



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD47 EN CÉLULAS DE SANGRE  
PERIFÉRICA DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN Y SU  
POSIBLE CORRELACIÓN CON LA SOBREVIDA GLOBAL**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA

**MAURICIO SÁNCHEZ MARÍN**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. LOURDES MARÍA BARRERA RAMÍREZ  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

MÉXICO, D.F. AGOSTO, 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD47 EN CÉLULAS DE SANGRE  
PERIFÉRICA DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN Y SU  
POSIBLE CORRELACIÓN CON LA SOBREVIVENCIA GLOBAL**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA

**MAURICIO SÁNCHEZ MARÍN**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. LOURDES MARÍA BARRERA RAMÍREZ**

**FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.**

**COMITÉ TUTOR: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.**

**DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.**

**MÉXICO, D.F. AGOSTO, 2014**

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

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 28 de abril de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **SÁNCHEZ MARÍN MAURICIO** con número de cuenta **512025119**, con la tesis titulada **"EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD47 EN CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN Y SU POSIBLE CORRELACIÓN CON LA SOBREVIVENCIA GLOBAL"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. LOURDES MARÍA BARRERA RAMÍREZ**:

Presidente: DR. HÉCTOR MAYANI VIVEROS  
Vocal: DR. ÁNGEL ALFONSO ZARAIN HERZBERG  
Secretario: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA  
Suplente: M. EN C. ÓSCAR GERARDO ARRIETA RODRÍGUEZ  
Suplente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN

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

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 12 de junio de 2014

*M. del Coro Arizmendi*

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

## AGRADECIMIENTOS

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

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

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

Tutora Principal: Dra Lourdes María Barrera Ramírez

Comité Tutorial: Dra Marcela Lizano Soberón

Dr Alejandro Zentella Dehesa.

## AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL.

A mis padres por todo el apoyo incondicional que me han brindado no solo a lo largo de la Maestría sino en toda mi vida. Por estar siempre ahí cuando los necesité, por buscar ayudarme siempre y aún cuando no se los he pedido.

A mi hermana por sus consejos y por su deseo de ver en mí a alguien organizado en todos los aspectos de mi vida. A mi cuñado y a mi sobrinito por ser parte de mi vida y de la familia. Y a los tres juntos por alegrarme la vida.

A todos, Mil Gracias.

# ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>11</b>
<b>I. ANTECEDENTES</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Cáncer</b>	<b>15</b>
1.1.1 Definición de Cáncer	15
1.1.2 Epidemiología del Cáncer: Una Enfermedad Global	19
1.1.3 Participación del Sistema Inmune en Cáncer	26
1.1.3.1 Componentes celulares del Sistema Inmune Innato en Cáncer	26
1.1.3.2 Neutrófilos en Cáncer	29
1.1.3.3 Componente celulares del Sistema Inmune Adaptativo	30
1.1.4 Mecanismos de Evasión Tumoral	34
1.1.4.1 Evasión de la Eliminación Celular por células tumorales	36
1.1.4.2 Generación de Microambiente Inmunosupresor	38
<b>1.2 Cáncer Pulmonar</b>	<b>41</b>
1.2.1 Epidemiología	41
1.2.2 Clasificación del cáncer pulmonar	42
1.2.3 Tratamiento y resistencia a fármacos	43
1.2.4 Inmunología del cáncer pulmonar	45
<b>1.3 Biomarcadores en Cáncer</b>	<b>46</b>
1.3.1 Biomarcadores Pronósticos y Predictivos	46
1.3.2 Uso de Biomarcadores en diferentes tipos de Cáncer	46
1.3.3 Biomarcadores en Cáncer de Pulmón	49
<b>1.4 CD47</b>	<b>51</b>
1.4.1 Estructura	51
1.4.2 Ligandos endógenos	53

1.4.3 CD47 y Trombospondina-1 (TSP1)	56
1.4.4 CD47 e Integrinas	59
1.4.5 CD47 y SIRPs en Poblaciones Hematopoiéticas	61
1.5 Papel de CD47 en Cáncer	64
1.5.1 CD47 en la Apoptosis	64
1.5.2 CD47 en diversos tipos de Cáncer	65
1.5.2.1 CD47 en tumores no sólidos	67
1.5.2.2 CD47 en tumores sólidos	68
1.6 CD47 como Biomarcador en Cáncer	70
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>72</b>
<b>III. HIPÓTESIS</b>	<b>73</b>
<b>IV. OBJETIVOS</b>	<b>74</b>
4.1 Objetivo General	74
4.2 Objetivos Específicos	74
<b>V. METODOLOGÍA</b>	<b>75</b>
5.1 Población de estudio	75
5.2 Criterios de inclusión	76
5.3 Criterios de exclusión	77
5.4 Obtención de células polimorfonucleares de sangre periférica	78
5.5 Inmunofenotipificación de células polimorfonucleares	78
5.6 Evaluación de la expresión de CD47 por citometría de flujo	78
5.7 Análisis Estadístico	79
<b>VI. RESULTADOS</b>	<b>80</b>
6.1 Características clínico-demográficas de pacientes estudiados	80
6.2 Frecuencias de la expresión del receptor CD47 total y en neutrófilos de Sangre periférica de sujetos control y pacientes con cáncer de pulmón De células no pequeñas	81

<b>6.3 Correlación de características generales de los pacientes con cáncer de Pulmón con densidad de expresión del receptor CD47</b>	<b>84</b>
<b>6.4 Sobrevida global de los pacientes relacionada con densidad de expresión Del receptor CD47</b>	<b>86</b>
<b>VII. DISCUSIÓN</b>	<b>91</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	<b>97</b>
<b>IX. REFERENCIAS</b>	<b>98</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Apaf-1	Factor activante de peptodasa apoptótica 1
ATP	Adenosil trifosfato
Bax	Proteína x asociada a Bcl-2
Bcl-2	Proteína del linfoma de células B CLL
BRCA1	Gen 1 de susceptibilidad al cáncer de mama
CCL5	Ligando 5 de quimiocinas (motivo C-C)
CCL8	Ligando 8 de quimiocinas (motivo C-C)
CXCL4,8	Ligando 4,8 de quimiocinas (motivo C-X-C)
CXCL9,10	Ligando 9, 10 de quimiocinas (motivo C-X-C)
CXCL12,15	Ligando 12, 15 de quimiocinas (motivo C-X-C)
cAMP	Adenosina monofosfato ciclica
cGMP	Guanosina monofosfato ciclica
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
ERCC1	Proteína del grupo 1 de complementación cruzada con mecanismos de reparación por escisión
FasL	Fas ligando
GLUT1	Transportador 1 de glucosa
GM-CSF	Factor Estimulante de colonias de Granulocitos/Macrófagos
IAP	Proteína asociada a integrinas

IFN $\beta$	Interferón beta
IFN $\gamma$	Interferón gamma
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
ICAM-3	Molécula-3 de adhesión intercelular.
KIRs	Receptores tipo inmunoglobulina inhibitorios de células NK.
<i>KRAS</i>	Oncogen viral homólogo del sarcoma Kirsten de rata V-Ki-ras2
MAPKs	Protein cinasas activadas por mitógenos
MIC A	Polipéptido de complejo MHC clase I relacionado con secuencia A.
MIC B	Polipéptido de complejo MHC clase I relacionado con secuencia B.
MMP8	Metaloproteinasa de matriz extracelular-8
NK	Células Asesinas Naturales
NK T	Células T Asesinas Naturales
NKG2D	Receptor activante de células Asesinas naturales NKG2D
NKp30	Receptor activante de células asesinas naturales NKp30
NKp44	Receptor activante de células asesinas naturales NKp44
NKp46	Receptor activante de células asesinas naturales NKp46
OMS	Organización Mundial de la Salud
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGE2	Prostaglandina 2
SIRPs	Proteínas regulatorias de señal
TCR	Receptor de células T

TGF- $\beta$	Factor de crecimiento tumoral beta
TIM	Proteínas inmunoglobulinas y mucinas de linfocitos T.
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF.
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
VSMCs	Células vasculares de músculo liso
UTP	Uridinil trifosfato

## ABBREVIATURE LIST

DNA	Desoxirribonucleic acid
Apaf-1	Apoptotic peptidase activating factor 1
ATP	Adenosyl Triphosphate
Bax	Bcl-2 associated x protein
Bcl-2	B-cell CLL/Lymphoma 2 protein
BRCA1	Breast Cancer Susceptibility Gene 1
CCL5	Chemokine (motif C-C) ligand 5
CCL8	Chemokine (motif C-C) ligand 8
CXCL4,8	Chemokine (motif C-X-C) ligands 4, 8
CXCL9,10	Chemokine (motif C-X-C) ligands 9, 10
CXCL12,15	Chemokine (motif C-X-C) ligands 12, 15
cAMP	Ciclic adenosine monophosphate
cGMP	Ciclic guanosine monophosphate
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERCC1	Excision Repair cross- Complementation Group 1
FasL	Fas Ligand
GLUT1	Glucose Transporter 1
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage colony stimulating factor
IAP	Integrin associated protein

IFN $\beta$	Beta Interferon
IFN $\gamma$	Gamma Interferon
iNOS	Inducible Nitric Oxide Sintase
ICAM-3	Intercellular adhesion molecule-3
KIRs	Inhibitory killer-cell immunoglobulin-like receptors
<i>KRAS</i>	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MAPKs	Mitogen activated protein kinases
MIC A	MHC class I polypeptide-related sequence A
MIC B	MHC class I polypeptide-related sequence B
MMP8	Matrix Metalloproteinase 8
NK	Natural Killer cell
NK T	Natural Killer T cell
NKG2D	Activating killer cell receptor NKG2D
NKp30	Activating killer cell receptor NKp30
NKp44	Activating killer cell receptor NKp44
NKp46	Activating killer cell receptor NKp46
WHO	World Health Organization
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PGE2	Prostaglandin 2
SIRPs	Signal Regulatory proteins
TCR	T cell Receptor

TGF- $\beta$	Tumor Growth Factor beta
TIM	T cell immunoglobulin and mucin protein
TRAIL	TNF-related Apoptosis inducing ligand
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis factor alpha
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VSMCs	Vascular Smooth Muscle cells
UTP	Uridine triphosphate

## RESUMEN

El cáncer es un grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. En el año 2000, Hanahan y Weinberg propusieron 6 características o “etiquetas” del cáncer. Más tarde, en el 2011 los mismos autores propusieron agregar la evasión de la destrucción inmune como una característica o “etiqueta” adicional que comparten todos los tipos tumorales. Globalmente, el cáncer de pulmón fue el tipo tumoral más comúnmente diagnosticado y la principal causa de muerte por cáncer en hombres en el 2008. El sistema inmune identifica y elimina células tumorales con base en la expresión de antígenos específicos tumorales a través de diferentes poblaciones celulares hematopoiéticas. Los neutrófilos son las primeras células que infiltran el sitio de tumor primario. Una vez allí, ejercen funciones protumorales que promueven el reclutamiento de nuevos neutrófilos, estimulan la angiogénesis, crecimiento e invasión de células tumorales. A pesar del desarrollo de una respuesta antitumoral por parte del sistema inmune, variantes de células tumorales no son eliminadas, con lo que células tumorales pueden mantenerse en equilibrio con el sistema inmune y posteriormente, escapar. Células tumorales pueden evadir la respuesta inmune por falta de reconocimiento inmunológico o pueden evadir su eliminación. Recientemente se descubrió que, células tumorales pueden evadir su eliminación celular por inhibición del proceso de fagocitosis a través de la unión de CD47 por parte de células tumorales y SIRP $\alpha$  en macrófagos. CD47 es una proteína integral de membrana, miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas. CD47 interactúa con integrinas, proteínas de familia SIRP y trombospondina-1, con las cuales ejerce diferentes funciones. Células progenitoras y madre circulantes incrementan expresión de CD47 para evitar ser fagocitadas. Células tumorales imitan este mecanismo. Anti-CD47 que bloquea interacción CD47/SIRP $\alpha$  permite la fagocitosis de células tumorales y en modelos murinos inhibe el crecimiento tumoral y previene el proceso de metástasis. El objetivo de este estudio fue determinar los niveles de expresión de CD47 total en sangre periférica de pacientes de cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCNP) y controles, así como la frecuencia de neutrófilos y los niveles de expresión de CD47 en neutrófilos de pacientes y compararlos con las variables clínicas. Además, se evaluó la expresión de CD47 en pacientes como posible biomarcador pronóstico. Los resultados

muestran que, la frecuencia de CD47 total fue similar entre pacientes y controles, sin embargo, pacientes con CPCNP expresan más del doble de receptores CD47 por célula. La frecuencia de neutrófilos (CD66b+ CD15+) se encontró incrementada en pacientes CPCNP con respecto a controles. Esto va en concordancia con lo descrito por otros estudios en CPCNP. Neutrófilos de pacientes CPCNP tienen incrementada más de 2 veces la expresión de CD47 en superficie con respecto a controles. La densidad de expresión de CD47 total se encuentra asociada en pacientes CPCNP con el estadio clínico, presencia de oligometastasis y con hipoalbuminemia. Estos resultados sugieren que el incremento en expresión de CD47 total está relacionado con el desarrollo tumoral y con el estatus nutricional de pacientes. La alta expresión de CD47 total en sangre periférica de pacientes correlaciona con peor sobrevida global. La alta expresión de CD47 en neutrófilos correlaciona con una tendencia a menor sobrevida global. Estos resultados muestran que CD47 podría ser un posible biomarcador pronóstico en pacientes CPCNP en estadio IV.

## ABSTRACT

Cancer is a group of diseases that can affect any part of the body. In 2000, Hanahan and Weinberg proposed six characteristics or "hallmarks" of cancer. Later, in 2011, the same authors proposed adding evading immune destruction as a feature or additional "hallmark" shared by all tumor types. Globally, lung cancer was the most commonly diagnosed type of cancer and the leading cause of cancer death in men in 2008. The immune system identifies and removes tumor cells based on the expression of tumor specific antigens through various hematopoietic cell populations. Neutrophils are the first cells infiltrating the primary tumor site. Once there, exhibited protumoral functions that promote the recruitment of new neutrophils, stimulate angiogenesis, growth and invasion of tumor cells. Despite the development of an anti-tumor response by the immune system, variants of tumor cells are not eliminated, so tumor cells are maintained in balance with the immune system and then tumor cells escapes. Tumor cells avoid immune response by lack of immune recognition or can avoid immune cell elimination. Recently it has been discovered that tumor cells can evade cell elimination process by inhibiting phagocytosis through binding of CD47 to SIRP $\alpha$ . CD47 is an integral membrane protein, a member of the immunoglobulin superfamily. CD47 interacts with integrins, SIRP family proteins and thrombospondin1 and exerts diverse functions. Circulating stem cells and progenitor cells increased CD47 expression to avoid being phagocytosed. Tumor cells mimic this mechanism. CD47 blocking antibodies allows phagocytosis of tumor cells and in murine model inhibited tumor growth and prevent metastasis process. The aim of this study was to determine levels of expression of CD47 on peripheral whole blood of patients of non-small lung cancer cells (NSCLC) and controls as well as the frequency of neutrophils and the levels of expression of CD47 in neutrophils of patients and compared with clinical variables. Furthermore, the expression of CD47 in patients was evaluated as a potential prognostic biomarker. The results show that, overall CD47 frequency was similar between patients and controls, however, NSCLC patients expressed more than twice CD47 receptors per cell. The frequency of neutrophils (CD66b+ CD15+) was found increased in NSCLC patients compared to controls. This is consistent with the findings of other studies in NSCLC. Neutrophils of NSCLC patients have increased more than 2

times the surface expression of CD47 compared to controls. The density of expression of CD47 is associated in all NSCLC patients with clinical stage, presence of oligometastases and hypoalbuminemia. These results suggest that increased surface expression of CD47 is related to overall tumor growth and nutritional status of patients. High expression of CD47 in peripheral blood of NSCLC patients correlated with worse overall survival. High expression of CD47 in neutrophils correlated with a trend towards lower overall survival. These results show that CD47 could be a potential prognostic biomarker in patients with stage IV NSCLC.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer es un grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo [1], ocurre en casi cualquier órgano y tejido y está relacionado con una variedad de factores etiológicos como la inestabilidad genómica y el estrés proveniente del medio ambiente. En el año 2000, Hanahan y Weinberg [3] propusieron 6 características o “etiquetas” del cáncer. Más tarde, en el 2011 [4], los mismos autores propusieron agregar la reprogramación del metabolismo celular y la evasión de la destrucción inmune como 2 características o “etiquetas” adicionales que comparten todos los tipos tumorales. Este grupo de enfermedades es un problema de salud pública mundial por el número de muertes, la alteración en el estilo de vida de los pacientes y por los costos de la atención médica que demanda [5,6]. Globalmente, el cáncer de pulmón fue el tipo tumoral más comúnmente diagnosticado y la principal causa de muerte por cáncer en hombres en el 2008 con un total de 1.6 millones de casos nuevos y 1.4 millones de muertes. Cada año se diagnostican en México cerca de 100 mil nuevos caso de cáncer, de los cuales aproximadamente dos tercios fallecen debido a una detección tardía o al fracaso del tratamiento [14]. De manera general, la tasa de mortalidad por cáncer en México tiene un incremento promedio de 2.91% anual [13].

El sistema inmune identifica y elimina células tumorales con base en la expresión de antígenos específicos tumorales a través de células dendríticas, células NK, células NKT, macrófagos, linfocitos T CD4 y CD8 y neutrófilos. Otras células como células supresoras de origen mieloide y células T reguladoras ejercen una función inmunosupresora. Al igual que los macrófagos, neutrófilos que infiltran el sitio de tumor primario pueden ejercer funciones protumorales. Estos neutrófilos asociados a tumor (TAN) permiten el reclutamiento de nuevos neutrófilos al sitio tumoral mediante la secreción de quimiocinas atrayentes como CXCL1 y CXCL8 [30]. Los TANs estimulan la angiogénesis tumoral, promueven el crecimiento del tumor y facilitan la invasión de células tumorales por medio de elastasa, catepsina G, proteinasa 3, entre otras [29-31].

A pesar del desarrollo de una respuesta antitumoral por parte del sistema inmune, variantes de células tumorales no son eliminadas, por lo que se pasa a la fase de

equilibrio de la teoría de inmunoeedición del cáncer [41, 42]. Esta fase representa un balance dinámico entre células tumorales y el sistema inmune y puede durar mucho tiempo debido a que las células tumorales “sobrevivientes” entran en estado de dormancia. Después de roto el equilibrio entre las células tumorales y el sistema inmune, células tumorales prosiguen a la fase de escape. Células tumorales pueden evadir la respuesta inmune por falta de reconocimiento inmunológico, por ejemplo, células tumorales pueden adquirir defectos en el procesamiento de antígenos y en las vías de presentación de antígenos [39, 41].

Células tumorales, aun cuando no puedan evadir su detección por parte de células del sistema inmune pueden evadir su eliminación, sobreexpresando moléculas anti-apoptóticas como FLIP y Bcl-xL o a través de ligandos inhibitorios que suprimen las acciones citotóxicas de células inmunes como PD-L1 [38]. Recientemente se descubrió que, células tumorales pueden evadir su eliminación celular a través de la inhibición del proceso celular de fagocitosis.

Células apoptóticas necesitan ser eliminadas ya que las consecuencias de una eliminación celular ineficiente es el proceso de necrosis secundaria. Células apoptóticas son eliminadas en un proceso que involucra la liberación de señales “encuéntrame”, exposición de señales “cómeme” y la pérdida de señalización “no me comas”. Por otra parte, células sanas exponen en su superficie membranal señalización “no me comas” por medio de la unión entre CD47 en la célula diana y SIRP $\alpha$  en superficie membranal de célula fagocito.

CD47 es una proteína que se encuentra expresada en la membrana plasmática de todas las células hematopoiéticas [87]. CD47 es una proteína integral de membrana tipo 1, miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Se compone de un dominio inmunoglobulina variable extracelular, un dominio múltiple altamente hidrofóbico que abarca 5 veces la membrana y un dominio citoplásmico alternativamente escindido [48, 49, 92, 93]. CD47 interactúa y regula a diferentes integrinas, también se une a ligandos en otras células como proteínas SIRPs y trombospondina-1 [92, 93]. CD47 interacciona con integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 y trombospondina-1 y permite la propagación de plaquetas sobre fibrinógeno [98]. La unión de CD47 con trombospondina-1 inhibe la angiogénesis

inducida por óxido nítrico en células vasculares de músculo liso [107, 109] entre otras funciones. La unión CD47/SIRP $\alpha$  le permite distinguir a macrófagos “lo propio” de “lo extraño” [127] y cumple diferentes funciones en las poblaciones hematopoiéticas, entre ellas la inhibición física del proceso de fagocitosis celular.

El incremento en los niveles de expresión de CD47 por parte de células progenitoras y células madre que circulan en torrente sanguíneo y posteriormente viajan a través de sinusoides, les permite evitar ser fagocitadas. Este mecanismo es imitado por células tumorales [159] de diversos tipos de cáncer [160-174]. El uso de anticuerpo bloqueante de interacción CD47/SIRP $\alpha$  permite la fagocitosis de células tumorales [159, 161-163, 165, 169, 171, 172, 174]. El efecto de anti-CD47 en modelos murinos mostró que inhibe el crecimiento tumoral [159, 161, 169, 171, 172]. Además, anti-CD47 previene metástasis de células tumorales [162, 166, 169, 172].

Por esto, CD47 ha sido propuesto como agente terapéutico muy prometedor. Sin embargo, la evaluación de sus niveles de expresión fuera del sitio de tumor primario, específicamente en sangre periférica y su evaluación como posible biomarcador se ha reportado pobremente sólo en cáncer de mama. En cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCNP) los únicos biomarcadores pronósticos existentes son: mutaciones en EGFR (receptor de factor de crecimiento epidermal) y los rearrreglos ALK (cinasa de linfoma anaplástico), sin embargo estos se presentan solo en 15% de los casos de pacientes con CPCNP [82, 84]. Por lo que se requieren estudios para determinar nuevas moléculas que puedan servir como biomarcadores en CPCNP.

El objetivo de este estudio fue determinar los niveles de expresión de CD47 total en sangre periférica de pacientes y controles, así como la frecuencia de neutrófilos (CD66b+ CD15+) y los niveles de expresión de CD47 en neutrófilos y compararlos con las variables clínicas. Además, se evaluó la expresión de CD47 como posible biomarcador pronóstico.

La frecuencia de CD47 total fue similar entre pacientes y controles, esto puede deberse a que CD47 es una proteína ubicua en poblaciones hematopoiéticas. Sin embargo, los pacientes con CPCNP expresan más del doble de receptores CD47 por célula.

Por otra parte la frecuencia de neutrófilos (CD66b+ CD15+) se encontró incrementada en pacientes CPCNP con respecto a controles. Esta neutrofilia es un mecanismo reconocido e identificado en diversos tipos tumorales incluido el CPCNP. Neutrófilos de sangre periférica de pacientes CPCNP tienen incrementada más de 2 veces la expresión de CD47 en superficie con respecto a sujetos control.

La densidad de expresión de CD47 total se encuentra asociada en pacientes CPCNP con el estadio clínico, presencia de oligometastasis y con hipoalbuminemia. La densidad de expresión de CD47 total se incrementa más de 2 veces conforme se pasa de estadio III al IV de la enfermedad. Así mismo, se incrementa casi 17 veces en pacientes con oligometastasis. También, en pacientes con hipoalbuminemia (condición común de pacientes CPCNP), la densidad de expresión de CD47 total es casi el doble con respecto a pacientes con niveles normales de albumina de suero, con lo que el incremento de su densidad de expresión está relacionado con el estatus nutricional de pacientes.

Finalmente, la alta expresión de CD47 total en sangre periférica de pacientes correlaciona con peor sobrevida global. También, la alta expresión de CD47 en neutrófilos correlaciona con una tendencia a menor sobrevida global. Debido a esto, CD47 podría ser un posible biomarcador pronóstico en pacientes con cáncer pulmonar. Este estudio es el primero en evaluar los niveles de expresión de CD47 y su relación con la sobrevida global de pacientes en CPCNP.

# I. ANTECEDENTES.

## 1.1 Cáncer

### 1.1.1 Definición del Cáncer.

Cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo (Organización Mundial de la Salud) [1], ocurre en casi cualquier órgano y tejido y está relacionado con una variedad de factores etiológicos como la inestabilidad genómica y el estrés proveniente del medio ambiente. Su desarrollo se da en varias etapas, durante las cuales alteraciones genéticas le confieren diferentes tipos específicos de ventajas para su crecimiento; de esta manera, posibilitando la transformación progresiva de una célula normal a una célula maligna tumoral [2]. Se han propuesto seis características o “etiquetas” del cáncer [3] con el fin de entender la diversidad de enfermedades neoplásicas, estas son: auto suficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida e invasión y metástasis (*Figura 1*). Los diferentes tipos de genotipos de células tumorales son el resultado de este conjunto de alteraciones en la fisiología celular, lo que permite la transformación maligna de una célula normal.

