber R. D. et al.; Natural innate and adaptive immunity to cancer; *The Annual Review of Immunology* 2011;29:235-271
 46. Vesely M. D.; Schreiber R. D.; Cancer immunoediting: Antigen, mechanisms, and implications to cancer immunotherapy; *Annals of the New York Academy of Sciences* 2013;1284:1-5
 47. Wehler T. C.; Karg M.; Distler E. et al.; Rapid identification and sorting of viable virus-reactive CD4+ and CD8+ T cell based on antigen-triggered CD137 expression; *Journal of Immunological Methods* 2008;339:23-37
 48. Wherry J. E.; T cell exhaustion; *Immunology* 2011;12:492-499
 49. Wolfl M.; Kumball J.; Ho W. Y. et al.; Activation-induced expression of CD137 permits detection, isolation, and expansion of the full repertoire of CD8+ T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities; *Blood* 2007;110:201-210
 50. Yano S.; Herbst R. S.; Shinohara H. et al.; Treatment for malignant pleural effusion of human lung adenocarcinoma by inhibition of vascular endothelial growth factor tyrosine kinase phosphorylation; *Clinical Cancer Research* 2000;6:957-965
 51. Yasumoto K.; Hanagiri T.; Takenoyama M.; Lung cancer-associated tumor antigens and the present status of immunotherapy against non-small-cell lung cancer; *General Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2009;57:449-457
 52. Yi J. S.; Cox M. A. and Zajac A. J.; T-cell exhaustion: Characteristics, causes and conversion; *Immunology* 2010; 129:474-481
 53. Zitvogel L.; Apetoh L.; Ghiringhelli F. et al.; The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success?; *The Journal of Clinical Investigation* 2008;6:1991-1999
 54. Zou W.; Regulatory T cells, tumor immunity and immunotherapy; *Nature Reviews Immunology* 2006;6:295-307