La principal característica de una célula tumoral es su habilidad para proliferar sostenidamente; los tejidos normales controlan cuidadosamente la producción y liberación de señales promotoras de crecimiento que regulan la entrada y progresión de una célula a través del ciclo celular, asegurando de esta forma la homeostasis y mantenimiento de la arquitectura tisular así como su función. Las células tumorales mediante la desregulación de estas señales, adquieren la capacidad de proliferar de manera sostenida mediante diferentes mecanismos: expresan ligandos de factores de crecimiento, para los cuales responden mediante la expresión de sus receptores respectivos lo que resulta en una estimulación proliferativa autocrina, envían señales para estimular células normales dentro del estroma tumoral para que estas

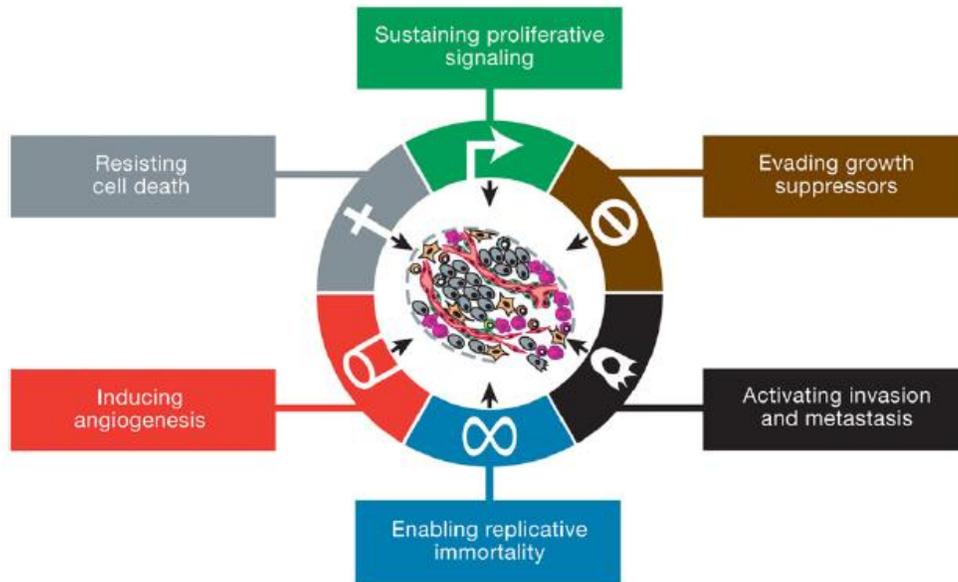
proporcionen los factores de crecimiento necesarios para las células tumorales o elevan el nivel de receptores en su superficie, con lo que se vuelven hiperresponsivas a un ligando de factor de crecimiento determinado [4] por lo que reducen su dependencia en los estímulos del microambiente tisular [3].

Además de inducir y mantener señales estimulantes de crecimiento, las células tumorales también evaden los programas que regulan negativamente la proliferación celular. Estos programas, que son capaces de bloquear la proliferación celular forzando a las células a entrar en un estado de quiescencia celular (fase  $G_0$  del ciclo celular) o a través de inducir las células a entrar en un estado post-mitótico, dependen del accionar de genes supresores de tumores. En diversos tipos tumorales, estos genes supresores de tumores se encuentran inactivos, de estos, los más estudiados son Rb y TP53. Rb transduce señales inhibitorias de crecimiento, TP53 regula señales de estrés y anomalías, de esta forma si el daño genómico o las señales promotoras de crecimiento son excesivas, o el suministro de glucosa u oxigenación no son óptimos, puede llevar al arresto en el ciclo celular [4].

La apoptosis o muerte celular programada sirve como barrera contra el desarrollo del cáncer, sin embargo, las células tumorales pueden adquirir resistencia a apoptosis. El mecanismo más común de resistencia a apoptosis es la pérdida de un regulador proapoptótico a través de una mutación en el gen supresor de tumores p53 y el incremento en la expresión de reguladores anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL) o de señales de supervivencia (Igf1/2) junto con una disminución en la expresión de factores proapoptóticos (Bax, Bim, Puma) [4].

Las células normales se dividen un cierto número de veces, después de las cuales entran en un estado no proliferativo pero viable que se denomina senescencia celular y posteriormente, cuando se les fuerza a salir de ese estado y continuar dividiéndose llegan a un estado final caracterizado por muerte celular masiva conocido como crisis; sin embargo, las células tumorales, logran evadir este proceso, lo que les permite dividirse ilimitadamente. Esto lo logran a través de la expresión mantenida de la enzima

telomerasa, encargada de agregar segmentos de repeticiones de los telómeros en los extremos del ADN telomérico, la cual en células normales se encuentra casi ausente.



**Figura 1. Capacidades o “etiquetas” del Cáncer.** Las células tumorales de la mayoría de los cánceres comparten 6 características generales: Auto suficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida e invasión y metástasis. (Imagen desde Hanahan D y R.A Weinberg, Cell. 2011. Vol 144, 646-674).

Así también la célula tumoral presenta alteraciones en la vasculatura. Durante la embriogénesis, el desarrollo de vasculatura nueva se da por 2 mecanismos: vasculogénesis, que involucra el nacimiento de nuevas células endoteliales y su ensamblaje dentro de tubos sanguíneos, o angiogénesis, que es el surgimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de existentes. Después de la morfogénesis, la vasculatura normal producida por ambos procesos, se vuelve quiescente y solamente se enciende transitoriamente durante el proceso de reparación de una herida, sin embargo, durante el desarrollo tumoral se activa el proceso angiogénico, que causa el brote de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura normal quiescente.

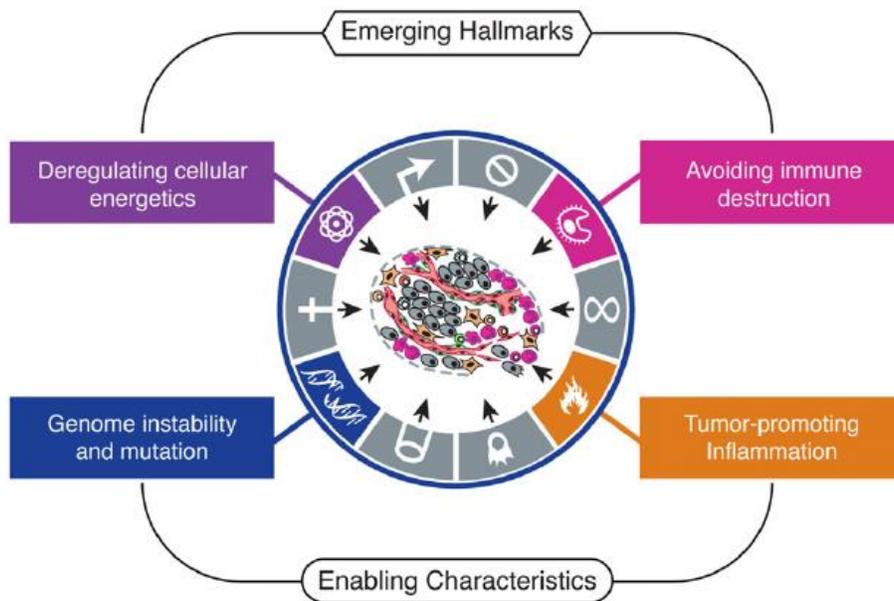
Las células tumorales que adquiere cada una de estas capacidades de forma alternada durante la progresión tumoral, adquieren posteriormente la capacidad final de invasión

y metástasis. La metástasis o el asentamiento de células tumorales en lugares distantes, causa el 90% de las muertes por cáncer. En el proceso de metástasis participan varios tipos de proteínas involucradas en la unión célula-célula y célula-matriz extracelular, entre estas proteínas están cadherinas e integrinas respectivamente. Una alteración común entre diversos tipos tumorales es la pérdida de expresión de E-cadherina, lo que provoca la pérdida del ensamblaje de las láminas epiteliales, mientras que otras proteínas como N-cadherina, que se encuentra asociada a migración celular se encuentra sobre-expresada. De manera general, el proceso de invasión celular-metástasis por parte de células tumorales es un proceso que involucra la sucesión de cambios biológicos: invasión local, la intravasación hacia vasos linfáticos y sanguíneos, el tránsito hacia sistemas linfáticos y hematógenos, escape de células tumorales de la parte luminal de los vasos sanguíneos hacia el parénquima de tejidos distantes, lo que se denomina extravasación, formación de nódulos pequeños de células tumorales, proceso conocido como micrometástasis, y finalmente, el crecimiento de lesiones micrometastásicas en tumores macroscópicos, lo que se denomina colonización.

Hanahan y Weinberg (2011) establecen que, además de las 6 “etiquetas” o características adquiridas de las células tumorales, la reprogramación del metabolismo celular y la evasión de la destrucción inmune son 2 capacidades importantes para el desarrollo tumoral y por lo tanto, deben considerarse como “etiquetas” o marcadores distintivos del cáncer (*Figura 2*).

Las células tumorales aún en presencia de oxígeno, son capaces de reprogramar su metabolismo basado en glucosa y por ende, su producción de energía, limitando su metabolismo energético a glicolisis, lo que lleva a un estado denominado “glicolisis anaeróbica”. A pesar de que este mecanismo es menos eficiente en generación de energía en forma de ATP, las células tumorales lo compensan mediante la sobrerregulación de transportadores de glucosa como GLUT1 que incrementa el importe de glucosa hacia el citoplasma.

Finalmente, a pesar de que células y tejidos son constantemente monitoreados por el sistema inmune, encargado de reconocer y eliminar las células tumorales y los tumores incipientes, las células tumorales de alguna forma evaden su detección o reconocimiento por parte del sistema inmune y de esta forma favorecen el desarrollo tumoral [4].



**Figura 2. Las nuevas “etiquetas” o capacidades adquiridas de las células tumorales.** El reprogramamiento del metabolismo celular y la evasión de la destrucción inmune por parte de las células tumorales son 2 capacidades muy importantes para las células tumorales. (Imagen desde Hanahan D y R.A Weinberg, Cell. 2011. Vol 144, 646-674).

### 1.1.2 Epidemiología del Cáncer: Una Enfermedad Global.

El cáncer es un problema de salud pública mundial por el número de muertes, por la alteración en el estilo de vida de los pacientes y por los costos de la atención médica que demanda [5, 6]. Esta enfermedad es la segunda causa principal de muerte a nivel global, tan solo detrás de las enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, los fallecimientos por estas últimas tienden a disminuir, mientras que las muertes por cáncer están aumentando.

En el año 2008 se registraron 12.7 millones de nuevos casos y 7.6 millones de muertes por cáncer en el mundo [7, 8] y se estima que en el 2030 habrá 20.3 millones de nuevos casos y 13.2 millones de muertes aproximadamente [9]. En 2008, el 56% de los nuevos casos y el 64% de las muertes por cáncer en el mundo ocurrieron en países en desarrollo [8].

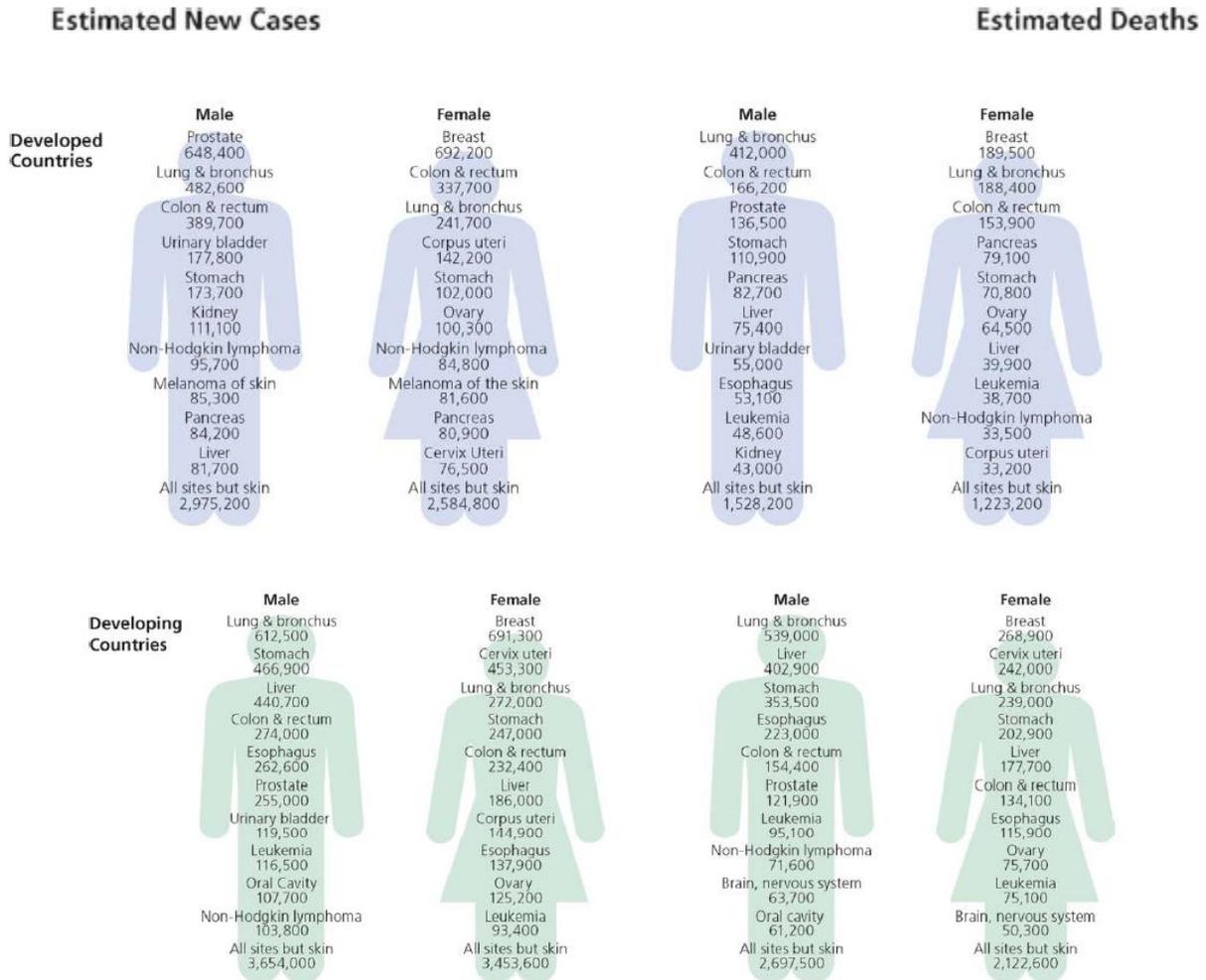
El incremento en la incidencia del cáncer en países en desarrollo es debido a cambios demográficos como: el incremento y envejecimiento de las poblaciones, y el incremento de los principales factores de riesgo (fumar, cambios en los patrones de dieta e inactividad física). El crecimiento de la población y el incremento en el envejecimiento poblacional son los principales contribuyentes al incremento de casos nuevos de cáncer; la población mundial en 2008 era de 6.7 mil millones de personas, para el 2030 se espera crezca hasta 8.3 mil millones y para 2050 llegue hasta 8.9 mil millones [10]. De la misma forma, el tabaco, la obesidad, la inactividad física y la desnutrición son también causas de diferentes tipos de cáncer. Por ejemplo, al respecto de la obesidad, la OMS estima que el número de adultos con sobrepeso en 2005 era de aproximadamente de 1.6 mil millones, de los cuales 300 millones eran obesos, para el 2015 se prevé el incremento en el número de personas con sobrepeso llegará a 2.3 mil millones.

El cáncer es además actualmente, la causa principal de mortalidad en muchos países desarrollados pero se piensa se convertirá en la principal causa de mortalidad en las siguientes décadas en todas las regiones del mundo [9, 11]. En países en desarrollo, los tipos de cáncer debidos a enfermedades infecciosas como el cáncer de hígado y el cáncer cervical, tienen en la actualidad alta incidencia; en el futuro, también se incrementarán los otros tipos de cáncer debidos principalmente al estilo de dieta occidental, el uso de tabaco y alcohol junto con un decremento general en la actividad física [12].

Además, en países desarrollados se registran reducciones en la incidencia de cáncer; por el contrario, en países en desarrollo hay un aumento general en la incidencia de

cáncer. Por ejemplo, en Estados Unidos en el 2012, al menos 13 tipos de cáncer registraron un decremento de 0.6% de nuevos casos [13]. De la misma manera, así como en países desarrollados el fumar rápidamente declina, en países en desarrollo en Sudamérica, Asia y África la tasa de fumadores está aumentando [7].

La incidencia de nuevos casos de cáncer y la tasa de mortalidad difieren entre regiones. Por ejemplo, los cánceres de mama, próstata, pulmón y otros se presentan mayormente en países desarrollados de regiones como Europa del Norte, Australia y Norteamérica; en el caso de cáncer de estómago, las tasas de incidencia más altas se dan en Este de Asia, Europa del Este y Sudamérica (*Figura 3*). También se han observado diferencias en tasas de incidencia y mortalidad entre grupos étnicos y razas; por ejemplo, los hombres afroamericanos tienen una tasa de incidencia de cáncer global 15% mayor y una tasa de mortalidad 33% mayor que los hombres de raza blanca. Además de esto, hombres y mujeres afroamericanos tienen un índice de sobrevida menor comparado con las personas blancas [13].

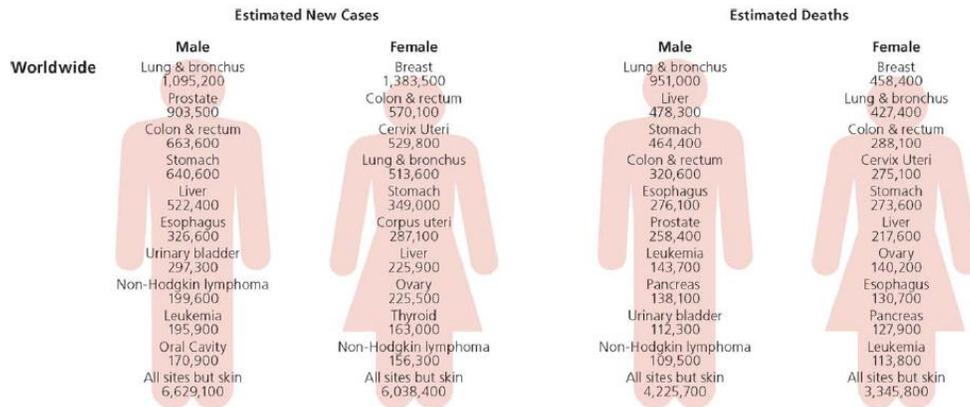


**Figura 3. Casos nuevos y muertes por cáncer en países desarrollados y países en desarrollo (Imagen desde Jemal., et al. CA CANCER J CLIN 2011; 61:69-90)**

Globalmente, el cáncer de pulmón fue el más comúnmente diagnosticado y fue la principal causa de muerte por cáncer en hombres en el 2008 con un total de 1.6 millones de casos nuevos y 1.4 millones de muertes. El cáncer de próstata fue el segundo tipo de cáncer más comúnmente diagnosticado y fue la sexta causa de mortalidad en 2008, otros tipos de cáncer comúnmente diagnosticados fueron: cáncer colorrectal, cáncer de estómago, cáncer de hígado, etc.

Para las mujeres, el cáncer de mama fue el cáncer más comúnmente diagnosticado y la principal causa de muerte por cáncer en el mundo con 1.38 millones de nuevos casos y 458,400 muertes registradas. El cáncer colorrectal fue el segundo tipo de

cáncer más comúnmente diagnosticado y fue la tercera causa de mortalidad en 2008, otros tipos de cáncer con tasas de incidencia altas son: cáncer cervicouterino, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, etc (*Figura 4*).



**Figura 4. Casos nuevos de cáncer y muertes por cáncer en el Mundo** (Imagen desde Jemal., et al. CA CANCER J CLIN 2011; 61:69-90).

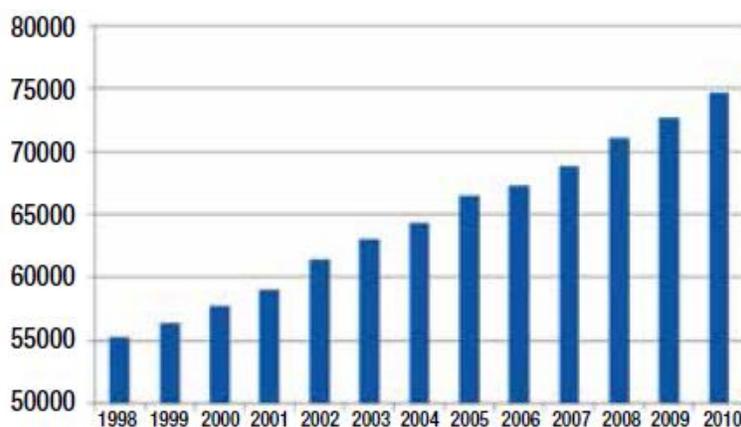
En México mueren diariamente decenas de personas a causa del cáncer y muchas más reciben la noticia de que padecen esta enfermedad. Datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) del año 2007 ubicaron a los tumores malignos como la segunda causa de muerte en el país por debajo de la diabetes mellitus y por encima de las enfermedades isquémicas del corazón. En las mujeres de entre 30 a 59 años de edad, el cáncer es la primera causa de muerte, por otra parte, en hombres de 30 años y mayores, los tumores malignos son la tercera causa de muerte [14].

El número de muertes por cáncer en México en el 2010 fue de 74,685, lo que corresponde a un incremento del 35% comparado con lo reportado en el año 1998, donde la mortalidad total fue de 55,236 [14].

Cada año se diagnostican en el país cerca de 100 mil nuevos casos, de los cuales aproximadamente dos tercios fallecen debido a una detección tardía o al fracaso del tratamiento [14]. De hecho, a pesar de que algunos tipos de cáncer, como el cáncer de mama contienen criterios más rigurosos para la prevención, diagnóstico, tratamiento,

control y vigilancia de la enfermedad, datos disponibles sugieren que solo entre 5 y 10% de los casos en México son detectados en las fases iniciales de la enfermedad en comparación con 50% de los casos detectados en fases iniciales en Estados Unidos [16].

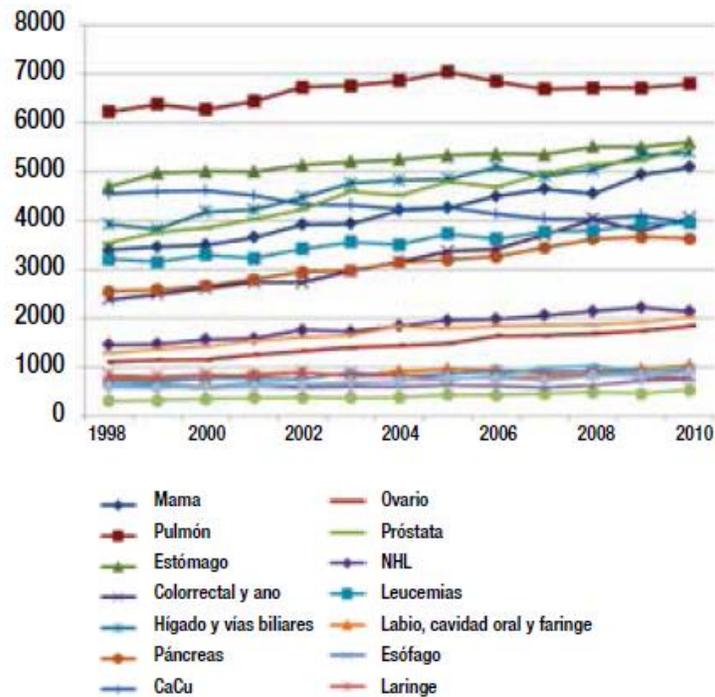
De manera general, la tasa de mortalidad por cáncer en México tiene un incremento promedio de 2.91% anual (*Figura 5*), sin embargo, no todos los tipos de cáncer tienen incrementos en su tasa de mortalidad, por ejemplo, el cáncer cervicouterino presenta una disminución en la tasa de mortalidad de 9.12 a 6.8 muertes por cada 100,000 mujeres entre los años 2000 y 2010; en otro caso, el cáncer de mama y el cáncer de próstata presentan importantes incrementos en la tasa de mortalidad (*Figura 6*), para el caso del cáncer de mama, el índice de mortalidad entre periodo 2000-2010 aumentó de 7 a 9.1 por cada 100,000 mujeres, mientras que, para el cáncer de próstata hay un incremento de 8.1 a 10 por cada 100,000 hombres en el mismo periodo [14].



**Figura 5. Mortalidad por cáncer en México 1998-2010.** La Mortalidad por cáncer en México tiene un incremento del 35% con respecto a lo reportado en 1998, incrementándose anualmente 2.91%. (*Imagen desde Aldaco-Sarvide., et al GAMO 2012; Vol 11, No 6 371-379.*)

Por género, el 51% de las muertes por cáncer corresponde a mujeres [14, 17] mientras que el restante 49% corresponde a hombres. Esta distribución por género de la tasa de mortalidad en México, se vio por primera vez en el reporte histopatológico de neoplasias malignas (2006) por parte del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) y se ha mantenido hasta el 2010, contrastando con lo

reportado en el año 2000, donde el 51.8% de las muertes por cáncer correspondían a hombres y el 48.2% correspondían a mujeres. Para las mujeres en el año 2010, las principales causas de muerte por cáncer fueron: cáncer de mama (13.3%), cáncer cervicouterino (10.4%) e hígado y vías biliares (7.3%); para los hombres fueron: cáncer de próstata (15%), cáncer de pulmón (12%) y cáncer de estómago (8.1%) principalmente (*Tabla 1*).



**Figura 6. Mortalidad por tipo de cáncer en México 1998-2010.** La única disminución notable de mortalidad por cáncer se observa en pacientes con diagnóstico de cáncer cervicouterino (CaCu) con una reducción del 13%. (Imagen desde Aldaco-Sarvide., et al GAMO 2012; Vol 11, No 6 371-379).

**Tabla 1. Principales causas de muerte por cáncer en hombres y mujeres en el año 2010 en México.** (Imagen desde Aldaco-Sarvide., et al GAMO 2012; Vol 11, No 6 371-379).

Hombres		Mujeres	
Tipo cáncer	Porcentaje (%)	Tipo cáncer	Porcentaje (%)
Próstata	15	Mama	13.3
Pulmón	12	CaCu	10.4
Estómago	8.1	Hígado y VB	7.3
Hígado y VB	7	Estómago	6.8
Colorrectal	5.8	Pulmón	5.1

### 1.1.3 Participación del Sistema Inmune en Cáncer.

El sistema inmune es capaz de reconocer a un organismo patógeno de otro y puede discriminar entre moléculas “no propias” de células y proteínas propias del organismo. El sistema inmune tiene 2 componentes: un componente poco específico o sistema inmune innato que constituye la primera línea de defensa contra patógenos y la conforman células dendríticas, NK, NK T, macrófagos, granulocitos y mastocitos y un componente altamente específico o sistema inmune adaptativo consiste de células T CD8 citotóxicas y células T CD4 cooperadoras.

#### 1.1.3.1 Componentes celulares del Sistema Inmune Innato.

##### ***Células Dendríticas.***

Las células dendríticas (DCs) son las células presentadoras de antígeno más importantes, se dividen en: células dendríticas mieloides y células dendríticas linfoides o plasmacitoides. Las células dendríticas pueden estimular diferentes respuestas inflamatorias. Diferencian células T CD4 hacia diferentes tipos: Th1, Th2, Th17, Th21 y T reguladoras [18]. Brevemente, la liberación de IL-12 por DCs promueve respuesta tipo Th1 que induce la estimulación de células T CD8 citotóxicas, la unión de OX40 por DCs induce respuesta tipo Th2 que promueve activación de linfocitos B, secreción de

TGF $\beta$  induce células T reguladoras y la secreción de TGF $\beta$ , IL-1 e IL-6 induce células tipo Th17 causantes de reacciones autoinmunes [19].

Durante el desarrollo tumoral, la célula dendrítica no logra la maduración hacia un fenotipo que genere respuestas inmunes fuertes, debido a que ingiere el antígeno en un microambiente no inflamatorio, provocado por secreción de IL-10 y VEGF por células tumorales, esto lleva ulteriormente a la tolerancia inmunológica [20].

### ***Células NK.***

Las células NK son las células responsables de eliminar células tumorales que no expresan el complejo principal de histocompatibilidad por medio de la liberación de exosomas que contienen pequeñas proteínas citotóxicas como perforina y granzima [18, 21, 22]. Estas células detectan a las primeras células transformadas [23] por medio de la identificación de cambios como: el nivel reducido de expresión del complejo principal de histocompatibilidad clase I, y/o de las moléculas MICA y MICB a través de sus receptores activantes (como NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, etc) e inhibitorios (KIRs y tipo lectina NKG2A-CD94 principalmente) [17, 20, 23] (*Figura 7*). Células NK inducen apoptosis en células tumorales a través de ligandos de receptor de muerte como FasL y TRAIL [18, 21, 22, 24]. Células NK infiltran varios tipos tumorales en diferentes tejidos como piel, pulmón, riñón e intestino [25] donde pueden producir factores que apoyan la angiogénesis tumoral como VEGF y PDGF [22].

### ***Células NKT***

Las células NK T son células T CD3+ que también expresan marcadores de células NK y reconocen ligandos glicolipídicos presentados por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad como CD1d. Se les ha reportado involucrados en la respuesta inmune contra sarcomas inducidos por químicos y también favorecen a los tumores a través de la regulación negativa de la vigilancia inmune [25].

### ***Macrófagos.***

Los macrófagos pueden ser activados por citocinas y/o niveles diferenciales de oxígeno (hipoxia, normoxia). Actualmente son reconocidos 2 tipos diferentes de macrófagos: los

macrófagos activados clásicamente (macrófagos M1) y los macrófagos activados alternativamente (macrófagos M2).

Los macrófagos activados clásicamente o M1 se activan en respuesta a IFN $\gamma$  solo o junto con LPS y con citocinas como TNF $\alpha$ . Secretan altos niveles de la enzima sintasa de óxido nítrico (iNOS, NOS2) y citocinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12 e IL-23 (21, 24, 26-28) las cuales ejercen actividad citotóxica en células tumorales. Además secretan quimiocinas proinflamatorias como CCL5, CCL8, CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL12 y CXCL15 que promueven el reclutamiento de linfocitos T CD8 citotóxicos y células NK, la afluencia de células dendríticas, la generación de células T CD4, la migración y diferenciación de monocitos hacia un fenotipo proinflamatorio y tienen una mayor capacidad de presentación de antígenos [26-28]. Por otra parte, los macrófagos activados alternativamente o M2 se activan en respuesta a citocinas de tipo Th2 como IL-4, IL-10, IL-13 y TGF $\beta$  y secretan citocinas anti-inflamatorias como IL-1RA, IL-10, TGF $\beta$  y Arginasa1 [21, 24, 28]. Promueven el crecimiento tumoral al proveer de un microambiente inmunosupresor, en el que favorecen la inducción de células T reguladoras, presentan baja capacidad de presentación de antígenos, ausencia de actividad citotóxica y una alta expresión de Arginasa-1 que bloquea a iNOS [26, 28].

Los macrófagos asociados a tumor (TAMs) son de fenotipo M2 y dentro del tumor contribuyen a la inflamación crónica que permite un ambiente inmunosupresor que beneficia la angiogénesis, crecimiento y metástasis tumoral. Su infiltrado es un factor común en diversos tipos de tumores malignos como linfomas, cáncer pulmonar de células no pequeñas y carcinoma hepatocelular y es un factor independiente de pronóstico adverso para el paciente [26].

### ***Mastocitos.***

Los mastocitos están entre las primeras células en infiltrar el microambiente tumoral. Una vez infiltrados en el tumor, los mastocitos pueden promover la angiogénesis y la expansión tumoral; pueden inhibir el desarrollo de respuestas inmunes antitumorales mediante la inhibición de la acumulación de linfocitos T en el sitio tumoral y la inhibición

de generación de linfocitos T CD8 y células tipo Th1 mediado por células dendríticas [29].

La alta densidad de mastocitos en muchos tipos de cáncer se correlaciona con un pronóstico adverso para el paciente. Sin embargo, en tumores de mama, su infiltrado en el estroma tumoral correlaciona con una mejor supervivencia general [29].

### **1.1.3.2 Neutrófilos en Cáncer.**

Los neutrófilos juegan un papel ya bien reconocido en la defensa del organismo hospedero, extravasándose y entrando a los tejidos, donde fagocitan y matan a organismos foráneos invasores como bacterias y hongos.

Los neutrófilos pueden ser divididos en 2 grupos con base en su respuesta tumoral: los neutrófilos N1 que presentan un fenotipo anti-tumoral polarizado por  $IFN\beta$  y los neutrófilos N2 con fenotipo pro-tumoral inducidos por  $TGF\beta$  [30].

Una vez infiltrados en el tumor, los neutrófilos asociados a tumor (TAN) le confieren diferentes “ventajas” a las células tumorales. Primero, los neutrófilos que se encuentran en el sitio tumoral forman un bucle autocrino de señalización que permite el reclutamiento de más neutrófilos hacia el sitio tumoral, a través de quimioatrayentes como las quimiocinas CXCL1 y CXCL8, citocinas como  $TNF\alpha$  e  $IFN\gamma$  y moléculas de adhesión celular como CD11b [31].

Además, los neutrófilos estimulan la angiogénesis tumoral a través de 2 tipos de mecanismos: mecanismos directos e indirectos. Entre los mecanismos directos están: la expresión y/o producción de citocinas ( $IL-1\alpha/\beta$ , IL-4, 6), quimiocinas (CXCL1, 2, 5, 10, CCL2, 4, 17) y factores estimulantes de la angiogénesis (secreción de VEGF, BV8, etc). Los mecanismos indirectos son: secreción de metaloproteinasa-9 (MMP9), la cual libera y activa a VEGF que se encuentra en forma inactiva en matriz extracelular [30-32], liberación de citocinas que estimulan a células tumorales a producir factores angiogénicos y secreción de oncostatina M que incrementa producción de VEGF [30].

Promueven el crecimiento tumoral a través de la secreción de quimiocinas CXCL1, CXCL8, CCL3 y de elastasa, facilitan la invasión de las células tumorales por medio de elastasa, catepsina G, proteinasa 3, MMP8 y MMP9 y promueven la metástasis, seleccionando nichos premetastásicos para el posterior arribo de células tumorales [31]. También contribuyen a la inhibición de la respuesta inmune y a la progresión tumoral, por ejemplo, inhibiendo las funciones efectoras de linfocitos T por medio de la expresión de arginasa1, la cual degrada arginina, necesaria para la actividad de células T [31, 32].

Los neutrófilos de fenotipo antitumoral (N1) son capaces de lisar células tumorales a través de especies reactivas de oxígeno (ROS). Promueven el reclutamiento y activación de células T mediante quimiocinas atrayentes de células T como CCL3, CXCL9 y CXCL10. Activan a células dendríticas por contacto célula-célula e inhiben la angiogénesis por medio de angiostatina (inhibe la proliferación endotelial inducida por VEGF) y elastasa (escinde a VEGF y la inactiva) [30, 31].

Finalmente, en pacientes con cáncer, hay un nivel elevado de neutrofilia, la cual en diversos tipos de cáncer como melanoma metastásico y carcinoma renal, se correlaciona con un pronóstico adverso para el paciente.

### **1.1.3.3 Componentes del Sistema Inmune Adaptativo.**

#### ***Linfocitos T CD4.***

La respuesta celular del sistema inmune adaptativo requiere del reconocimiento de antígenos y se compone de células T CD8 y T CD4. Los linfocitos T CD4 o linfocitos cooperadores pueden presentar varios fenotipos: tipo Th1, Th2 y Th17. Los linfocitos T CD4 se diferencian hacia tipo Th1 al ser expuestos a IL-12, como resultado secretan citocinas como IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ , y apoyan las funciones citotóxicas de linfocitos T CD8 y células NK, incrementan la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I y promueven la proliferación celular de linfocitos T CD8+ [21, 26]. Los linfocitos T CD4 tipo Th2 son diferenciados al ser expuestos a IL-4,

secretan citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13 con lo que inducen la anergia de linfocitos T, inhiben la citotoxicidad mediada por linfocitos T CD8 y fomentan la respuesta humoral dirigida por linfocitos B.

Los linfocitos T CD4 al ser expuestos a TGF $\beta$  e IL-6 son diferenciados hacia fenotipo tipo Th17. Estos linfocitos se caracterizan por secretar IL-17, IL-21, IL-22 e IL-23R. Se ha reportado que son más eficientes en la erradicación de tumores sin embargo, tienen efectos protumorales al promover la vascularización tumoral a través de la liberación de factores proangiogénicos como VEGF, PGE2 e IL-8 entre otros [24].

### ***Linfocitos T citotóxicos CD8.***

Los linfocitos T citotóxicos reconocen antígenos unidos al complejo principal de histocompatibilidad clase I presentados en la superficie de células presentadoras de antígeno profesionales (por ejemplo, células dendríticas) y sirve como señal activante, sin embargo, la estimulación vía TCR no puede activar a los linfocitos T por lo que se necesita de una señal coestimuladora, la cual se da por interacción de CD28 en superficie celular de linfocitos T y CD80/CD86 en superficie celular de células presentadoras de antígeno. La activación de los linfocitos T lleva a la proliferación y diferenciación de linfocitos T “ingenuos” en linfocitos T citotóxicos efectores. Una vez activados producen citocinas como IFN $\gamma$  y moléculas efectoras como perforina y granzima  $\beta$  regulando la actividad citolítica del linfocito T en células objetivo. En muchos tipos de cáncer como cáncer de colon, mama, pulmón, ovario y esófago entre otros, el alto infiltrado de linfocitos T CD4 y CD8 están correlacionados con un factor pronóstico favorable para el paciente [33, 34].

### ***Células Supresoras de Origen Mieloide (MDSCs) y Células T reguladoras (Tregs).***

Las células supresoras de origen mieloide son una población celular heterogénea definida por su origen mieloide y por su estado no diferenciado, se compone de progenitores de células mieloides y precursores de células dendríticas, monocitos, macrófagos y granulocitos [20, 35]. Las células supresoras de origen mieloide (MDSCs)

se pueden dividir en 2 grupos fenotípicamente: la fracción celular de origen monocítico (CD11b+ CD14+ HLA-DR<sup>-/lo</sup>) y de origen granulocítico (CD11b+ CD14- CD15+) [36].

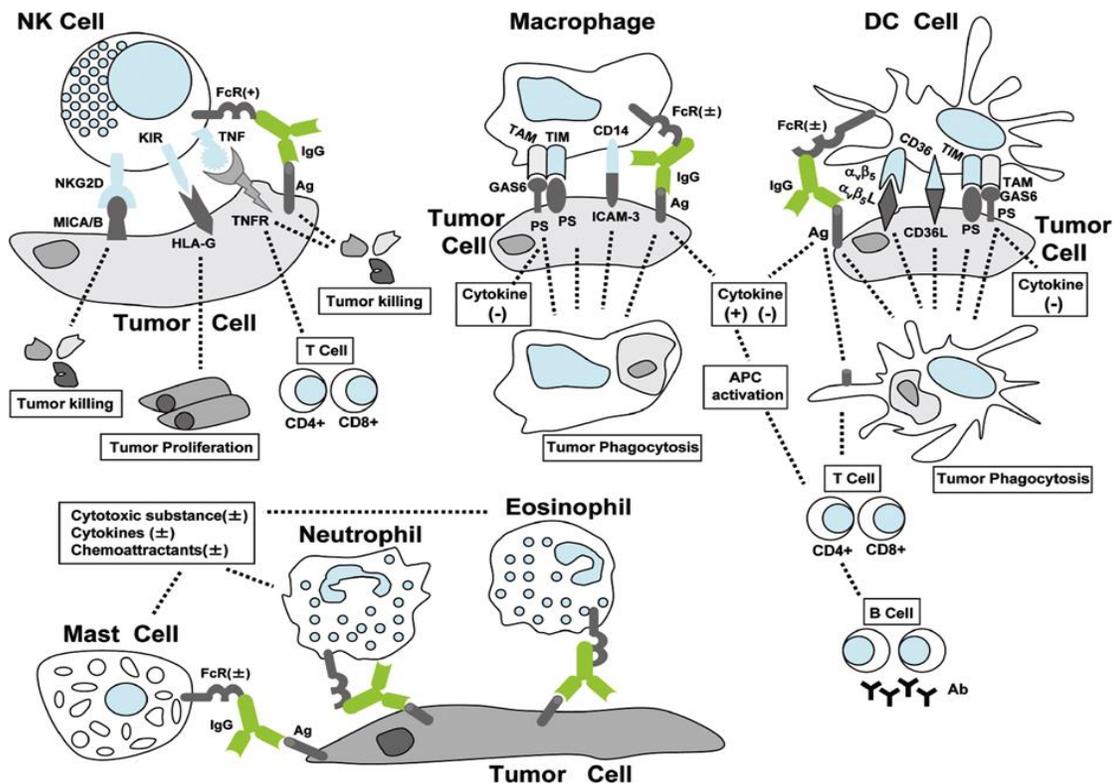
Promueven la progresión tumoral de diversas formas; inducen la activación de linfocitos T defectuosos, facilitan la neoangiogénesis mediante producción de metaloproteasas diversas y VEGF, inhiben la lisis celular mediada por células NK, permiten la diferenciación de los macrófagos intratumorales hacia fenotipo M2 protumoral e inhiben las funciones efectoras de linfocitos T [35].

De hecho, las principales funciones inmunosupresoras de las MDSCs tiene que ver con la inhibición de las funciones efectoras de los linfocitos T [36]. Esto lo hacen mediante diversos mecanismos: Inducen la apoptosis en linfocitos T a través de la producción de óxido nítrico (NO) y de especies reactivas de oxígeno (ROS), bloquean la migración de linfocitos T así como su acción efectora sobre células tumorales a través de la nitrosilación de su receptor (TCR) mediante la producción de peroxinitritos, estimulan la anergía de los linfocitos T por medio de TGF- $\beta$ , bloquean la proliferación de linfocitos T, provocan una reducción en producción de citocinas y permiten la evasión tumoral de las funciones efectoras de linfocitos T por medio del agotamiento de L-arginina y triptofano mediado por las enzimas Arginasa1 (Arg1) e indoleamina 2,3 dioxigenasa (IDO). También, reducen la migración de linfocitos T a ganglios linfáticos por medio de la reducción de expresión de L-selectina e inhabilitan la transmisión de señales activantes en su membrana plasmática por parte del linfocito T por reducción en la expresión de la cadena zeta, entre otros efectos [35, 36].

Las células T reguladoras se dividen en dos subgrupos: las células T reguladoras naturales (nTreg) con fenotipo CD4+ CD25+ Foxp3+ y las inducibles o adaptativas (iTregs), formadas por células Tr1 las cuales carecen de expresión de Foxp3 y células Th3 que no expresan Foxp3 y producen TGF $\beta$  [37]. Las células T reguladoras (Tregs) utilizan diferentes mecanismos para inhibir la respuesta inmune antitumoral; secretan mediadores inmunosupresores como IL-10, TGF $\beta$  e IL-35, inducen apoptosis en linfocitos T efectoras por liberación de granzima A y B o promueven la disrupción metabólica por falta de IL-2. También, ejercen mecanismos de inmunosupresión mediante contacto célula-célula por ejemplo, inhiben la maduración de células

dendríticas (DCs) por interacción de CTLA4 con CD80/CD86 en DCs lo que inhibe la activación de respuestas inmune antitumorales. Otras moléculas que contribuyen a la actividad inmunosupresora son LAG3, CD39, neuropilina1 y galectina1 [38].

Las Tregs son atraídas al sitio tumoral por medio de diferentes mecanismos: células tumorales secretan ligandos de quimiocinas para los que las células Tregs expresan sus respectivos receptores (CCL22/CXCR4, CCR4/CXCR4, CCL5/CCR5), las células tumorales generan células Tregs a través de la secreción de factores solubles al medio (GM-CSF, VEGF) que reclutan o expanden población celular de MDSCs, las cuales posteriormente secretan citocinas que inducen células Tregs. Las propias células Tregs pueden convertir células T CD4+ “ingenuas” en células Tregs por medio de la secreción de IL-10 y VEGF. También pueden Tregs mantener a células dendríticas en estado inmaduro por medio de interacción CTLA4 con CD80/CD86 en células dendríticas, con lo que las iDCs inducen iTregs [37, 38]. El infiltrado de células Tregs en el tumor se asocia a un pronóstico adverso para el paciente con cáncer de ovario, melanoma, cáncer de mama, linfoma de Hodgkin y glioblastoma, mientras que para el carcinoma colorectal y el de cabeza y cuello, es asociado con un pronóstico favorable.



**Figura 7. Reconocimiento de células tumorales por parte del Sistema Inmune Innato.** Células NK por medio de sus receptores NKG2D reconocen a las proteínas A/B relacionadas con el Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) Clase I en células tumorales para mediar la muerte de células tumorales, receptores inhibidores como receptores KIRs detectan moléculas no clásicas de MHC clase I HLA-G para impedir la citotoxicidad de células NK. La unión de ligandos de la familia TNF en células NK con receptores TNF en células tumorales provoca la apoptosis de células tumorales. Macrófagos fagocitan células tumorales apoptóticas por medio de CD14, mucina de células T (TIM), TAM y receptores FcR a través de su interacción con ICAM-3, fosfatidilserina (PS), PS/Gas6; la función de Gas6 es hacer "puente" entre PS y TAM. Células Dendríticas (DCs) pueden fagocitar a células apoptóticas tumorales a través de  $\alpha\beta_5$ , CD36, FcR, TIM y receptores TAM. FcR activantes en DCs permiten la presentación de antígenos tumorales. FcRs activantes e inhibidores también son expresados en neutrófilos, eosinófilos y mastocitos, reconocen a tumores que llevan anticuerpos para promover o inhibir secreción de citocinas y quimiocinas de células del sistema inmune innato. (Imagen desde Liu Y y G. Zeng, *J Immunother* 2012, Vol 35, No 4 299-308).

#### 1.1.4 Mecanismos de Evasión Tumoral.

El sistema inmune mediante diferentes mecanismos previene la formación de tumores: protege al organismo hospedero de tumores inducidos por virus eliminando infecciones virales, elimina a patógenos y resuelve la inflamación prontamente para prevenir el establecimiento de un ambiente pro-inflamatorio que conlleve a la tumorigénesis. También identifica y elimina células tumorales con base en la expresión de antígenos específicos tumorales. Al tercer proceso se le conoce como vigilancia inmune [39].

La eliminación de las células tumorales por parte del sistema inmunológico requiere del accionar del sistema inmune innato y del sistema inmune adaptativo, sin embargo, en muchos casos, a pesar del desarrollo de una respuesta antitumoral por parte del sistema inmune, las células tumorales aún progresan [40]. Este fenómeno dio lugar al establecimiento de la teoría de la inmunoedición del cáncer.

La teoría de la Inmunoeedición del cáncer se refiere a la interacción entre el sistema inmune y células tumorales como un proceso de 3 fases: la fase de eliminación, fase de equilibrio y fase de escape tumoral [39-42].

La fase de eliminación involucra las respuestas inmune innata y adaptativa y tiene 4 fases: el reconocimiento de células tumorales por células del sistema inmune innato y su eliminación limitada, la maduración y migración de células dendríticas y la presentación cruzada de antígenos hacia linfocitos T “ingenuos”, generación de linfocitos T antígeno específicos, y la llegada de linfocitos T antígeno específicos hacia el sitio tumoral.

Las células NK, NKT y  $\gamma\delta$  T son activadas por citocinas inflamatorias liberadas por las células tumorales y son reclutadas en sitio tumoral donde producen citocinas pro-inflamatorias como IL-12 e IFN $\gamma$ , y matan células tumorales a través de perforina, FasL y TRAIL, lo que libera antígenos tumorales, y lleva a la respuesta inmune adaptativa. Las células NK promueven la maduración de células dendríticas y su migración hacia ganglios linfáticos cercanos al tumor, aumentan la presentación de antígenos hacia linfocitos T “ingenuos”, los cuales posteriormente ya activados, ejercen sus funciones efectoras matando células tumorales por medio de producción de IFN $\gamma$  [42].

Sin embargo, a pesar de esta respuesta antitumoral, variantes de células tumorales no son eliminadas y dan origen a tumores, entrando a la fase de equilibrio. En esta fase, el sistema inmune controla el crecimiento tumoral a través de la eliminación constante de células tumorales. Esto genera células con reducida inmunogenicidad, que las vuelven resistentes a las células inmune efectoras [42, 43].

La fase de equilibrio de la teoría de la Inmunoeedición del tumor representa un balance dinámico entre células tumorales y el sistema inmune, mismo que puede durar mucho

tiempo, debido a que células tumorales “sobrevivientes” entran en estado de dormancia y pueden durar así más de 10 o 20 años. Hay varios mecanismos de dormancia de células tumorales: dormancia intrínseca o celular que involucra el arresto en la fase G0-G1 del ciclo celular y la dormancia extrínseca o angiogénica, que es cuando la proliferación celular del cáncer es contrabalanceada por la apoptosis y debido a la poca vascularización, no crece [43].

Después de roto el equilibrio entre células tumorales y el sistema inmune, células tumorales prosiguen a la fase de escape, donde la interacción entre células tumorales que se encuentran bajo modificaciones genéticas y bajo constante presión inmunológica, evaden la respuesta inmune, circulan por el torrente sanguíneo y hacen metástasis.

Las células tumorales pueden evadir la respuesta inmune ya sea por falta de reconocimiento inmunológico o por inducción de tolerancia inmunológica. Las células tumorales pueden adquirir defectos en el procesamiento de antígenos y en las vías de presentación y evadir con esto, el reconocimiento inmune (*Figura 8 inciso a*), por ejemplo, la pérdida de TAP1, de moléculas del complejo MHC clase I, LMP2, LMP7 y el desarrollo de insensibilidad a IFN $\gamma$  por parte de células tumorales previene su eliminación mediada por las células T, resultando en la progresión tumoral [40, 42].

#### **1.1.4.1 Evasión de la Eliminación Celular por parte de las Células Tumorales.**

Aún cuando no pueden evadir su detección por parte de células del sistema inmune, pueden evadir su eliminación al sobreexpresar moléculas anti-apoptóticas como FLIP y Bcl-xL, o pueden evitar su lisis expresando receptores de muerte inactivos como el receptor TRAIL, DR5 y Fas.

De forma más activa, pueden expresar en su superficie, ligandos inhibitorios que inhiben las acciones citotóxicas de las células inmunes como la expresión de PDL1 (*Figura 9, inciso f*), HLA-G y HLA-E, estas últimas pueden inducir tolerancia en las células presentadoras de antígeno e inhibir la muerte mediada por células NK [39].

Recientemente se ha descubierto que, células tumorales pueden evadir su eliminación celular a través de la inhibición del proceso celular de fagocitosis. La fagocitosis es un proceso por el cual, células fagocitos rodean con su membrana plasmática otras células u partículas y las introducen hacia el interior celular.

Células apoptóticas necesitan ser eliminadas, ya que las consecuencias de una eliminación celular ineficiente es el proceso de necrosis secundaria, que resulta en un proceso inflamatorio no resuelto, condiciones autoinmunes y anormalidades de desarrollo. Para ello, el sistema inmune está “capacitado” para distinguir entre “lo propio alterado” (células apoptóticas) de “lo propio” (células sanas del organismo) y de igual forma, entre “lo no propio” (partículas patógenas) de “lo propio” (células normales”) a través de un número limitado de moléculas de reconocimiento de patrones (PRMs) [44].

Las células apoptóticas son eliminadas por el sistema inmune a través de un proceso denominado eliminación celular programada [45] consistente de 4 pasos: la liberación de señales “encuéntrame” por parte de células apoptóticas para atraer a células fagocitos [46], la exposición de señales “cómeme” en la superficie celular de la célula apoptótica, procesamiento de célula apoptótica por parte del fagocito y la liberación de citocinas anti-inflamatorias [47].

De esta forma, células apoptóticas liberan señales “encuéntrame”, exponen señales “cómeme” y pierden la señalización “no me comas”. Esta última, es expuesta por células sanas en la superficie membranal que activamente inhiben la fagocitosis; entre las moléculas que funcionan como señales “no me comas” están: unión homófila CD31/CD31 y la unión CD47/SIRP $\alpha$ , entre otros.

Mientras la interacción homófila de CD31 puede discriminar entre células viables y células apoptóticas mediante señales de “despego” dependientes de temperatura por parte de células viables [48,49], la unión de CD47 con SIRP $\alpha$  transmite una señalización “no me comas” que inhibe físicamente la fagocitosis celular [50-54]. Las células tumorales sobreexpresan CD47 de manera constitutiva como un mecanismo de evasión de la fagocitosis.

#### 1.1.4.2 Generación de Microambiente Inmunosupresor.

Células tumorales generan microambiente inmunosupresor primero al inhibir la migración de células dendríticas hacia ganglios linfáticos (*Figura 8, inciso b*), esto lo logran afectando la expresión de CCR7 en la superficie celular de células dendríticas. También a través de producción de VEGF se previene la maduración de células dendríticas mediante la inhibición del factor nuclear  $\kappa\beta$  (NF $\kappa$  $\beta$ ) en células madre hematopoiéticas [39].

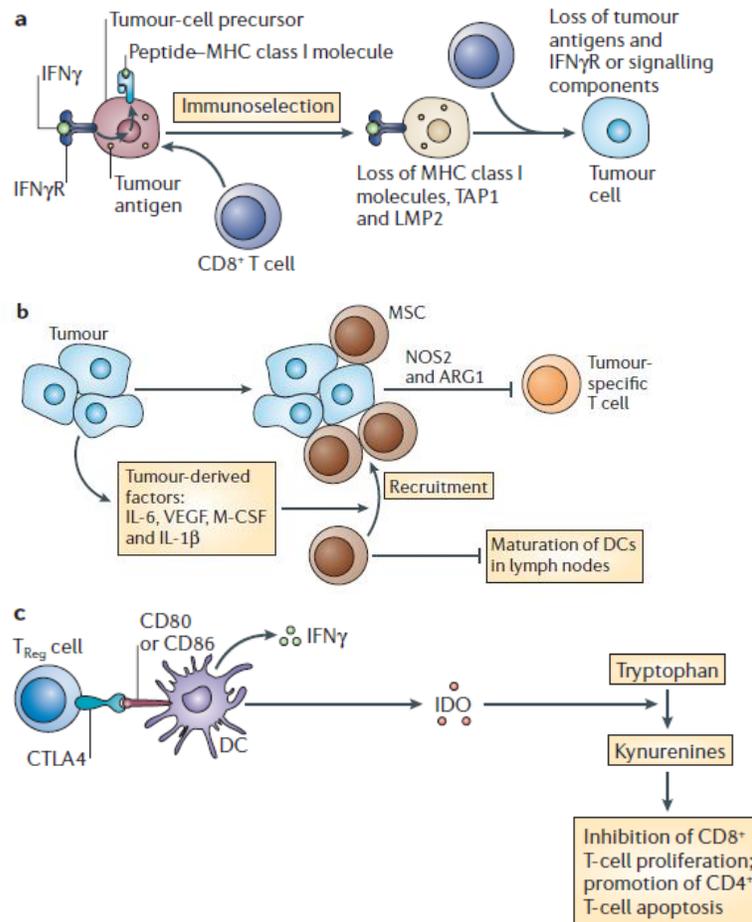
La secreción de TGF $\beta$  por parte de células tumorales lleva a inhibición de activación de células dendríticas así como inhibición de la función de células T y NK (*Figura 9, inciso e*). Dos mecanismos de inhibición inmune incluyen el agotamiento de aminoácidos lo que debilita a células T y la citotoxicidad metabólica, donde los productos metabólicos de la degradación del triptófano inhibe la función de células T (*Figura 8, inciso c*) [39,55].

La producción de TGF $\beta$  por parte de las células tumorales puede convertir células T efectoras en células T reguladoras (*Figura 9 inciso d*) También la producción de GM-CSF, IL-1B, VEGF y PGE2 lleva a la expansión de células mieloides supresoras inmaduras (MDSC) y su acumulación en la masa tumoral [39, 55].

Estas pueden inhibir función de linfocitos (*Figura 10, inciso g*) por una variedad de mecanismos, mediante producción de TGF-B, el agotamiento de aminoácidos arginina o cisteína requeridas para función de células T, inhibición de activación de células T por nitrosilación de TCR, inducción de T reguladoras, etc. También los TAMs pueden inhibir inmunidad anti-tumoral mediante secreción TGF-B e IL-10 [39, 41, 42].

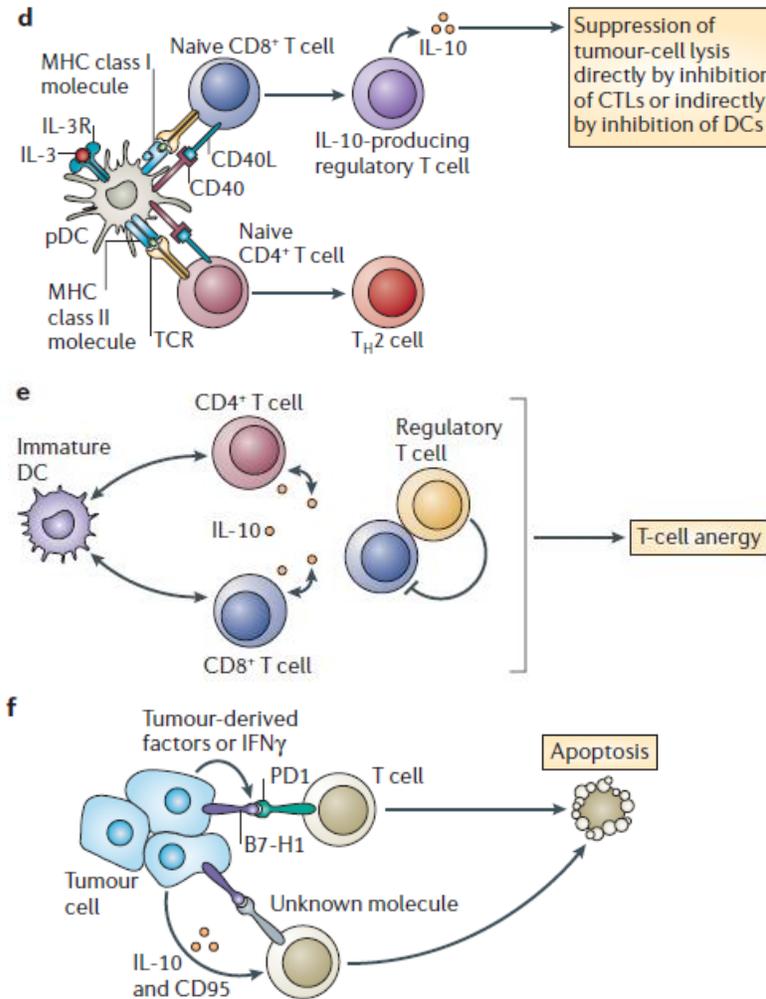
La inflamación crónica está también involucrada en direccionar la respuesta inmune hacia las células efectoras que facilitan el crecimiento tumoral. Aumenta la función de las células T reguladoras y es promovida por células CD4 Th17 por medio de IL-17 y por linfocitos B y anticuerpos que la promueven reclutando células del sistema inmune al sitio tumoral (*Figura 10, inciso h*), estableciendo de esta forma, un ambiente estromal que mantiene la carcinogénesis de *novo* [55, 56].

Tras el escape de la célula tumoral del sistema inmune, además de hacer metástasis, puede volver al sitio tumoral para promover la proliferación celular. La hipótesis del “auto sembraje de células tumorales” establece que, células tumorales circulantes (CTCs) seleccionadas pueden infiltrar una masa tumoral ya establecida, respondiendo a señales atrayentes derivadas del tumor como MMP1 y fascina1, que regulan la migración transendotelial y el “sembrado” tumoral [57]. Sin embargo, en el terreno clínico, esta hipótesis parece aplicarse solo en fenómenos raros que presentan tan solo del 2 al 3% de los pacientes con cáncer, que es cuando ocurre el desarrollo de dos tumores al mismo tiempo, donde células malignas agresivas provenientes de un tumor hacen “metástasis” en un segundo tumor diferente [58].

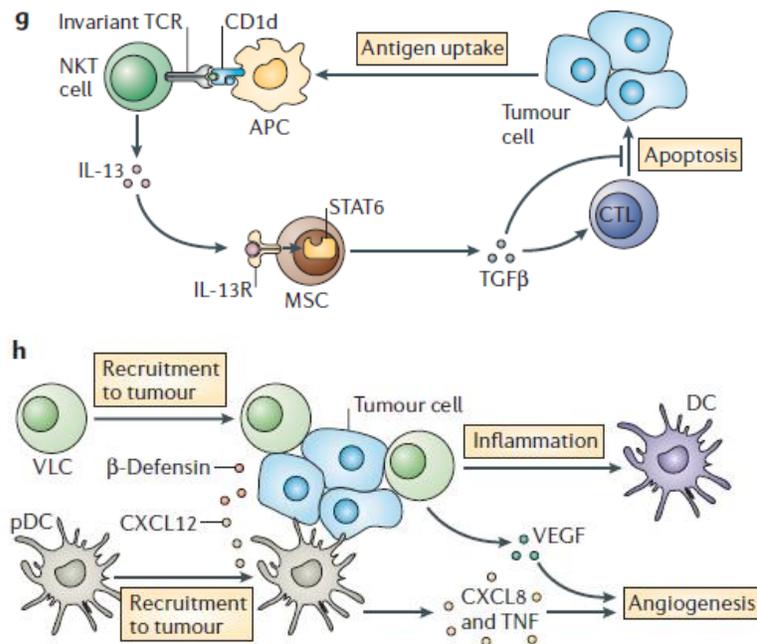


**Figura 8. Mecanismos de evasión tumoral del Sistema Inmune.** *a.* Pérdida de maquinaria de procesamiento de antígenos; *b.* Reclutamiento de células supresoras de origen mieloide (MDSCs) y su acción sobre células dendríticas (DCs) y linfocitos T. *c.* Generación de enzima IDO por parte de DCs

aumenta cantidad de triptófano, el cual es señal atrayente para linfocitos T y genera cinureninas que matan linfocitos T. (Imagen desde Zitvogel, Tesniere y Kroemer, Nature 2006, Vol 6, 715-727).



**Figura 9. Mecanismos de evasión tumoral del Sistema Inmune.** **d.** Células DCs plasmacitoides promueven diferenciación de linfocitos T CD4 y CD8 en linfocitos T CD4 protumorales y linfocitos T CD8+ reguladores. **e.** Anergia de linfocitos T tras estimulación con células DCs inmaduras. **f.** Apoptosis de linfocitos T a través de PD1 o CD95. (Imagen desde Zitvogel, Tesniere y Kroemer, Nature 2006, Vol 6, 715-727).



**Figura 10. Mecanismos de evasión tumoral del Sistema Inmune. g.** Células NKT inhiben acción antitumoral por parte de linfocitos T citotóxicos (CTLs). **h.** Atracción de leucocitos a sitio tumoral. (Imagen desde Zitvogel, Tesniere y Kroemer, Nature 2006, Vol 6, 715-727).

## 1.2 Cáncer Pulmonar.

### 1.2.1 Epidemiología.

A pesar de los avances hechos en el tratamiento clínico y entendimiento de su biología, el cáncer de pulmón es el cáncer más común en hombres y es la causa principal de muerte por cáncer en hombres y mujeres en el mundo [59].

Los principales factores de riesgo son: fumar, considerado el factor de riesgo más importante, la exposición ocupacional o medio ambiental a humo exhalado por fumadores activos, exposición a carcinógenos como radón, asbestosis y exposición a radiación [60].

Los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), un subgrupo citológico del cáncer pulmonar, presentan un pronóstico poco favorable ya que a

menudo, la enfermedad es diagnosticada en estadios avanzados cuando la cirugía ya no es una opción. Esto se debe principalmente, a que la enfermedad permanece asintomática por un largo periodo de tiempo.

Debido a esto, del 50 al 70% de los pacientes diagnosticados con NSCLC se presentan en estadios avanzados de la enfermedad (estadios III y IV) y no son sujetos a tratamientos curativos [60, 61], mientras solo del 20 al 30% de los pacientes son diagnosticados en estadios tempranos de la enfermedad (I a IIA) [62].

El índice de sobrevida general para 5 años establecido por la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC) es actualmente de: 73% para pacientes detectados en estadio IA, 58% para los detectados en estadio IB, 46% para estadio IIA, 36% para estadio IIB, 24% para estadio IIIA, 13% para estadio IIIB y 9% para estadio IV [62] incrementándose con respecto a la misma tasa establecida en años anteriores (por ejemplo, 61% para pacientes en estadio IA o 1% para pacientes en estadio IV) [63].

En México se estimaron para el año 2010 más de 10 mil muertes por esta causa, lo que significa un incremento del 50% en tan sólo una década.

El cáncer de pulmón causa altos costos económicos, tanto para instituciones del sector salud como del sector productivo con un costo anual promedio por paciente mayor a 100 mil pesos [64].

### **1.2.2 Clasificación del Cáncer Pulmonar.**

A nivel citológico, el cáncer de pulmón se divide en: cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). Este último constituye el 85% de todos los casos de cáncer de pulmón [61, 65] comprendiendo a nivel molecular, de un grupo heterogéneo de neoplasmas. A nivel histológico incluye: carcinoma de células escamosas, adenocarcinomas, carcinoma de células grandes, carcinomas adenoescamosos y carcinomas con elementos pleomórficos, sarcomatoides o sarcomatosos.

El adenocarcinoma pulmonar se cree sigue una progresión linear de varios pasos [59]; primero, un precursor o lesión premaligna denominada hiperplasia adenomatosa atípica, progresa a un adenocarcinoma preinvasivo denominado carcinoma bronquioalveolar, término que grupos de investigadores pretenden cambiar por el más exacto, adenocarcinoma mínimamente invasivo [66], posteriormente, progresa a adenocarcinoma invasivo, tras lo cual adquieren potencial metastásico.

### **1.2.3 Tratamiento y Resistencia a Fármacos.**

La primera línea de tratamiento de quimioterapia actual para pacientes avanzados de NSCLC está basada en componentes de platino y representa el estándar de los tratamientos [67]. Esta primera línea de tratamiento consiste por lo general, del uso combinado de 2 fármacos basados en platino (cisplatino y carboplatino) junto con un fármaco de tercera generación como gemcitabina, docetaxel, vinorelbina o pemetrexed [68, 69] los cuales han incrementado la tasa de sobrevida general del paciente en estadio IV de 5 a 14% para 5 años.

El uso de terapias combinatorias ha significado un incremento general en la sobrevida del paciente. Por ejemplo, de 1998 a 2008, se incrementó el índice de sobrevida general del paciente de 0.3 a 15% aproximadamente, esto se correlacionó con el uso incrementado de más de 1 línea de quimioterapia en pacientes (en 1998 el uso de 2 o más líneas era de 7%, en 2008 fue de 60%), a veces hasta 4 y 5 líneas de tratamiento y al uso de tratamientos basados en 2 fármacos de platino junto a un tercer fármaco de generación posterior [70].

De tal forma, que los tratamientos para pacientes con cáncer pulmonar se han ido personalizando conforme se integran los criterios moleculares e histológicos para concretar tratamientos específicos; por ejemplo, para pacientes positivos para mutación en EGFR la línea de tratamiento es cisplatino, vinorelbina y cetuximab (anticuerpo monoclonal que inhibe la activación de EGFR); para tratamientos de segunda línea se administra docetaxel, pemetrexed, erlotinib y gefitinib [60].

La “adicción de oncogenes” por parte de las células tumorales, se refiere a la dependencia de las células tumorales para su progresión, en unas cuantas proteínas mutadas. Se generó quimioterapia que inhibía a las células mutadas con lo que, se inducía la muerte celular masiva de células tumorales y se prevenía la progresión de la enfermedad [69]. Se generaron, fármacos específicos que inhiben proteínas mutadas (uso de gefitinib y/o erlotinib, fármacos que inhiben la subunidad tirosin cinasa del receptor del factor de crecimiento epidermal EGFR) o de anticuerpos que inhiben moléculas claves para células tumorales (bevacizumab, anticuerpo monoclonal que inhibe la activación de la vía del receptor de VEGF, esencial para angiogénesis).

Sin embargo, aún las células “adictas” tienen altas tasas de reincidencia debido a que, con el tiempo generan resistencia a los fármacos. Las mutaciones en el dominio tirosin cinasa de EGFR se encuentran expresadas en el 60% de los casos de NSCLC, los inhibidores de estas mutaciones que se generaron (gefitinib y erlotinib) funcionan uniéndose al ATP de las enzimas que promueven la proliferación celular de la célula tumoral que se encuentran río abajo en la señalización proveniente de EGFR (PI3K y MAPKs). Con el tiempo, surge una segunda mutación en dominio de EGFR que sustituye una treonina por una metionina y vuelve al receptor más afin por el ATP de las enzimas, con lo que compite por su unión y vuelve ineficaz a los fármacos. También se ha observado, la amplificación de otro receptor que señala a los mismos componentes río abajo que señala EGFR; la incrementada regulación de Met también activa la vía PI3K/Akt sin requerir de EGFR [61].

Niveles altos de ARN mensajero de ERCC1 está relacionado con resistencia clínica a quimioterapia basada en platino; BRCA1 induce resistencia a fármacos que producen daño al ADN (cisplatino y etoposide) [61].

#### 1.2.4 Inmunología del Cáncer Pulmonar.

Los pacientes con NSCLC exhiben diversas mutaciones en proteínas clave para células tumorales así mismo las diferencias se observan a nivel regional. En adenocarcinomas de pulmón, en países occidentales las mutaciones activantes de EGFR ocurren en 15% de los casos, mientras que para países asiáticos es del orden de 30 a 40%, en pacientes afroamericanos va del 2 al 14% y para países latinoamericanos, la frecuencia de mutación en EGFR es de 33% [60, 71]. La mutación en *KRAS* va del 25 al 30% de los casos de NSCLC pero también hay diferencias en regiones, por ejemplo, en Latinoamérica es del 16% de los casos [71].

La expresión de estas mutaciones activantes en proteínas clave para células tumorales también ocurren en diferentes periodos durante la progresión tumoral, mientras las mutaciones en *KRAS* ocurren en lesiones precursoras, las mutaciones en EGFR ocurren en lesiones premalignas y adenocarcinomas invasivos. Pacientes con células tumorales con mutaciones en *KRAS* no responden a tratamiento con inhibidores de vías PI3K-Akt y MAPK-ERK (gefitinib, erlotinib) ya que las mutaciones en EGFR y *KRAS* son mutuamente excluyentes, lo que puede explicar porque, tratamientos que inhiben estas vías en algunos pacientes no incrementan la sobrevida general, como lo observaron en un estudio Zhang y colaboradores [72].

Finalmente, se ha observado a nivel inmunológico que, los fibroblastos asociados a carcinoma aumentan la tumorigenicidad en NSCLC mediante la sobreexpresión de 46 genes relacionados con la señalización TGF $\beta$ , la adhesión focal y la vía MAPK; los macrófagos asociados a tumor también promueven la progresión tumoral a través de la liberación de quimiocinas como CXCL12. Niveles altos de células Tregs y de quimiocinas CXCL12/CXCR4 son claves en patogénesis en NSCLC.

## **1.3 Biomarcadores en Cáncer.**

### **1.3.1 Biomarcadores Pronósticos y Predictivos.**

Un biomarcador se define como una característica que es medida objetivamente y evaluada como un indicador de procesos normales biológicos, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a la intervención terapéutica [73]. Por otra parte, el Programa Internacional de Seguridad Química de la Organización Mundial de la Salud, en coordinación con las Naciones Unidas y la Organización Internacional del Trabajo, definió biomarcador como “Cualquier sustancia, estructura o proceso que puede ser medido en el cuerpo o en sus productos e influencia o predice la incidencia de resultados clínicos o de la enfermedad” [74].

Los biomarcadores pueden ser de diagnóstico, pronóstico o predictivos. Los biomarcadores pronósticos son definidos como “características clínicas o biológicas medidas objetivamente y proveen de información sobre el resultado clínico de cáncer en un individuo no tratado” [75]. Los biomarcadores predictivos son, en cambio, “características clínicas o biológicas que proveen información sobre el beneficio de tratamiento de un paciente” (ya sea en términos de encogimiento de tumor o de impacto del tratamiento en sobrevida) [75].

### **1.3.2 Uso de Biomarcadores en Diferentes tipos de Cáncer.**

En cáncer de próstata niveles basales altos de antígeno prostático específico (PSA) está asociado a una tasa de progresión mayor después de tratamiento [76]. La isoforma Proenzima PSA (proPSA) es un biomarcador prometedor para la detección de cáncer de próstata debido a que su expresión correlaciona con tejido tumoral más que con tejido con hipertrofia prostática benigna (BPH). En pacientes con cáncer de próstata, el incremento de los niveles de PSA pueden deberse a la progresión de la enfermedad o al incremento de BPH [77]. La proteasa hK2 incrementa su expresión durante la transformación de epitelio benigno a cáncer primario; la medición de hK2,

niveles totales de PSA y de PSA libre permite discriminar de mejor manera pacientes con o sin cáncer que con el uso de PSA total por separado [76]. Otras moléculas utilizadas como biomarcadores para la detección de cáncer primario son: glutatión S-transferasa PI (GSTPI) y el antígeno de membrana específico de próstata (PSMA). Sin embargo, la desventaja de este último es que sus niveles se incrementan conforme un individuo envejece por lo que pierde sensibilidad como biomarcador. Alteraciones genéticas en tejidos con cáncer de próstata se han visto en los genes c-MYC, PCSA y NKX3.1, lo que los hace biomarcadores potenciales. PCA3, un gen específico tumoral, se encuentra altamente sobreexpresado en tumores con respecto a tejido de próstata no maligno, sin embargo, los niveles de PCA3 no determinan si pacientes van a tener progresión en su enfermedad o no, debido a que los niveles de su expresión en ambos casos son similares [76].

Varios estudios han determinado que niveles anormales de proteína de matriz nuclear 22 (NMP22) están asociados a cáncer de vejiga y se encuentran incrementados en orina de pacientes hasta 25 veces más que en sujetos sanos. BLCA-4 es un biomarcador de cáncer de vejiga altamente específico. La combinación de BLCA-4 y HOXA-13 permiten distinguir entre tumores de bajo y alto grado con especificidad y sensibilidad de 80% [78].

En cáncer colorectal, existen dificultades para predecir una respuesta patológica completa. La examinación rectal digital (DRE) y diversos estudios de escaneo no son capaces de distinguir fibrosis de pequeñas islas de tejido tumoral. El antígeno carcinoembrionario (CEA) es biomarcador tumoral más ampliamente utilizado en pacientes con cáncer colorrectal. Niveles de CEA por encima de 5 ng/ml tienen un impacto adverso en la sobrevida. También, niveles elevados de CEA antes de tratamiento están asociados con un riesgo incrementado de mortalidad. Otros biomarcadores utilizados son: mutaciones en BRAF y presencia de células tumorales circulantes (CTCs). CTCs medidas para predecir respuestas a corto plazo a quimioterapia dieron como resultado que pacientes sin CTCs vivían por lo menos 1 año, en tanto que pacientes con CTCs detectadas morían en plazo de 8 meses [79].

Una mutación en N-RAS fue identificada como factor predictor independiente de reducción de supervivencia en pacientes con melanoma metastásico. PDL-1 en tejido tumoral podría servir como biomarcador predictivo pero solamente en tumores que expresan PD1 [80].

El carcinoma hepatocelular avanzado (HCC) se define como una enfermedad metastásica o localmente avanzada. Diversos estudios señalan que, niveles bajos de VEGF-A están asociados a una mejor supervivencia global. También, niveles basales altos en plasma de IL-6, IL-8 y angiopoyetina2 (Ang2) están asociados a una supervivencia global baja. En pacientes en diferentes estadios de la enfermedad, niveles bajos en plasma del factor de crecimiento tipo insulina 1(IGF1) correlacionan una peor supervivencia global. Diversos estudios que han medido los niveles de células endoteliales circulantes (CEC) y células progenitoras endoteliales (CEP), establecieron que niveles altos de estas poblaciones celulares están asociados a fase tardía de la enfermedad pero su uso como factor predictivo es contradictorio [81].

La expresión anormal de microRNAs (miRs) en tejidos con cáncer primario se ha detectado en diversos tipos de cáncer. Los miRs tienen importantes funciones en el desarrollo tumoral. En cáncer de ovario y en otros tipos de cáncer, determinar los niveles de expresión de miRs en sangre periférica se ha vuelto el centro de estudio, debido a su mínima invasividad y alta reproducibilidad [82].

La expresión de células tumorales diseminadas (DTCs) en médula ósea cuando se diagnostica cáncer de mama está asociada a una supervivencia reducida. La detección de DTCs es un proceso invasivo y asociado con morbilidad incrementada, por lo que se han hecho nuevos intentos con el fin de detectarla de manera menos dolorosa en sangre periférica. De acuerdo a diversos estudios, del 40 al 80% de pacientes con cáncer de mama metastásico tienen CTCs en sangre periférica. CTCs tienen valor predictivo en diferentes subtipos de cáncer de mama [83].

### 1.3.3 Biomarcadores en Cáncer de Pulmón

En cáncer de pulmón, aún después de que se diagnostican pacientes en estadios tempranos (fase I-II), la presencia de metástasis extratorácicas provocan una tasa de supervivencia a 5 años menor a 50% [84]. El beneficio de quimioterapia sobre la supervivencia global de pacientes en estadios avanzados a 5 años es del 5% aproximadamente [84, 85], esto fue demostrado por diversos estudios clínicos como: el ensayo Big Lung Trial (BLT), ALPI, ANITA y el proyecto IALT entre otros.

Debido a la modesta eficacia de los tratamientos de quimioterapia “clásicos” (terapia basada en componentes de platino, taxanos, gemcitabina, pemetrexed) [86], existe la necesidad de poder estratificar los pacientes, identificando subgrupos de pacientes que puedan evitar la exposición a tratamientos ineficaces y tóxicos o subgrupos de pacientes que se puedan beneficiar del tratamiento [84].

Para cáncer de pulmón, los únicos biomarcadores que tienen efectos predictivos significativos comparados con quimioterapia son: mutaciones en EGFR (receptor de factor de crecimiento epidermal) y los rearrreglos ALK (cinasa de linfoma anaplásico) que en tumores oncogénicos representan el 15% de casos de CPCNP metastásico.

Inhibidores de cinasas de EGFR (erlotinib, gefitinib) mostraron mejores resultados que la quimioterapia basada en platino como tratamiento de primera línea en pacientes con mutaciones en EGFR, sin embargo solamente incrementan la supervivencia libre de progresiones (PFS) y no la supervivencia global. En el caso de rearrreglos ALK, el inhibidor de ALK crizotinib mostró mejores resultados que la quimioterapia como tratamiento de segunda línea [84, 86].

La metilación en el promotor del gen RASSF1A tuvo resultado positivo como biomarcador pronóstico y predictivo; la metilación de RASSF1A estuvo asociada con supervivencia global significativamente más baja [84].

Diversos estudios habían mostrado que ERCC1 tenía un papel predictivo con un incremento en supervivencia global a 5 años en pacientes con tumores positivos para ERCC1 en comparación con pacientes con tumores negativos para ERCC1 [85], sin

embargo, estas implicaciones predictivas para ERCC1 no fueron confirmadas en un estudio con un mayor número de pacientes [84].

De la misma forma, se encontraron resultados contradictorios con respecto al uso de RRM1, un gen que codifica la subunidad reguladora de la ribonucleótido reductasa, asociada con un mejor resultado clínico en principio, pero que en un estudio clínico con 275 pacientes en estadio IV no mostró un mejor resultado clínico en comparación con quimioterapia. También el gen BRCA1 falló en predecir resistencia tumoral a tratamiento de platino en 287 pacientes en estadio IV de enfermedad [84].

Otros estudios clínicos han mostrado que, en pacientes en estadio I que recibieron cirugía y tratamiento, la alta expresión conjunta de p53, erbB2, CD44 y rb correlacionan con una frecuencia de 37% en la tasa de sobrevida global a 5 años, mientras que, pacientes con expresión de un solo gen tienen frecuencia de 80% [87]. Botling y colaboradores [88] en un estudio con 196 pacientes con NSCLC, a través de micromatrices analizaron un conjunto de genes potenciales pronósticos. CADM1 (molécula 1 de adhesión celular) mostró asociación significativa con sobrevida global; la alta expresión de CADM1 correlacionó con mejor tasa de sobrevida global.

Pero este estudio, al igual que otros que involucran moléculas para inmunoterapia como: MUC1 (glicoproteína mucina 1), CTLA-4, PD-1 y PD-L1 necesitan mayores estudios clínicos con el fin de que sus “aparentes” efectos positivos sobre la sobrevida global de pacientes se puedan confirmar.

Finalmente, los marcadores oncogénicos no pueden ser usados de forma individual para predecir el pronóstico de pacientes ya que la frecuencia de su expresión anormal no se encuentra presente en todos los tumores, por ejemplo, para el caso de mutaciones en p53 y EGFR, dos casos más comunes de alteraciones genéticas, la frecuencia observada es 43 y 52% respectivamente.

### 1.4.1 Estructura

CD47 fue descubierta inicialmente como una proteína de 50 kDa que se copurificó con la integrina  $\alpha\beta 3$  de la placenta [89, 90] por lo que se le denominó proteína asociada a integrinas (IAP) [89]. Recientemente, Kaur y colaboradores encontraron que CD47 puede estar expresado como proteoglicano de peso molecular mayor a 250,000 daltons en linfocitos T Jurkat [91].

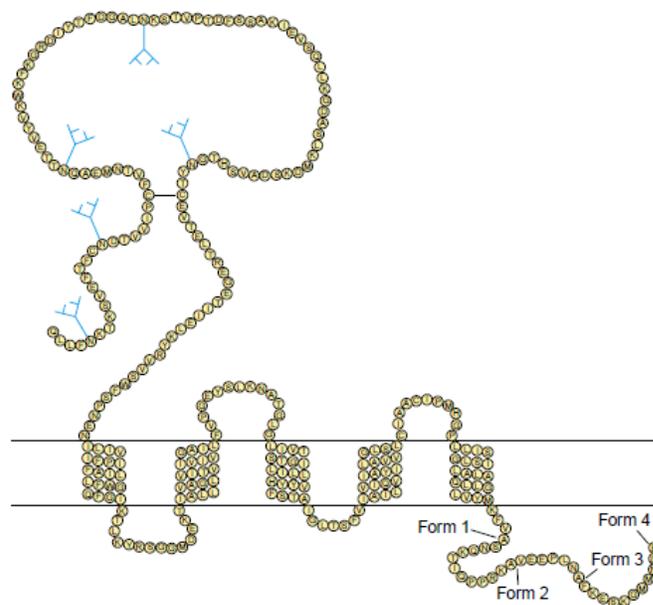
La proteína IAP también se le encontró asociada a integrina  $\beta 3$  en granulocitos (PMNs) y en plaquetas y se le encontró expresada en la membrana plasmática de todas las células hematopoiéticas, incluso en eritrocitos que no contienen integrinas  $\beta 3$  [89].

Lindberg y colaboradores [90] encontraron que la secuencia de la proteína IAP era idéntica a la secuencia clonada del antígeno de carcinoma de ovario (OA3). Estudios posteriores hechos por Mawbey y colaboradores [92] concluyeron que el antígeno recientemente descubierto CD47, el marcador de tumor de ovario (OA3) y la proteína IAP eran la misma molécula. Finalmente, Lindberg y colaboradores [93] debido a la expresión de IAP en eritrocitos pensaron que IAP podía ser un antígeno del complejo Rh, concluyendo que IAP, el antígeno asociado al complejo Rh 1D8, OA3 y CD47 eran la misma molécula.

CD47 (IAP, OA3, 1D8) es una proteína integral de membrana tipo 1, miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas. Se compone de un dominio inmunoglobulina variable extracelular, un dominio múltiple altamente hidrofóbico que abarca 5 veces la membrana, conocido como dominio múltiple de membrana (MMS) y un dominio citoplásmico terminal alternativamente escindido que lleva a la formación de 4 diferentes isoformas citoplásmicas. [50, 51, 94, 95] (*Figura 11*)

Las 4 isoformas van desde 3 a 36 aminoácidos de tamaño, y estas surgen de una escisión alternativa del mrRNA transcrito del gen CD47/IAP; [94] la isoforma 2 de 16 aminoácidos de tamaño es la isoforma mas expresada y se encuentra en células hematopoiéticas, células endoteliales, fibroblastos y en astrocitos donde juega un papel

menor en el procesamiento de la memoria, [94-98] la isoforma 3 de 23 aminoácidos de tamaño se encuentra en muchos de los tejidos donde es expresada la isoforma 2 pero es menos abundante, excepto en el hígado y en las glándulas salivales y está asociada junto con la isoforma 4 en el proceso de consolidación de la memoria [96, 98], la isoforma 4 de 36 aminoácidos de tamaño, se expresa principalmente por el tejido neural, por nervios periféricos, médula espinal, neuronas y retina y es la segunda isoforma más abundante [94-98], mientras que, la isoforma 1 de 3 aminoácidos de tamaño, es expresada en células epiteliales y endoteliales, y en queratinocitos [94-96], siendo estos últimos los que expresan las mayores cantidades de isoforma 1 [96]. La proteína CD47 de humanos, ratones y ratas muestran 70% de identidad general de aminoácidos [50].



**Figura 11. Estructura de la proteína asociada a la integrina (IAP/CD47).** La estructura de CD47 se compone de 3 dominios: el dominio Inmunoglobulina variable (IgV) extracelular altamente glicosilado, el dominio múltiple membranar (MMS) compuesto de 5 segmentos altamente hidrofóbicos que abarcan la membrana y un dominio citoplásmico carboxilo terminal que se encuentra alternadamente escindido, dando lugar a cuatro isoformas, de las cuales, la isoforma 4 se muestra en su totalidad (Imagen desde: Brown EJ y Frazier WA, *TRENDS in Cell Biology*. 2001, Vol 11, No 3, 130-135).

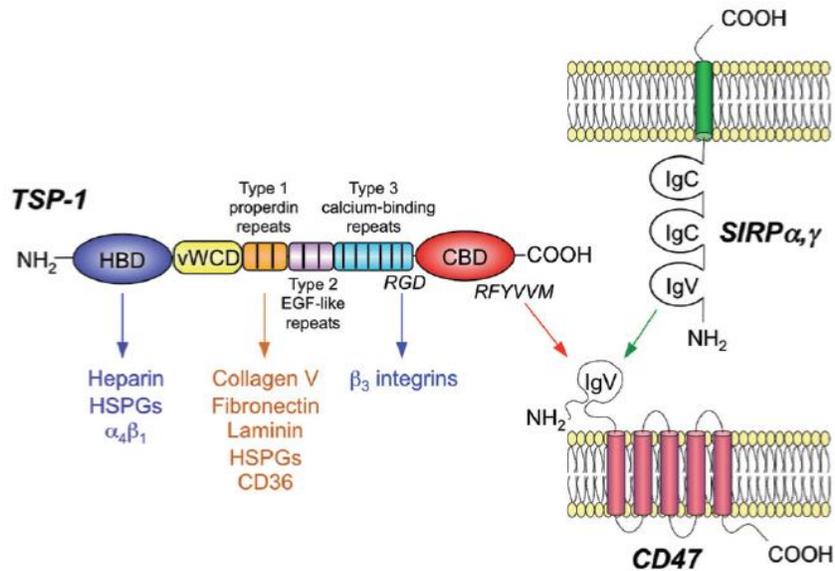
### 1.4.2 Ligandos Endógenos

CD47 tiene diferentes ligandos; moléculas con las que se asocia en la membrana plasmática, proteínas intracelulares y extracelulares.

CD47 interactúa y regula a diferentes integrinas; CD47 forma complejos asociándose de manera directa o indirecta con la integrina  $\alpha v \beta 3$  [99], con la integrina  $\alpha IIb \beta 3$  y c-Src [100], con la integrina  $\alpha 2 \beta 1$  en células de músculo liso arterial [101], con la integrina  $\alpha 4 \beta 1$  en reticulocitos falciformes [102], con la integrina  $\alpha 6 \beta 1$  y CD36 en microglia [103] y con integrina  $\alpha 5$  en condrocitos [104].

CD47 también se une a ligandos en otras células como las proteínas de señal regulatoria SIRPs (SIRP $\alpha$  y SIRP $\gamma$ ) y con trombospondina [94, 95]. La unión de SIRP $\alpha$  fue determinada por diferentes grupos de investigación; primero, Jiang y colaboradores [104] identificaron que SIRP $\alpha$ , también llamada BIT, SHPS-1 o molécula de adhesión neural P84 se une a CD47/IAP en regiones sinápticas, encontrando que su distribución en el cerebro y en la retina era idéntica. Posteriormente, otro grupo de investigación determinó que SIRP $\alpha$  se une a CD47 y la interacción se da entre los 3 dominios inmunoglobulina extracelulares de SIRP $\alpha$  con el dominio inmunoglobulina extracelular de CD47 [105], y esta interacción entre CD47 y SIRP $\alpha$  determinada por Babic y colaboradores [106] induce la agregación en una línea celular de linfocitos pro-B. CD47 también interacciona con trombospondina-1 (TSP-1) mediante su unión al dominio CBD (dominio de unión celular carboxilo terminal) [99] (*Figura 12*).

CD47 también se asocia con proteínas intracelulares; en eritrocitos interacciona con la proteína 4.2 del citoesqueleto [107], en neuronas interacciona con las proteínas G pequeñas Rac y Cdc42 en la formación de neuritas y filopodios [108], etc (*Tabla 2*).



**Figura 12. Representación esquemática de CD47 y sus ligandos endógenos TSP-1 y SIRP.** CD47 se compone de 5 dominios transmembranales, un dominio extracelular amino terminal inmunoglobulina variable IgV y un dominio citoplásmico carboxilo terminal alternadamente escindido. TSP-1 se compone de varios dominios diferentes, incluyendo, el dominio de unión a heparina (HBD), el dominio Von Willebrand C (Vwcd) 3 repeticiones tipo 1 properdina, 3 repeticiones tipo 2 tipo EGF, 7 repeticiones tipo 3 de unión a calcio y el dominio carboxilo terminal CBD. Las secuencias de aminoácidos responsables de la unión de TSP-1 con integrinas (RGD) y con CD47 (RFYVVMWK) se muestran en *itálicas*. SIRPα y γ son proteínas con 1 dominio transmembranal y 3 dominios extracelulares tipo inmunoglobulina que incluyen un dominio extracelular IgV con el que interactúan con el dominio IgV extracelular de CD47 (Imagen desde: Sick E et al, 2012, BJP, Vol 167, 1415-1430).

**Tabla 2. Proteínas extracelulares, membranales e intracelular asociadas a CD47.** (Imagen desde: Sick E et al, 2012, BJP, Vol 167, 1415-1430)

CD47 partners		Main biological and cellular events	References
<b>Extracellular partners</b>			
Thrombospondin-1 (C-terminal domain)		Apoptosis, cell proliferation, cell survival, cell adhesion, inhibition of angiogenesis, pro- and anti-inflammatory effects, platelet activation and aggregation	Dorahy et al. (1997); Manna and Frazier (2004); Rath et al. (2006a); Lamy et al. (2007); Isenberg et al. (2009); Xing et al. (2009); Sick et al. (2011)
Serpin A1 (C-terminal domain)		Cell proliferation	Congote and Temmel (2004)
SIRP $\alpha$ 1		Inhibition of phagocytosis, stimulation of cell-cell fusion, T-cell activation, neutrophil transepithelial migration	Han et al. (2000); Oldenberg et al. (2000); Seiffert et al. (2001); Liu et al. (2002)
SIRP $\gamma$		Leukocyte transendothelial migration, T-cell proliferation	Piccio et al. (2005); Stefanidakis et al. (2008)
<b>Membrane partners</b>			
<i>Direct partners (*demonstrated experimentally by immunoprecipitation or FRET in the case of VEGFR-2)</i>			
Integrins	$\alpha_2^*$	COX-2 expression and intestinal epithelial cell migration	Broom et al. (2009)
	$\alpha_2\beta_1^*$	Migration and proliferation of smooth muscle cells	Chung et al. (1997); Wang and Frazier (1998)
	$\alpha_{IIb}\beta_3^*$	Platelet activation	Chung et al. (1997)
	$\alpha_v\beta_1^*$	Adhesion of sickle reticulocytes, B-cell migration	Yoshida et al. (2000); Brittain et al. (2004)
	$\alpha_6$	Glycosaminoglycan synthesis by chondrocytes	Holledge et al. (2008)
	$\alpha_v\beta_1$	Fibrillar beta amyloid-mediated microglia activation and phagocytosis	Bamberger et al. (2003); Koenigsnecht and Landreth (2004)
	$\alpha_v\beta_2$	Neutrophil transepithelial migration	Hofman et al. (2000)
	$\alpha_v\beta_3^*$	C32 human melanoma cells spreading, pro-inflammatory cytokine synthesis in human monocytes, <i>Coxiella burnetii</i> phagocytosis, promyelocytic leukaemia cell death	Gao et al. (1996a); Capo et al. (1999); Hermann et al. (1999); Saumet et al. (2005)
VEGFR-2*		Inhibition of VEGFR-2 downstream signalling	Kaur et al. (2010)
<b>Intracellular partners</b>			
<i>Direct partners</i>			
Gi proteins*	Syk	Platelet activation (Lyn and FAK phosphorylation)	Chung et al. (1997)
	AC/PKA	Platelet aggregation (decrease in cAMP), smooth muscle cell migration, T-cell death	Frazier et al. (1999); Wang et al. (1999); Manna and Frazier (2003)
	ERK	Jurkat T-lymphoma cell adhesion (phosphorylation); inhibition of smooth muscle cell migration	Wang et al. (1999); Wilson et al. (1999)
	PI3K	C32 melanoma cell spreading, T-cell migration, astrocytoma cell proliferation	Gao et al. (1996b); Li et al. (2005); Sick et al. (2011)
PLIC-1*		Jurkat T-cells spreading, regulation of heterotrimeric G-protein function	Wu et al. (1999); N'Diaye and Brown (2003)
BNIP3*		T-cell apoptosis	Lamy et al. (2003)
<i>Indirect partners</i>			
Rac		Neurite and filopodium formation, neuronal development	Miyashita et al. (2004); Murata et al. (2006)
Cdc42		B-cell migration, neurite and filopodium formation, neuronal development	Miyashita et al. (2004); Yoshida et al. (2000); Murata et al. (2006)
Src and MEK kinases		Epithelial cell spreading and migration	Shinohara et al. (2006)
Drp1		Caspase-independent cell death of normal and leukaemic cells	Bras et al. (2007)
Protein 4.2		Rh complex integrity on red blood cells	Bruce et al. (2002)
GC		Inhibition of NO signalling (decrease in cGMP)	Isenberg et al. (2006)

### 1.4.3 CD47 y Trombospondina 1 (TSP-1).

Trombospondina-1 (TSP-1) es una glicoproteína homotrimérica de matriz extracelular que se encuentra transitoriamente expresada y regula funciones celulares de manera específica mediante la unión de receptores de superficie celular y otros componentes de matriz.

TSP-1 interactúa con 9 receptores en células endoteliales que incluyen: las integrinas  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha 9\beta 1$  y  $\alpha v\beta 3$ , proteína LRP asociada a calreticulina, proteoglucanos heparan sulfatados, CD36 y CD47. [109, 110]

La unión de CD47 con TSP-1 regula diferentes funciones: inhibición de angiogénesis inducida por óxido nítrico (NO), inducción de migración celular, apoptosis y diferenciación celular, entre otras.

El óxido nítrico (NO) estimula la angiogénesis, aumentando la quimiotaxia y la proliferación de células endoteliales, también incrementa la migración y adhesión de células endoteliales y células de músculo liso vasculares. NO activa a la guanilato ciclasa soluble (sGC) lo que acelera la producción de cGMP, cGMP activa a la cinasa dependiente de cGMP (cGK1), la cual activa a la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina para defosforilar la subunidad regulatoria de la cadena ligera 2 de la miosina (MLC2) llevando a la relajación de las células de músculo liso vasculares (VSMCs) [109].

La interacción CD47/TSP-1 inhibe la señalización NO/cGMP de diversas maneras: la unión de TSP-1 con CD47 inhibe la activación de guanilato ciclasa soluble (sGC) por NO en células endoteliales, VSMCs, plaquetas y linfocitos [109, 111]; en el caso de plaquetas, esta inhibición resulta en retraso en la agregación de plaquetas promovido por factores activantes de guanilato ciclasa [112]. También, inhibe indirectamente la activación de (sGC), incrementando los niveles intracelulares de calcio en células T Jurkat [111].

La interacción CD47/TSP-1 inhibe la activación de la cinasa dependiente de cGMP (cGK1) [111, 113].

La unión de TSP-1 con CD47 también inhibe la señalización proveniente del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), la cual incrementa la proliferación y migración de células endoteliales mediante la unión con sus receptores VEGFR1 y VEGFR2. La interacción TSP-1/CD47 previene la autofosforilación de VEGFR2 en tirosina 1175, la cual es crítica para la activación de la señalización río abajo a través de este receptor [114, 115]. Esta inhibición de la señalización se da por medio de la reducción regulada por TSP-1 de la asociación de CD47 con VEGFR2. [111, 115]

En células VSMC y endoteliales, la unión TSP-1/CD47 inhibe la activación de la adenilato ciclasa soluble (sAC) y la acumulación de cAMP de dos formas diferentes: mediante la inhibición de la adenil ciclasa por medio de la proteína  $G_i$  a través de la inhibición directa de forskolina e isoproterenol de forma independiente de cGMP y por medio de la regulación dependiente de cGMP de la actividad específica de cAMP. [111,116] (*Figura 13*).

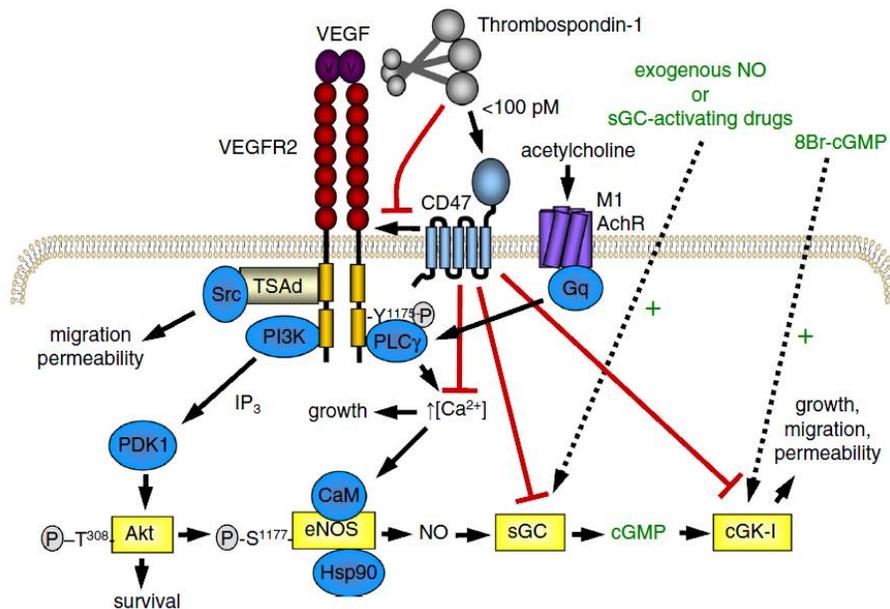
Previamente, Frazier y colaboradores ya habían demostrado que en plaquetas, la unión de TSP-1 con CD47 e integrina  $\alpha IIb\beta 3$  conducía a la reducción en los niveles de cAMP. [117]

CD47 expresado como proteoglicano existe en linfocitos T, células endoteliales y células de músculo liso vasculares. Esta estructura podría permitir la unión de TSP-1 con mayor afinidad debido a la unión simultánea a los determinantes carbohidratos y proteicos de la isoforma proteoglicano heparan sulfatado de CD47 [91].

La interacción CD47/TSP-1 induce migración celular en linfocitos T; la unión del dominio amino terminal de TSP-1 con integrina  $\alpha 4\beta 1$  estimula la quimiotaxia, expresión de genes de metaloproteinasas y la adhesión de linfocitos T dependientes de activación. La unión de TSP-1 con CD47 aumenta la adhesión de los linfocitos regulado por el complejo TSP-1-integrina  $\alpha 4\beta 1$ [118]. También, la interacción TSP-1-calreticulina-CD47 induce migración celular en linfocitos T regulada por la vía PI3K y por proteincinasas de la familia Janus [119].

La interacción CD47/TSP-1 induce muerte celular independiente de caspasas en linfocitos T [120], monocitos y células dendríticas [121], células de cáncer de mama

[122] y en células leucémicas [123]. Esta muerte celular se caracteriza por traslocación de fosfatidilserina, reducción en potencial de membrana mitocondrial, encogimiento celular pero sin activación de caspasas. CD47 también puede estimular apoptosis asociándose a Fas y aumentando el funcionamiento de Fas, de esta forma, promueve la apoptosis dependiente de caspasas [124].



**Figura 13. Regulación de la señalización de células vasculares por medio de la interacción CD47/TSP-1.** La unión de TSP-1 a CD47 tiene un efecto global sobre la vía canónica de NO. En células endoteliales, TSP-1 inhibe la activación de VEGFR2 a través de la disrupción de las interacciones de CD47 con VEGFR2, lo que limita la fosforilación de enos mediada por Akt y altera los niveles de calcio previniendo la activación mediada por calmodulina de enos. La interacción TSP-1/CD47 también inhibe la activación de SGC en células vasculares y linfocitos T, inhibe la activación estimulada por CGMP de CGK1. De esta manera, el eje TSP-1/CD47 es un inhibidor global de NO exógeno y endógeno. (Imagen desde: Roberts et al, 2012, Matrix Biology, pp:1-8.)

#### 1.4.4 CD47 e Integrinas.

Las integrinas son proteínas efectoras clave de la migración celular, juegan un papel importante en la coestimulación de linfocitos T y cooperan con factores de crecimiento para promover proliferación celular [125].

CD47 fue aislada por primera vez por Eric J. Brown y colegas como una proteína asociada a 2 integrinas: la ubicua  $\alpha\beta3$  [89, 90] y la restringida a plaquetas  $\alpha\text{IIb}\beta3$  [98, 125].

CD47 se une y forma un complejo con trombospondina-1 (TSP-1) y la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta3$  lo que resulta en la propagación de plaquetas sobre fibrinógeno inmovilizado, la agregación de plaquetas y la tirosin fosforilación de FAK y SYK tras ser activado por proteína  $G_i$  [100]. También la interacción entre TSP-1, CD47 y la integrina  $\alpha2\beta1$  promueve la migración de células de músculo liso [101] a través de la activación de la integrina  $\alpha2\beta1$  promovida por CD47.

CD47 estimula la unión de eritrocitos inmaduros (reticulocitos) con TSP-1, VCAM-1 y fibronectina por medio de la activación de la integrina  $\alpha4\beta1$ . La unión de reticulocitos estimulada por CD47 a TSP-1 y fibronectina es dependiente de la secuencia RGD de la integrina  $\alpha4\beta1$ . La señalización de CD47 resulta en la fosforilación de un residuo de serina en el dominio citoplásmico de la integrina  $\alpha4$ ; la fosforilación de la integrina  $\alpha4$  requiere de la proteína  $G_i$  y de PKA y da como consecuencia, la adhesión de reticulocitos [102]. Esto correlaciona con la mayor habilidad de eritrocitos falciformes para adherirse, característico de la anemia falciforme.

La unión y formación de un complejo receptor entre CD47, CD36, integrinas  $\alpha6\beta1$  con fibras  $\beta$ -amiloideas (fibrillas  $A\beta$ ) regula la adhesión de fibrillas  $A\beta$  a microglia y la activación de cascadas de señalización basadas en cinasas de tirosinas [103]. Esto lleva al estallido respiratorio y la secreción de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$  [103].

Este mecanismo resulta importante dentro del contexto de patogénesis de la enfermedad de Alzheimer, donde la asociación de microglia con depósitos de fibrillas

A $\beta$  lleva a su conversión hacia un fenotipo reactivo pro-inflamatorio, y a la secreción de un amplia gama de moléculas pro-inflamatorias y factores neurotóxicos que resultan en un estado proliferativo mantenido y pérdida neuronal, característicos de esta enfermedad.

La interacción entre CD47 y subunidad  $\beta 3$  de integrinas resulta en la activación de Rac y en la formación de neuritas [108]. La interacción y formación de complejo celular entre CD47, integrina  $\alpha\beta 3$  y proteína G<sub>i</sub> heterotrimérica resulta en la propagación y adhesión celular. La asociación entre CD47 y la integrina  $\alpha\beta$  está aumentada en los microdominios de superficie celular denominados “rafts lipídicos”. De hecho, la conformación de CD47 se encuentra afectada por el colesterol dentro de los rafts lipídicos e induce una conformación favorable para la formación del complejo receptor [126].

Sin embargo, la activación y agregado de integrinas en rafts lipídicos, resultante de la interacción entre CD47 y integrinas  $\alpha\beta 3$  es independiente de colesterol [127] y lleva a la asociación de la cola citoplásmica de CD47 con proteínas denominadas PLICs (proteínas que unen filamentos intermedios a CD47), que establecen el nexo entre CD47 y el citoesqueleto.

Finalmente en células endoteliales adherentes, tanto las interacciones CD47/SIRP $\alpha$  como integrinas  $\beta 1$ /SIRP $\alpha$  son requeridas para inducir fosforilación de SIRP $\alpha$  mientras que para leucocitos, la fosforilación de SIRP $\alpha$  depende de la adhesión mediada por integrinas  $\beta 1$  y solo es aumentada por CD47 [128].

#### 1.4.5 CD47 Y SIRPs en Poblaciones Hematopoiéticas.

La interacción CD47/SIRP $\alpha$  regula distintos procesos en las diferentes poblaciones celulares hematopoiéticas.

Los macrófagos son capaces de distinguir lo “propio” de lo “extraño” a través de la unión de la porción amino terminal de SIRP $\alpha$  con el dominio inmunoglobulina extracelular de CD47. Esto fue descubierto al observar que eritrocitos deficientes de CD47 eran reconocidos y eliminados en ratones wild type (WT), sin embargo, en ratones deficientes de CD47 no eran eliminados [129].

SIRP $\alpha$  contiene 3 dominios tipo inmunoglobulina en su región extracelular, sin embargo, es únicamente el dominio tipo inmunoglobulina variable el que es responsable de la unión con el dominio tipo inmunoglobulina extracelular de CD47 [54]; tras su unión, solamente 2 de los cuatro sitios de fosforilación de tirosinas de SIRP $\alpha$  son fosforilados y son los que se encuentran en el extremo carboxilo terminal [54].

La fosforilación de los sitios de tirosina en el motivo ITIM de la cola citoplásmica de SIRP $\alpha$  propicia la asociación posterior de SHP-1 [130, 131] y SHP-2 [132], los cuales defosforilan dichos sitios y transmiten la señalización correspondiente. En el caso de SHP-1, señala hacia la desactivación de miosina IIA y de la actividad contractil del citoesqueleto a través de la defosforilación de la fosfotirosina 1805 que se encuentra en la cola de ensamblaje de la miosina no muscular IIA (NMMIIA) [133]. De esta manera, inhibe directamente la acumulación de miosina en la sinapsis fagocítica y su contribución en la fagocitosis, específicamente en la internalización de la célula. [133, 134].

La interacción CD47/SIRP $\alpha$  es especie específica. En el caso del ser humano, la afinidad de CD47 humana por SIRP $\alpha$  humana es 60 veces mayor que por SIRP $\alpha$  de ratón [135]. Para la unión CD47/SIRP $\alpha$  son esenciales 3 aminoácidos: Val57, Gln67 y Met102, ya que cuando son mutados en SIRP $\beta$  por los correspondientes en SIRP $\alpha$ , SIRP $\beta$  se convierte en proteína de unión a CD47 [136].

En linfocitos B, la unión CD47/SIRP $\alpha$  regula su movilidad. Induce cambios en la forma celular hacia una forma elongada y polarizada [137], provoca su agregación celular [106] e induce la adhesión celular a células endoteliales, importante para la extravasación de linfocitos B [138].

En linfocitos T, la interacción CD47/SIRP $\alpha$  inhibe la diferenciación de linfocitos T CD4 hacia fenotipo tipo Th1 mediante la inhibición de IL-12R $\beta$ 2 (una de las dos cadenas del receptor IL-12R) y la producción de IL-2 e IFN $\gamma$  [139,140]. De esta forma, CD47 funciona para limitar reacciones inflamatorias no deseadas [141].

El estatus de la expresión de CD47 discrimina a linfocitos T efectores de linfocitos T de memoria. Linfocitos T de memoria efectora, transitoria y diferenciada terminalmente son CD47<sup>low</sup> y son susceptibles a muerte inducida por trombospondina-1[142]. Por el contrario, linfocitos T “ingenuos” y de memoria central son CD47<sup>high</sup>, son las principales células productoras de IL-17 e IL-13 y dan origen a linfocitos T de memoria de largo plazo, y son resistentes a apoptosis por sobreexpresión de Bcl-2 [143].

La interacción CD47/SIRP $\gamma$  facilita la trasmigración endotelial de linfocitos T [144] a través de señalización independiente de la proteína Gi heterotrimérica [145]. La unión de CD47 endotelial resulta en la movilización intracelular de calcio y se encuentra enriquecida en invaginaciones podosomales que facilitan la migración transendotelial [146]. Además, la interacción CD47/SIRP $\gamma$  regula la adhesión célula-célula, mantiene el contacto entre linfocitos T y células presentadoras de antígeno con lo que aumenta la presentación del antígeno y estimula la proliferación celular y la secreción de citocinas [147].

La interacción CD47/SIRP $\alpha$  es necesario para la migración de células dendríticas a vasos linfáticos y posteriormente a ganglios linfáticos [148, 149] donde tiene un papel en la instrucción de células dendríticas a linfocitos T para su diferenciación. La unión CD47/SIRP $\alpha$  lleva a una reversión del fenotipo de célula dendrítica semimadura a inmadura, en un proceso independiente de otros como el de IL-10, provocando un

aumento en la capacidad endocítica, “clásica” de células dendríticas inmaduras y en una deficiente capacidad de estimulación de linfocitos T CD4 [150]. Además, la interacción CD47/SIRP $\alpha$  cis o trans en células dendríticas convencionales CD11c<sup>high</sup> CD4 promueve su supervivencia en órganos linfoides secundarios mediante fosforilación de residuos de tirosina en SIRP $\alpha$  [151].

CD47 es necesario para la migración transendotelial y transepitelial de neutrófilos [152, 153]. De hecho, para la migración transepitelial, los neutrófilos que migran expresan 3 veces más CD47 que cuando no se encuentran migrando. Esto es debido a que del 30 al 50% de CD47 intracelular que se encuentra en gránulos secundarios se redistribuye hacia la membrana plasmática. CD47 regula la migración de neutrófilos mediante el aumento de la activación de receptor tipo Toll 2 (TLR2) a través de una vía dependiente de Myd88 [154]. Neutrófilos apoptóticos tienen una reducción en los niveles de expresión de CD47 en la membrana celular y esta reducción sirve como marca para su fagocitosis por parte de macrófagos [155].

Finalmente, la unión CD47/SIRP $\alpha$  permite la multinucleación de macrófagos [156].

## **1.5. Papel de CD47 en Cáncer.**

### **1.5.1 CD47 en la Apoptosis.**

La unión de CD47 por medio de su ligando Trombospondina-1, del péptido agonista de trombospondina-1 4N1K o por su anticuerpo monoclonal (mAb) induce muerte celular independiente de caspasas en linfocitos T, monocitos, células dendríticas, células leucémicas y de cáncer de mama [120-123]. Esta muerte celular se caracteriza por cambios morfológicos en la célula; dilatación del aparato de golgi, redistribución del retículo endoplásmico alrededor del núcleo y encogimiento de la mitocondria, lo que correspondería a muerte celular programada tipo III o apoptosis tipo necrosis [157]. También, se inducen cambios bioquímicos como: translocación de fosfatidilserina, pérdida del potencial de membrana mitocondrial, producción de ROS y permeabilización del lisosoma.

La muerte celular inducida por CD47 requiere de la proteína Gi heterotrimérica ya que su bloqueo previene la muerte celular inducida por CD47 [120,122]. Este proceso ocurre rápidamente [121] y es iniciado tras la unión de TSP-1 con CD47, lo que regula la interacción entre CD47 y la proteína BNIP3. Esto ocasiona la traslocación a la mitocondria de BNIP3, que provoca la muerte mitocondrial por medio de la apertura del poro mitocondrial [111,158].

También, la muerte celular inducida por CD47 causa la translocación de la proteína Drp1 del citosol a la mitocondria, lo que induce la pérdida del potencial de membrana independiente de actividad GTPasa. Drp1 causa la disrupción de la actividad de transferencia de electrones del complejo 1 de la cadena respiratoria de la mitocondria (MRC) [157].

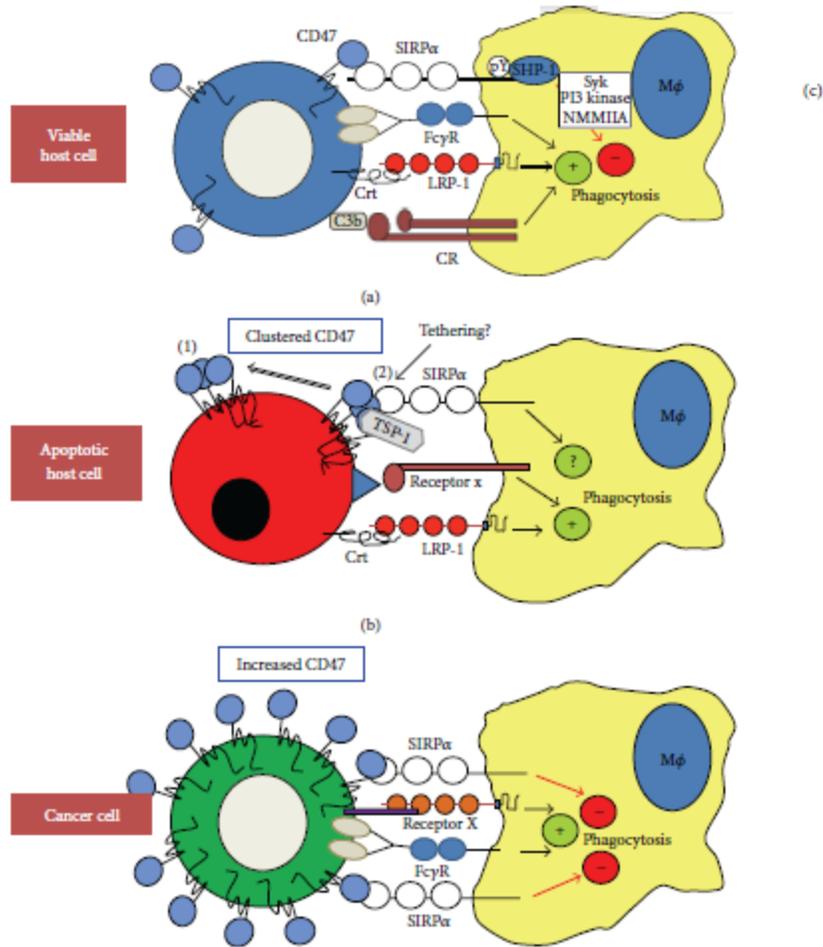
La muerte celular inducida por CD47, involucra la interacción de CD47 con el citoesqueleto, mediante la inducción de depolimerización de filamentos de actina y su degradación posiblemente por la vía Cdc42/WASP [123,159].

### **1.5.2 CD47 en diversos tipos de Cáncer.**

La transformación celular maligna involucra varias etapas que dan como consecuencia la proliferación desregulada, competición de nichos promotores de crecimiento, inhibición de diferenciación y promoción de invasión y sobrevida [45]. Los mecanismos por los cuales sobrevive una célula tumoral es a través de la evasión de la muerte celular y/o a través de la evasión de fagocitosis. Un mecanismo de evasión de la fagocitosis es la sobreexpresión de CD47 (*Figura 14*).

Uno de los primeros estudios sobre este mecanismo estableció que células madre hematopoiéticas de largo término, progenitores mieloides y granulocito-macrófagos incrementan la expresión de CD47 para protegerse a sí mismas de la fagocitosis mientras viajan a través de sinusoides donde hay fagocitos. También, las células madre hematopoiéticas poseen la habilidad de regular la expresión en superficie de PDL1 para evadir el rechazo por parte del sistema inmune adaptativo, incrementándose su expresión en circulación [160].

Este mecanismo fisiológico de sobreexpresión de CD47 es imitado por células de leucemia aguda mieloide y leucemia crónica mieloide para poder diseminarse hacia otras partes del cuerpo sin un control adecuado. La sobreexpresión de CD47 incrementa la patogenicidad de las células tumorales [161].



**Figura 14. Interacción de CD47 por parte de células hospederas con SIRPα y sobreexpresión de CD47 por parte de células tumorales.** (a) CD47 en células viables se une a SIRPα en una célula fagocítica como un macrófago (Mφ) lo que induce la inhibición de fagocitosis por medio de tirosin fosforilación de ITIMs de SIRPα y el reclutamiento de SHP-1. (b) En células apoptóticas, CD47 se agrega en la membrana plasmática y puede estar segregado lejos de los dominios que contienen a los ligandos de receptores profagocíticos. (c) Células tumorales pueden incrementar su expresión de CD47 para fortalecer las señales inhibitorias a través de SIRPα y para potenciar la inhibición de fagocitosis mediada por receptores Fcy y otros receptores profagocíticos. (Modificado de: Oldenberg, 2013, ISRN Hematology, pp:1-19).

### **1.5.2.1 CD47 en Tumores No Sólidos.**

El primer estudio en evaluar el papel de la expresión de CD47 en tumores no sólidos fue el hecho por Danielsen y colaboradores [162]. Estos investigadores observaron que, en la transición de gamopatía monoclonal de significancia incierta (MGUS) al desarrollo de mieloma múltiple (MM), la expresión de CD47 por células plasmáticas tiene un incremento de 10 veces. Sin embargo, la expresión de CD47 no parece ser importante una vez que las células migran de la médula ósea (Mieloma extramedular). En otro estudio, el tratamiento de mieloma múltiple con un anticuerpo bloqueador de CD47 inhibió el crecimiento tumoral aún después de interrumpir el tratamiento, con lo que, posiblemente la afectación se da en las células iniciadoras tumorales [163].

En leucemia linfocítica aguda (ALL) se encontró que, muestras de médula ósea de pacientes tienen un incremento en la expresión de CD47 dos veces mayor a la de sujetos normales. Para el caso de pacientes, aquellos con alta expresión de CD47 tenían peor pronóstico que pacientes con menor expresión de CD47 [164]. Células leucémicas con capacidad para autorrenovarse también evaden la fagocitosis a través del incremento en expresión de CD47. Este incremento en la expresión de CD47 predecía una peor sobrevida general [165].

Esto se hizo más evidente con el estudio desarrollado por Pang y colaboradores [166], donde observaron que, en el Síndrome Mielodisplásico (MDS), un grupo heterogéneo de enfermedades clonales relacionadas y caracterizadas por citopenias variables e incrementado riesgo de progresión a leucemia aguda mieloide, las células progenitoras de MDS de bajo riesgo exhiben una apoptosis incrementada y una baja expresión de CD47. Por otra parte, células progenitoras de MDS de alto riesgo, expresan altos niveles de CD47 y pueden evadir la fagocitosis, con lo que, en la progresión de MDS de bajo riesgo a alto riesgo se pierde la eliminación celular programada mediante el incremento en la expresión de CD47.

En células de linfoma Non Hodgkin, el incremento en la expresión de CD47 se correlaciona con pronóstico adverso en diversos subtipos. Además la terapia combinatoria Rituximab (anti-CD20, tratamiento estándar para el linfoma non Hodgkin) y anti-CD47 tiene un mayor efecto que el logrado por Rituximab solo [167]. En modelo murino, se observó que, la administración de anti-CD47 una vez formado el tumor, previene la diseminación de células de linfoma non Hodgkin hacia sitios secundarios. En pacientes, se encontró un incremento 2 veces mayor en la expresión de CD47 en sangre periférica con respecto al sitio primario, con lo que, la diseminación de células de linfoma non Hodgkin está asociada a incremento en la expresión de CD47 [168].

### **1.5.2.2 CD47 en Tumores Sólidos**

La expresión de CD47 en tumores sólidos ha sido evaluada en cáncer de mama [169, 170], colon [171, 172], ovario [171], vejiga [171, 173], glioblastoma [171], cáncer de próstata [171], carcinoma hepatocelular [171], leiomioma [174,175] y rhabdiodiosarcoma [176].

Al respecto, Zhao y colaboradores [170] reportaron que CD47 se encontraba sobreexpresado en muchos tumores y su expresión se correlacionaba con pobre pronóstico en los subtipos basal, her2 positivos, y con características patológicas adversas en subtipos, receptor de estrógenos negativo, receptor de progesterona negativo. Además, la acción de Trastuzumab (tratamiento estándar para cáncer de mama) mediado por neutrófilos es potenciada por anticuerpo bloqueador de unión de CD47 a SIRP $\alpha$ . Previamente, se había reportado sobreexpresión de CD47 en médula ósea y en sangre periférica en pacientes con cáncer de mama, así como una correlación mayor en las expresiones de CD47 y SIRP $\alpha$  en pacientes con respecto a controles [169].

Willingham y su grupo de investigación [171] reportaron que en células tumorales de pacientes con cáncer de ovario, colon, vejiga, glioblastoma, carcinoma hepatocelular y cáncer de próstata, la expresión de CD47 se encontraba en promedio 3.3 veces mayor que en células normales. Por su parte, en pacientes con cáncer de ovario y

glioblastoma, la alta expresión de CD47 se asociaba a una reducción en la supervivencia global.

También, fue reportada una sobreexpresión de CD47 en leiomioma con respecto a leiomioma, y tratamiento con anticuerpo bloqueador de CD47 inhibe el crecimiento tumoral y la metástasis [174, 175].

En rhabdomioma se observó que, la expresión génica de CD47 es mayor en muestras de rhabdomioma (RMS) con respecto a muestras de músculo esquelético; la alta expresión de CD47 correlaciona con subtipos de mayor agresividad [176].

En pacientes con cáncer de vejiga, fue reportado que CD47 se encuentra expresado en la mayoría de células tumorales pero su expresión es mayor en células iniciadoras tumorales [173]. Los tejidos de pacientes con cáncer de colon tienen incrementada la expresión de CD47 en comparación con biopsias de sujetos normales [172].

En otro estudio con pacientes con cáncer de mama metastásico progresivo, se identificaron a células iniciadoras de metástasis (MIC) como células con fenotipo EPCAM+ CD44+ CD47+ MET+ [177]. También en cáncer de mama, otro estudio evaluó 28 marcadores en cultivos celulares provenientes de varios tipos de cáncer de mama y en líneas celulares, de los cuales CD47 fue reportado con una expresión alta y similar a la del marcador CD54 asociado al fenotipo de célula madre mesenquimal [178].

Varias líneas celulares de Mesotelioma maligno expresan en alto grado CD47 junto con otros marcadores como CD46, CD56, CD63 y marcadores de mesotelioma como mesotelina y el marcador de célula madre BMI-1 [179].

## **1.6 CD47 como Agente Terapéutico y Biomarcador en Cáncer.**

En 2 estudios independientes se estableció entre otras cosas, que existe un incremento en la expresión de CD47 en sangre periférica y no solo en el sitio tumoral.

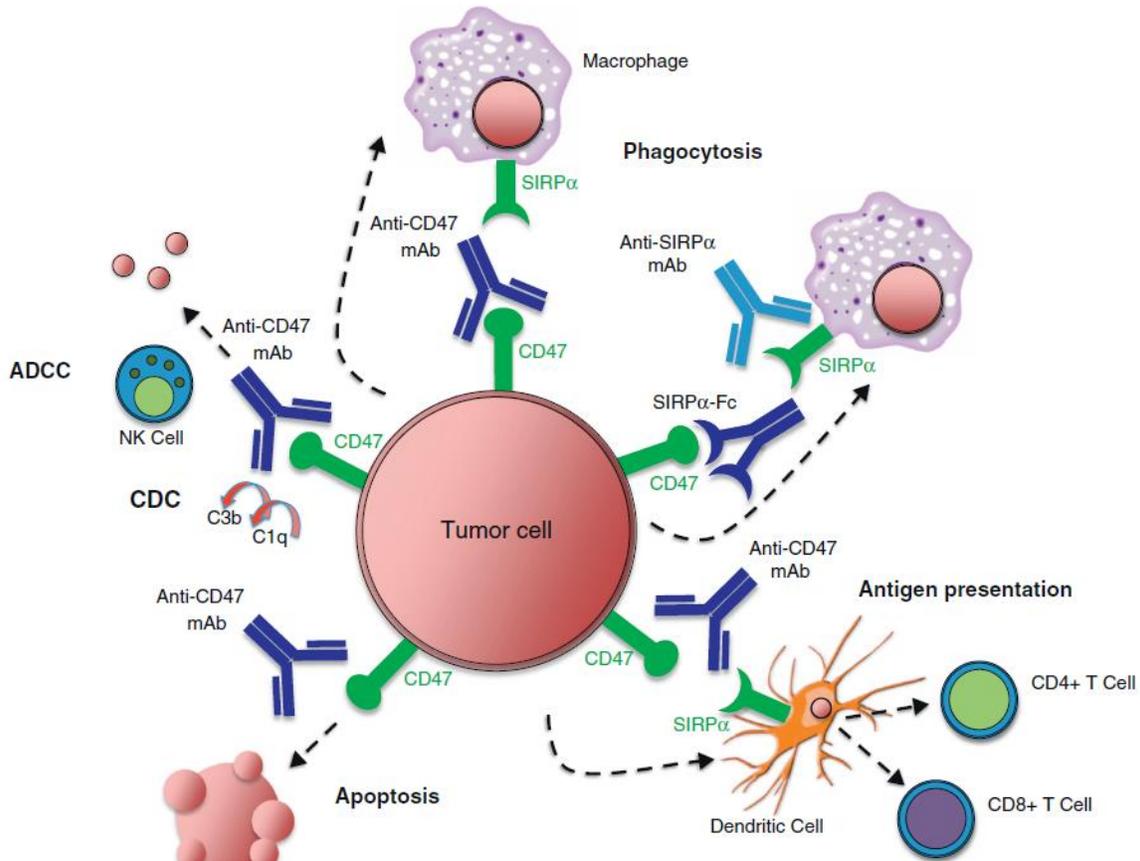
En el terreno de los tratamientos terapéuticos, CD47 ha sido propuesto como un agente terapéutico muy prometedor debido a entre otras cosas, su capacidad para fagocitar células tumorales mediante la disrupción de su unión con SIRP $\alpha$ , a través de diferentes mecanismos: a través de mecanismos dependientes de Fc como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) o la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), para eliminar células tumorales por inducción de apoptosis de manera selectiva. Además, puede ser utilizado en terapias combinatorias junto con fármacos específicos de ciertos tipos de cáncer (Rituximab, Trastuzumab) [180] (*Figura 15*).

Sin embargo, los estudios de Chao y colaboradores en el caso de linfoma Non Hodgkin y el reporte de Makoto Nagahara en cáncer de mama le dan un nuevo posible papel como biomarcador en cáncer.

Chao y colegas encontraron un incremento 2 veces mayor en la expresión de CD47 en sangre periférica con respecto al sitio primario tumoral, mientras que Nagahara y su grupo encontraron que la expresión a nivel proteico de CD47 es significativamente más alta en sangre periférica de pacientes con respecto a sujetos control.

Esto aunado a lo reportado por Baccelli y colegas, que células iniciadoras de metástasis tienen en su fenotipo la expresión de CD47, junto con lo descrito para varios tipos de cáncer sobre la importancia de CD47 para la diseminación de células tumorales, da un nuevo papel a la determinación de los niveles de expresión de CD47 más allá del sitio primario tumoral.

Además, en diferentes tipos de cáncer, la expresión alta de CD47 se correlaciona con una sobrevida global reducida y un pronóstico adverso, con lo que CD47 podría funcionar como un marcador pronóstico de sobrevida global.



**Figura 15. Mecanismos para establecer como blanco la vía CD47-SIRP $\alpha$  en cáncer.** El enfoque terapéutico que marca la vía CD47-SIRP $\alpha$  elimina células tumorales por diferentes mecanismos. Primero, inhibición de la interacción CD47-SIRP $\alpha$  con anticuerpo bloqueante anti-CD47, anti-SIRP $\alpha$  o con una proteína SIRP $\alpha$  recombinante lleva a la fagocitosis de células tumorales por parte de macrófagos. Segundo, un anticuerpo anti-CD47 puede eliminar células tumorales a través de mecanismos dependientes de Fc (ADCC, CDC). Tercero, anti-CD47 puede estimular directamente la apoptosis de células tumorales a través de mecanismo independiente de caspasas. Cuarto, anti-CD47 puede permitir la fagocitosis de células tumorales por células dendríticas y la posterior presentación de antígeno a linfocitos T CD4 y CD8, estimulando una respuesta inmune antitumoral. (Modificado de: Chao, Weissman y Majeti, 2012, *Curr Opin Immunol* 24: 1-8)

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Un dato preocupante respecto al cáncer de pulmón es que su incidencia está relacionada al nivel socioeconómico; es decir, en países en desarrollo se diagnostican más casos nuevos de cáncer pulmonar en comparación con los países desarrollados en donde la incidencia ha comenzado a disminuir [181].

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

CD47 es un receptor de membrana que se encuentra en todas las células hematopoiéticas y cuya expresión está incrementada en diferentes tumores. La unión de CD47 con su ligando SIRP $\alpha$  funciona como un marcador de “células propias”.

El bloqueo de la unión de CD47 a SIRP $\alpha$  permite la fagocitosis de células tumorales de manera selectiva, por lo que se le ha propuesto como un agente terapéutico muy prometedor.

El presente estudio propuso evaluar la expresión del receptor CD47 en células de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón así como realizar correlaciones clínicas de las tasas de supervivencia global de pacientes en relación con los niveles de expresión de CD47 y proponer a CD47 como posible biomarcador pronóstico.

### **III. HIPÓTESIS**

CD47 se encuentra sobreexpresado en sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) y en neutrófilos con respecto a sujetos control y su expresión en pacientes funciona como biomarcador pronóstico.

## **IV OBJETIVOS.**

### **4.1. Objetivo General.**

Evaluar la expresión de CD47 total y en neutrófilos en muestras de sangre periférica de pacientes con cáncer pulmonar (adenocarcinoma) en estadios clínicos IIIA, IIIB, IV y en sujetos sanos, determinar si dicha expresión se correlaciona con las características clínicas de pacientes estudiados y su posible función como biomarcador pronóstico.

### **4.2 Objetivos Específicos**

1. Evaluar la expresión de CD47 total y en neutrófilos en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) y en sujetos control.
2. Estudiar las posibles correlaciones de la expresión diferencial del receptor CD47 con los parámetros clínicos estudiados.
3. Evaluar el valor pronóstico de la expresión diferencial de CD47 en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP).

## **V METODOLOGÍA.**

### **5.1 Población de estudio.**

Se seleccionaron sujetos con diagnóstico confirmado de cáncer de pulmón de la estirpe histológica adenocarcinoma, reclutados para este estudio en colaboración con el Instituto Nacional de Cancerología.

Se formaron dos grupos de sujetos; un grupo control y un grupo de pacientes en etapas clínicas III/IV. Los pacientes incluidos en el estudio fueron reclutados y clasificados según la estirpe histológica y el estadio de la enfermedad, el cual se determinó según una combinación de criterios radiológicos, patológicos y quirúrgicos, de acuerdo con el sistema TNM para la clasificación del cáncer de pulmón, recomendado por el Comité Americano para el Cáncer.

El diagnóstico histológico de cáncer pulmonar de células no pequeñas primario, se estableció de acuerdo a la clasificación de tumores pulmonares de la Organización Mundial de la Salud y de la Asociación Internacional para el estudio del Cáncer de Pulmón. La evaluación preclínica incluyó el examen físico, pérdida de peso y estado físico general con un índice de  $\leq 2$  de acuerdo con las normas del ECOG (Eastern Cooperative Oncologic Group Scale).

## 5.2 Criterios de inclusión

### a) Pacientes con cáncer pulmonar:

Se incluyeron aquellos pacientes que junto con un cuadro clínico-radiológico compatible con cáncer de pulmón, cumplan al menos una de las siguientes condiciones y que no hubieran recibido radioterapia y/o quimioterapia previa a la obtención de las muestras a analizar.

1. Citología positiva para malignidad en esputo, aspirado bronquial, cepillado bronquial, punción aspirativa pulmonar, líquido pleural o punción de otras localizaciones metastásicas.
2. Biopsia positiva para malignidad de origen bronquial, transbronquial, pleural, pulmonar percutánea, pulmonar por toracotomía o de localizaciones metastásicas.

### b) Sujetos sanos:

1. Se incluyeron aquellos que reportaron ningún hábito tabáquico al menos en los últimos 10 años o bien un índice tabáquico similar al paciente estudiado.
2. Se incluyeron en el estudio aquellos sujetos con una evaluación clínica que permitió validar su condición como individuos no enfermos.

### **5.3 Criterios de exclusión**

#### **a) Pacientes con cáncer pulmonar**

1. Se excluyeron aquellos sujetos en los que existiese la posibilidad de que la lesión pulmonar fuera metastásica o con un tipo histológico diferente al adenocarcinoma
2. Aquellos pacientes que requieren un cambio en la dosis de los medicamentos administrados
3. Aquellos que recibieron tratamiento quirúrgico, radiológico o de quimioterapia previo.
4. Sujetos con inflamaciones agudas.
5. Sujetos con infección por VIH u otras inmunodeficiencias
6. Sujetos con infecciones no controladas.
7. Se excluyeron aquellos sujetos que no estuvieron de acuerdo en participar en el estudio.

#### **b) Sujetos sanos:**

1. Se excluyeron aquellos en los que se tenga sospecha de lesiones pulmonares de tipo neoplásico con los mismos criterios que regirán para los pacientes con diagnóstico positivo para cáncer de pulmón.
2. Aquellos sujetos que tienen antecedentes familiares de cualquier tipo de cáncer.
3. Sujetos con otro diagnóstico oncológico.
4. Sujetos con enfermedades autoinmunes (VIH, artritis, lupus, etc).
5. Aquellos que no estuvieron de acuerdo en participar en el estudio.

#### **5.4 Obtención de células polimorfonucleares (PMNs).**

Previo consentimiento informado y antes de recibir algún tratamiento, se obtuvo una muestra de sangre periférica de 8 ml de cada sujeto incluido en el estudio, (pacientes y controles). Se emplearon células polimorfonucleares (PMNs) de los diferentes grupos de pacientes y sujetos control, separadas por el gradiente de densidad Ficoll Polymorphprep™ (Axis Shield, Oslo, Noruega). El estudio de la expresión de CD47 se realizó a partir de 50 µl de sangre completa por cada combinación de anticuerpos.

#### **5.5 Inmunofenotipificación de células polimorfonucleares (PMNs) de sangre periférica.**

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales para la inmunofenotipificación de células polimorfonucleares: Anti-CD15 (clona W6D3, Biolegend, San Diego CA, USA), anti-CD47 (clona CC2C6, Biolegend, San Diego CA, USA), anti-CD66b (clona G10F5, Biolegend, San Diego CA, USA).

#### **5.6 Determinación de la expresión del receptor CD47 por Citometría de flujo.**

A partir de 50 µl de sangre completa, se agregó el bloqueador Fc True Stain FcX (Biolegend, San Diego CA, USA) para evitar pegado inespecífico. A continuación se agregaron los anticuerpos correspondientes en volúmenes respectivos durante 25 min, tras lo cual se lisaron eritrocitos por medio de Buffer de lisis (BD Biosciences, San José CA, USA). Posteriormente, las células se centrifugaron (8 min, 1100 rpm) se lavaron con PBS- 2% SFB y finalmente se fijaron en 200 µl p-formaldehído. Las células fueron adquiridas en el citómetro de flujo FACSAria I (BD Biosciences, San José CA, USA) y analizadas con el Software FlowJo IX. (Treestar, Inc, Ashland, Or, USA). Fueron adquiridos 100,000 eventos.

## 5.7 Análisis estadístico.

Los eventos o variables de desenlace que se evaluaron fueron:

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

Variable independiente: adenocarcinoma.

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

Con el fin de describir los valores de las variables continuas se emplearon como medidas de tendencia central la media o la mediana y como medidas de dispersión la desviación estándar o los valores mínimo y máximo, dependiendo de la distribución paramétrica o no de los datos. La comparación entre las características generales de controles y pacientes con Cáncer Pulmonar de Células no Pequeñas (NSCLC) (adenocarcinoma) de variables continuas se realizó con la prueba t de Student o con su alternativa no paramétrica U de Man-Whitney cuando esté indicado de acuerdo a su distribución. El análisis de variables nominales u ordinales se efectuó con prueba de X<sup>2</sup> o prueba exacta de Fisher. Se consideró un valor significativo de p cuando éste sea  $\leq 0.05$ . No se ajustó por comparaciones múltiples. En el grupo de pacientes se asoció la expresión de CD47 con las variables clínico-patológicas como edad, género, histología y estadio clínico. Y las variables significativas se utilizaron en un análisis multivariado de regresión logística. Se analizó la sobrevida global de pacientes de acuerdo a la mediana de la expresión de CD47 con Kaplan-Meier y comparado con log-Rank. Las variables estadísticamente significativas que presentaron una  $p < 0.1$ , fueron incluidas en análisis multivariados utilizando el modelo de Cox. Se utilizó el programa de análisis estadístico SPSS (V. 14.0; SPSS, Inc., Chicago, IL).

## VI. RESULTADOS.

### 6.1 Características clínico-demográficas de los pacientes estudiados.

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

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

**Tabla 3.** Características clínico-demográficas de los sujetos estudiados.

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

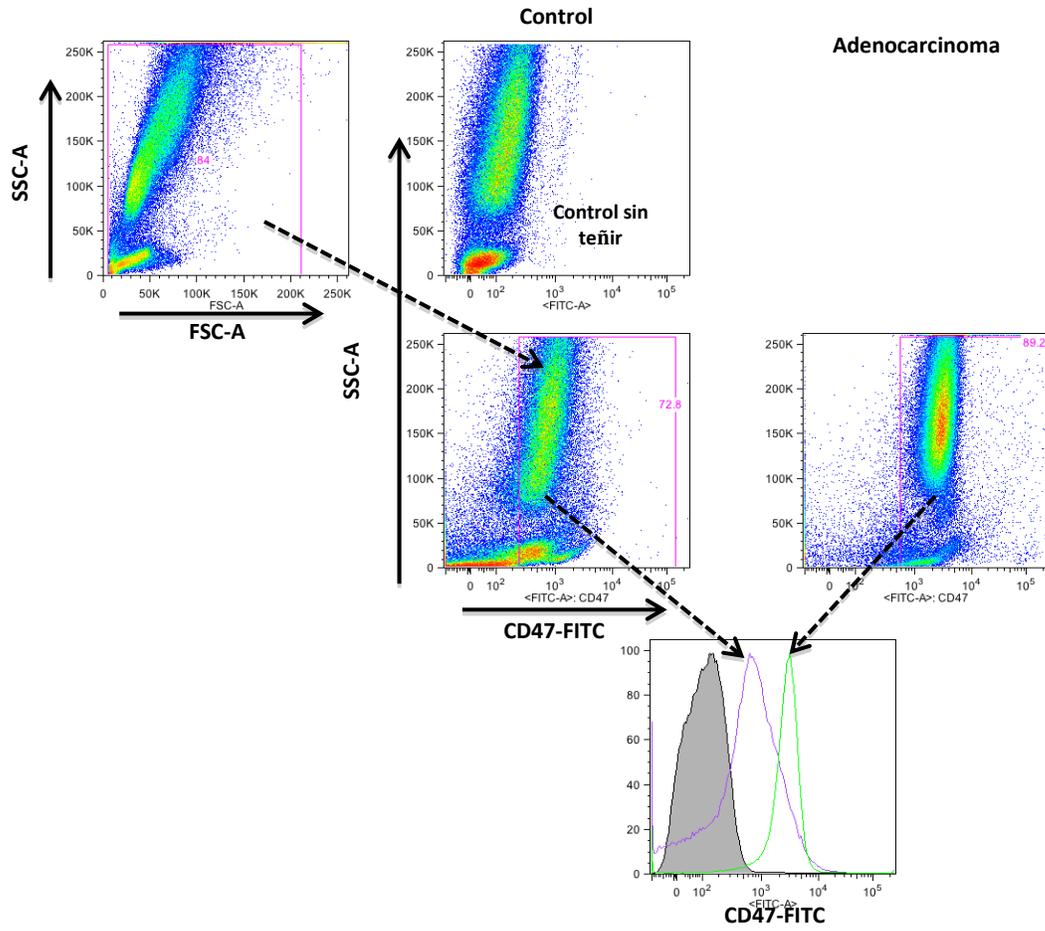
**DM2:** Diabetes mellitus tipo 2; **HTAS:** Hipertensión arterial sistémica

## **6.2 Frecuencia de la expresión del receptor de CD47 total y en neutrófilos en sangre periférica de sujetos control y pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas**

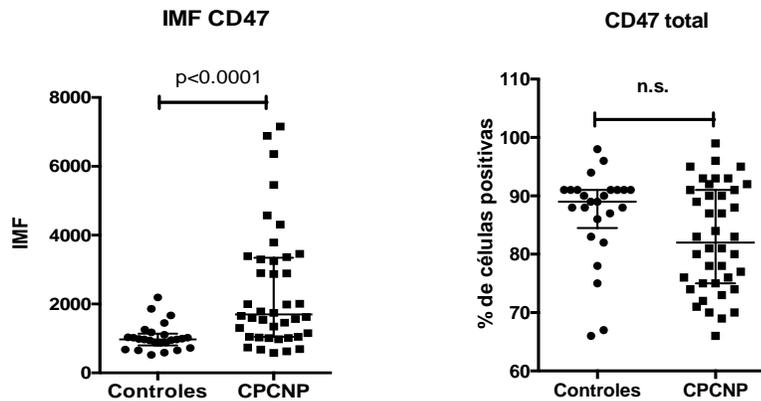
Se evaluó la expresión de superficie del receptor CD47 total por citometría de flujo en células de sangre periférica y específicamente en neutrófilos. Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron la presencia incrementada de neutrófilos en pacientes con cáncer de pulmón avanzado (datos no publicados)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

La estrategia de análisis para la expresión de CD47 total consistió en realizar una región donde se localizan las células sanguíneas, según su patrón de expresión de tamaño y complejidad (FSC-A vs SSC-a) (*Figura 16*). De esta región se realizó una ventana para el análisis de la intensidad media de fluorescencia en un histograma para ambos tipos de sujetos.

En la *figura 17* se muestra la distribución de la frecuencia de este receptor en los dos grupos estudiados (pacientes y sujetos sanos). No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células que lo expresan. Sin embargo la evaluación por intensidad media de fluorescencia indicó que los pacientes con adenocarcinoma pulmonar expresan más del doble de número de receptores por célula ( $p < 0.0001$ ) (*Figura 17*) (*Tabla 4*).



**Figura 16.** Estrategia de análisis de la expresión de CD47 en sujetos control y pacientes con adenocarcinoma.



**Figura 17.** Distribución de la frecuencia de la expresión membranal de CD47 e intensidad media de fluorescencia.

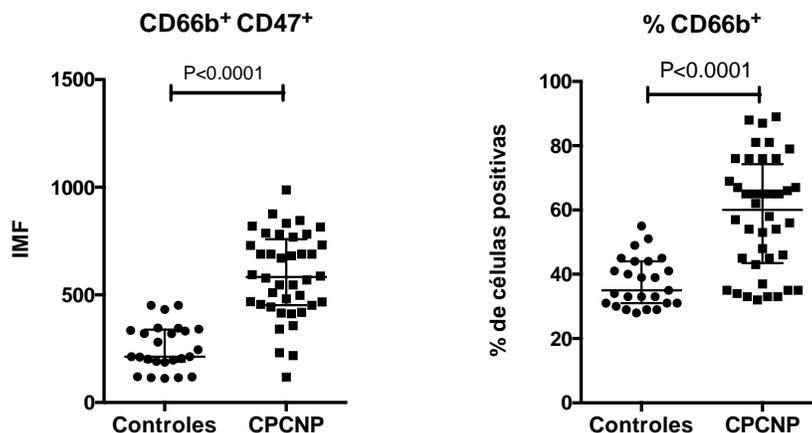
Posteriormente, se evaluó el porcentaje de neutrófilos en sangre periférica de pacientes y sujetos control. Los neutrófilos fueron caracterizados por citometría de flujo como CD66b+ CD15+. La frecuencia de neutrófilos se encontró incrementada significativamente en pacientes con CPCNP comparado con sujetos sanos ( $p=0.0001$ ) (Figura 18).

Por otra parte, la intensidad media de fluorescencia de CD47 en los neutrófilos de sangre periférica se encontró incrementada en pacientes comparada con controles ( $p=0.0001$ ).

**Tabla 4.** Frecuencia de la expresión de CD47 total y en neutrófilos.

	<b>Casos (N=40)</b>	<b>Controles (N= 25)</b>	<b>p</b>
<b>IMFCD47</b>	2402 (579-7155)	1042 (523-2192)	<0.0001
<b>%CD47**</b>	83.1%	87.2%	0.058
<b>%CD66b+ CD15+</b>	58.2%	37.5%	0.0001
<b>IMFCD47de %CD66b+ CD15+</b>	589.07 (+/-197.5)	255.9 (+/-106.6)	0.0001

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



**Figura 18.** Distribución de la frecuencia de la expresión membranar de CD47 e intensidad media de fluorescencia en neutrófilos CD66b<sup>+</sup>.

### **6.3 Correlación de características generales de los pacientes con cáncer de pulmón con la densidad de expresión del receptor CD47.**

Se realizó la correlación de las características generales de la población con la densidad de expresión del receptor CD47 (intensidad media de fluorescencia) del grupo de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas, encontrando mayor densidad de expresión de acuerdo al estadio clínico (III vs IV; 1000.60 vs 2602.34;  $p=0.0001$ ), enfermedad oligometastásica (Ausente vs presente; 1620.66 vs 2694.37;  $p=0.002$ ) y con la cantidad de albúmina (Hipoalbuminemia vs normal; 2817.75 vs 1778.68;  $p=0.047$ ).

No se encontraron diferencias entre el resto de las características clínicas y la densidad de expresión del receptor CD47, así como la cantidad de neutrófilos (CD66b+ CD15+) y en neutrófilos CD66b+ CD15+ pero que coexpresan CD47 (CD47MFI de CD66b+ CD15+) (Tabla 5).

**Tabla 5.** Características clínicas de los pacientes estudiados.

	IMF CD47	<i>p</i>	%CD47 <sup>+</sup>	<i>p</i>	%CD66b+ CD15+	<i>p</i>	CD66b <sup>+</sup> CD15+ IMFCD47	<i>p</i>
Genero								
Femenino	2540.52	0.562	84.98	0.138	57.70	0.815	546.95	0.102
Masculino	221.88		80.57		59.09		646.05	
Edad								
< 60 a	2843.25	0.111	81.30	0.211	61.23	0.299	591.15	0.948
> 60 a	1961.00		84.91		55.36		587.00	
Tabaquismo								
Ausente	2214.39	0.464	84.04	0.446	59.41	0.643	567.82	0.428
Presente	2656.11		81.84		56.78		617.82	
Humo de leña								
Ausente	2814.73	0.082	84.58	0.238	59.05	0.758	570.52	0.482
Presente	1843.88		81.10		57.27		614.17	
Diabetes								
mellitus tipo 2	2260.34	0.310	82.91	0.738	58.34	0.976	601.54	0.496
Ausente	3394.60		84.46		58.00		501.80	
Presente								
Hipertensión								
Ausente	2622.03	0.159	82.87	0.816	60.5	0.185	600.32	0.589
Presente	1889.00		83.64		53.1		562.83	
Histología								
Adenocarcinoma	2383.60	0.90	83.80	0.198	59.38	0.306	594.37	0.584
Otros	2531.80		78.20		50.66		552.00	
Estadio Clínico								
III	1000.60	0.0001	82.60	0.906	54.00	0.438	584.8	0.960
IV	2602.34		83.17		58.91		589.68	

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

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

#### **6.4 Sobrevida global de los pacientes relacionada con densidad de expresión del receptor CD47.**

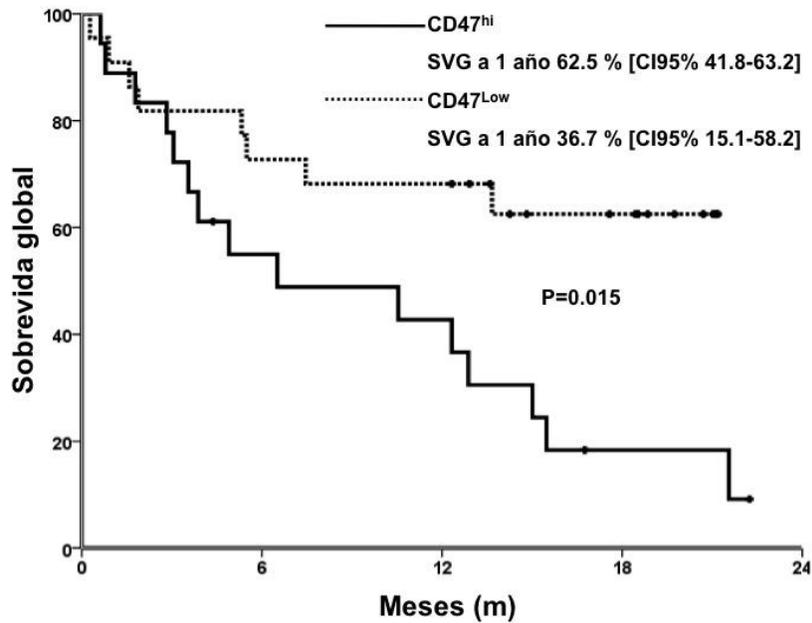
La sobrevida global se analizó de acuerdo a la frecuencia y densidad de expresión del receptor CD47 total, así como la cantidad de neutrófilos (CD66b+ CD15+) y de neutrófilos CD66b+ CD15+ pero que coexpresan CD47 (CD47MFI de CD66b+ CD15+). (Tabla 6)

**Tabla 6.** Sobrevida global de pacientes CPCNP.

	Supervivencia (mediana en meses)	Intervalo de confianza 95%	<i>p</i>
<b>IMF CD47</b>			
Bajo	9.67	11.54 – 18.57	0.001
Alto	No se alcanza	6.16 – 13.18	
<b>%CD47<sup>+</sup></b>			
< 83%	13.7	9.9 – 17.4	0.801
> 83%	12.9	2.2 – 23.5	
<b>%CD66b<sup>+</sup> CD15+</b>			
< 60	15	9.2 – 20.8	0.593
> 60	12.9	2.5 – 23.3	
<b>IMFCD47de %CD66b<sup>+</sup></b>			
<b>CD15+</b>			
< 582	21.5	11.0 – 30.5	0.011
> 582	5.5	0– 13.2	

**IMF:** Intensidad media de fluorescencia

En los pacientes que presentaron incrementada la densidad de expresión del receptor CD47, no se alcanzó la mediana supervivencia, por lo que se realizó la medición de supervivencia a 1 año siendo ésta del 36.7% (IC 95% 41.8-62.5,  $p= 0.015$ ) a diferencia de aquellos pacientes que presentaron niveles bajos de densidad de expresión del receptor de CD47, siendo la mediana de supervivencia de 9.67 meses (IC 95% 6.16–13.18,  $p=0.001$ ), la supervivencia a 1 año fue del 62.5% (IC 95% 15.1-58.2,  $p=0.015$ ) siendo esta diferencia estadísticamente significativa (*Figura 19*).

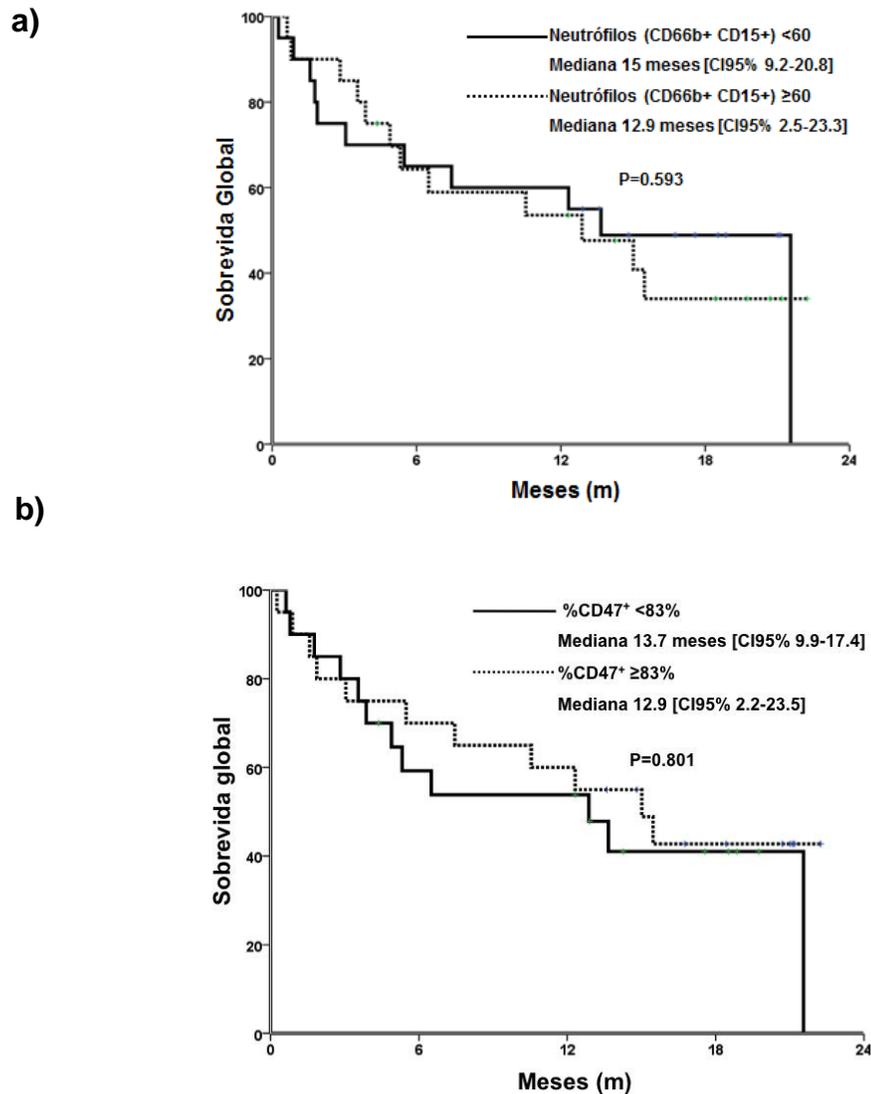


**Figura 19.** Sobrevida global a 1 año en pacientes con expresión alta y baja de CD47.

Se buscó si existían diferencias en la supervivencia global de acuerdo a la frecuencia de neutrófilos encontrados en sangre periférica, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos. La frecuencia baja de neutrófilos CD66b+ CD15+ presentó una mediana de supervivencia global de 15 meses (IC 95% 9.2-20.8,  $p=0.593$ ) a diferencia de los pacientes que presentaron un incremento en la frecuencia de neutrófilos CD66b+ CD15+ en sangre periférica, siendo la supervivencia global de 12.9 meses (IC 2.5-23.32,  $p=0.593$ ) (Figura 20a).

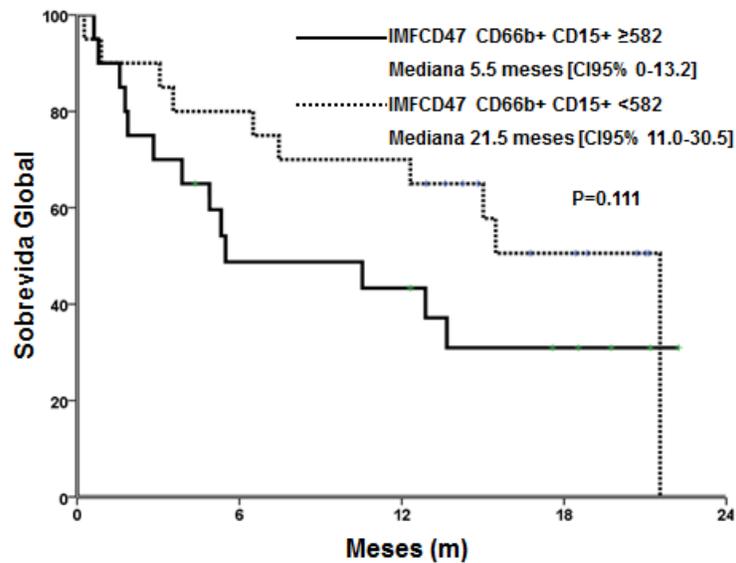
Del mismo modo se analizó la frecuencia del receptor CD47 total en sangre periférica, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas.

En pacientes con menos de 83% de frecuencia CD47 total, la mediana de supervivencia fue de 13.7 meses (IC 95% 9.9-17.4) vs 12.9 meses (IC 95% 2.2-23.5), para pacientes con más de 83% de frecuencia total de CD47,  $p=0.801$  (Figura 20b).



**Figura 20.** Supervivencia global a 1 año en relación al porcentaje de a) neutrófilos y de b) CD47 evaluados en los pacientes con CPCNP.

En cuanto a la relación de la supervivencia global con neutrófilos CD66b+ CD15+ pero que co-expresa CD47 (CD47MFI de CD66b+ CD15+) se encontró que aquellos pacientes que presentan disminución de la expresión de CD47MFI de neutrófilos presentaron una mediana de supervivencia de 21.5 meses (IC 95% 11.0-30.5) a diferencia de aquellos pacientes que presentaron sobreexpresión de CD47MFI de neutrófilos cuya supervivencia fue de 5.5 meses (IC 95% 0.0-13.2), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.011$ ) (Figura 21).



**Figura 21.** Supervivencia global a 1 año en pacientes con CPCNP en relación a la intensidad medida de fluorescencia de CD47 sobre neutrófilos (CD66b<sup>+</sup>).

## VII. DISCUSIÓN.

CD47 se encuentra expresado en todas las poblaciones hematopoiéticas, en mayor o menor grado [182].

La interacción entre CD47 y su ligando SIRP $\alpha$  regula distintos procesos en las diferentes poblaciones hematopoiéticas. Por ejemplo, en linfocitos B regula la movilidad e induce la adhesión celular a células endoteliales [137, 138], en linfocitos T CD4 inhibe su diferenciación hacia fenotipo Th1 [139, 140] y el estatus de su expresión diferencia linfocitos T efectores de linfocitos T de memoria [142, 143]. En células dendríticas es necesario para la migración a vasos linfáticos y a ganglios linfáticos [148, 149] y en macrófagos, inhibe la fagocitosis de células objetivo [49-53] y permite la multinucleación [156], entre otros.

La inhibición del proceso de fagocitosis celular a través de su unión con SIRP $\alpha$  ha convertido a CD47 en un agente terapéutico muy prometedor. Al respecto, células tumorales de diversos tipos de cáncer tienen incrementada la expresión de CD47 [162, 164, 167, 169-174, 176] con lo que inhiben su fagocitosis por parte de macrófagos. El uso de anticuerpo bloqueante de interacción CD47/SIRP $\alpha$  permite la fagocitosis de células tumorales [161, 163-165, 167, 171, 173, 174, 176]. También, el efecto de anticuerpo anti-CD47 en modelos murinos mostró que inhibe el crecimiento tumoral [161, 163, 171, 173, 174]. Además, anti-CD47 previene metástasis de células tumorales [164, 168, 171, 173].

Sin embargo, a pesar de que CD47 es una molécula muy atractiva como agente terapéutico en el sitio primario tumoral, pocos estudios han determinado y/o resaltado la expresión de CD47 en sangre periférica y su importancia en el resultado clínico de pacientes con cáncer. Solamente, Nagahara y colaboradores [169] para el caso de cáncer de mama y Chao y colegas [167] para linfoma Non Hodgkin han reportado incrementada la expresión de CD47 en sangre periférica. Pero, para el caso de linfoma Non Hodgkin, Chao y colegas compararon la expresión de CD47 de células B de linfoma non hodgkin con la expresión de linfocitos B únicamente. Por otra parte,

Nagahara y colaboradores analizaron la expresión de CD47 a nivel ARN mensajero y no a nivel proteico.

En el presente estudio, evaluamos la frecuencia y densidad de expresión de CD47 en sangre periférica en pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCNP). La frecuencia de CD47 total en sangre periférica fue similar entre pacientes y controles, esto debido a que CD47 es una proteína ubicua entre la población celular hematopoiética. Por otra parte, la cantidad de receptores CD47 por célula (IMF) de pacientes fue más del doble de las de controles (1698 vs 971). Lo anterior sugiere que aunque la frecuencia de CD47 es similar entre pacientes y controles, poblaciones celulares hematopoiéticas de pacientes sobreexpresan CD47.

La frecuencia de neutrófilos (CD66b+ CD15+) fue mayor en pacientes (58.2%) comparada con sujetos control (37.5%) y fue estadísticamente significativa. La neutrofilia es un mecanismo ya reconocido y presente en diferentes tipos de cáncer [183].

La asociación entre cáncer e inflamación crónica esta reportada para diversos tipos tumorales. Por ejemplo, el riesgo de incidencia de cáncer colorectal es 10 veces mayor si está relacionado con alguna enfermedad inflamatoria del intestino como colitis ulcerativa o enfermedad de Crohn. Así también, el riesgo de incidencia de cáncer esofágico, pancreático y de vejiga se incrementa por enfermedades inflamatorias como esofagitis, metaplasia de Barrett y pancreatitis crónica [2].

Leucocitos y otras células del sistema inmune infiltran el sitio tumoral y establecen el microambiente inflamatorio tumoral. Además, este proceso es facilitado por células tumorales que atraen a células del sistema inmune mediante la producción de citocinas y quimiocinas [2].

Los macrófagos y neutrófilos son de las principales células del sistema inmune que infiltran el sitio tumoral. En el caso de macrófagos, existen 2 tipos de macrófagos con base en su fenotipo. Los macrófagos activados alternativamente (M2) promueven el crecimiento tumoral al proveer de un microambiente inmunosupresor. Los macrófagos asociados a tumor (TAMs) son de fenotipo M2 y dentro del tumor contribuyen a la

inflamación crónica que beneficia también la angiogénesis y metástasis tumoral. Los neutrófilos asociados a tumor (TANs) son de fenotipo N2 y una vez infiltrados en el tumor, estimulan la angiogénesis y el crecimiento tumoral [31-33,184].

Existen en la actualidad diversos marcadores de inflamación crónica como: proteína C reactiva, hipoalbuminemia, radio neutrófilo/linfocito y conteos absolutos de neutrófilos y leucocitos, entre otros [185]. La cantidad incrementada de neutrófilos en circulación (neutrofilia) se ha reportado en diversos tipos de cáncer incluido cáncer de pulmón y está relacionada con un pronóstico pobre para el paciente [183, 186].

Posteriormente, quisimos evaluar si estos neutrófilos incrementados en circulación tenían sobreexpresado CD47. Encontramos que la expresión de CD47 en neutrófilos tenía un incremento más de 2 veces mayor al de sujetos control. CD47 es necesario para la migración de neutrófilos, de hecho neutrófilos que se encuentran migrando expresan 3 veces más CD47 que cuando no se encuentran migrando [153]. Además, células tumorales pueden regular el reclutamiento de neutrófilos hacia el tumor primario mediante la secreción de citocinas como IL-8 [187]. Estos resultados sugieren que la alta frecuencia de neutrófilos en circulación junto con el incremento de expresión de CD47 en su superficie plasmática pueden deberse al reclutamiento de neutrófilos promovido por células tumorales al igual que por otros neutrófilos.

Evaluamos la asociación de la frecuencia y la intensidad de fluorescencia de CD47 total, así como la frecuencia de neutrófilos en circulación y la densidad de expresión de CD47 en neutrófilos con las características clínicas de los pacientes. Encontramos una asociación de la densidad de expresión de CD47 total con el estadio clínico, la presencia de oligometastasis y los niveles de albumina de suero en los pacientes. IMF de CD47 total se incrementa más de 2 veces en pacientes en estadio IV con respecto a pacientes en estadio III, con lo que el incremento de la expresión de CD47 está relacionado con el desarrollo tumoral. Chao y colaboradores [168] establecieron que en linfoma Non Hodgkin, células tumorales en sitios secundarios (metástasis) tienen incremento 2 veces mayor en expresión de CD47 con respecto a células tumorales del sitio primario, con lo que los autores concluyeron que la diseminación de células tumorales está asociada a incremento de expresión de CD47. Por otra parte, Baccelli y

su grupo [177] caracterizaron fenotípicamente a células iniciadoras tumorales de cáncer de mama metastásico progresivo como EPCAM+ CD44+ CD47+ MET+. Además, Jaiswal y colegas [161] encontraron que la sobreexpresión de CD47 por parte de células tumorales aumenta su patogenicidad.

La densidad de expresión de CD47 total se incrementa casi 17 veces en pacientes con presencia de oligometastasis con respecto a pacientes con ausencia de oligometastasis. Todo lo anterior parece indicar que la sobreexpresión de CD47 en células de sangre periférica es un mecanismo relacionado con el proceso de metástasis del cáncer y por ende, relacionado a etapas tardías de la enfermedad.

Pacientes con cáncer que reciben tratamiento presentan comúnmente desnutrición [188]. La albúmina de suero es un parámetro que correlaciona con el nivel de desnutrición [188, 189] y es usado como biomarcador del estatus de nutrición a largo plazo. La hipoalbuminemia es común en pacientes con CPCNP [189]. La hipoalbuminemia es considerada un factor pronóstico negativo de sobrevida en carcinoma colorectal, cáncer de mama y otros tipos de tumores y está asociada al desarrollo tumoral.

Sin embargo, la asociación entre la hipoalbuminemia y el desarrollo tumoral permanece sin conocerse a fondo. Un modelo que podría explicar parcialmente esta relación señala que tumores interactúan directa e indirectamente con células inflamatorias del hospedero y como consecuencia, son liberadas diversas citocinas proinflamatorias. Una de ellas, la IL-6 regula la producción de albumina por hepatocitos. Células micrometastásicas en el hígado pueden inducir a celular de Kupffer a producir varias citocinas, entre ellas IL-6 que regulan la cantidad de albúmina [188]. Por otra parte, hipoalbuminemia es un factor pronóstico independiente de reincidencia tumoral [188] en pacientes con NSCLC (CPCNP) fase I, es factor pronóstico de tiempo de sobrevida en pacientes terminales de cáncer de pulmón [190] y está relacionada con el desarrollo de toxicidad inducida por quimioterapia [189]. Todo lo anterior parece indicar que la asociación hipoalbuminemia/CD47 sobreexpresado puede ser resultado del desarrollo tumoral.

Debido al incremento de expresión de CD47 en células de sangre periférica y a su asociación al estadio clínico, presencia de oligometastasis e hipoalbuminemia, quisimos evaluar el efecto de la densidad de CD47 total sobre la sobrevida del paciente.

Previamente, Willingham y colaboradores [171] analizaron la expresión génica de pacientes con cáncer de ovario, glioblastoma y glioma. Pacientes con niveles altos de mRNA de CD47 estaban asociados a probabilidad reducida de sobrevida libre de progresiones y a una reducción en sobrevida global. Por otra parte, Danielsen y colegas [162] no encontraron una correlación entre la expresión de CD47 y la sobrevida global en pacientes con mieloma múltiple. También en leucemia aguda linfocítica, Chao y su grupo de investigación [164] encontraron que la alta expresión de CD47 correlacionaba con peor sobrevida global así como con enfermedad con refractoriedad al tratamiento primario.

En el presente estudio encontramos que la IMF alta de CD47 total de sangre periférica correlacionaba con peor sobrevida global. En los pacientes que presentaron incrementada la expresión de CD47 total no se alcanzó la mediana de sobrevida, por lo que se realizó la medición de sobrevida a 1 año y esta fue casi la mitad de la alcanzada por pacientes con IMF baja de CD47 total.

Por último, evaluamos el efecto de la expresión de CD47 en neutrófilos de sangre periférica sobre la sobrevida global. Encontramos que la alta expresión de CD47 en neutrófilos correlaciona con una tendencia a menor sobrevida global. Lo anterior sugiere que al igual que lo reportado por Willingham y colaboradores [171], en pacientes con cáncer pulmonar la alta expresión basal (sin tratamiento) de CD47 total pronostica una peor sobrevida global. La alta expresión de CD47 en neutrófilos también podría servir como herramienta pronostica de sobrevida global baja a pesar de que los resultados obtenidos no son estadísticamente significativos.

Finalmente, la expresión tanto de CD47 total y CD47 en neutrófilos podría servir como biomarcador pronostico clínico en pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas. Se podría utilizar para identificar pacientes con cánceres de alto y bajo

riesgo y de esta manera se puede dar el tratamiento más adecuado según sea el caso. Las ventajas de utilizar biomarcadores en sangre es que se trata de una prueba mínimamente invasiva y con alta reproducibilidad [82] con lo que se podrían evitar sobrediagnósticos. Esto ayudaría a dar terapia adyuvante solamente en los casos necesarios.

## **VIII. CONCLUSIONES.**

Se evaluó la frecuencia y densidad de expresión del receptor CD47 en pacientes CPCNP y sujetos control. No se encontraron diferencias significativas entre pacientes y controles en cuanto a la frecuencia de CD47 en células de sangre periférica, sin embargo, los pacientes con CPCNP expresan más del doble de receptores CD47 por célula.

La frecuencia de neutrófilos se encontró incrementada en pacientes CPCNP con respecto a controles. Esta neutrofilia es un mecanismo reconocido e identificado en diversos tipos tumorales incluido el CPCNP.

Neutrófilos de sangre periférica de pacientes CPCNP tienen incrementada más de 2 veces la expresión de CD47 en superficie con respecto a sujetos control.

Se evaluó la asociación entre la frecuencia y la intensidad media de fluorescencia de CD47 total, así como la frecuencia de neutrófilos en circulación y densidad de expresión de CD47 en neutrófilos con características clínicas de pacientes. Encontramos una asociación de la densidad de expresión de CD47 total con el estadio clínico, la presencia de oligometastasis y con hipoalbuminemia.

La intensidad media de fluorescencia de CD47 total se incrementa más de 2 veces en pacientes en estadio IV de la enfermedad con respecto a pacientes en estadio III de la enfermedad.

La densidad de expresión de CD47 total se incrementa casi 17 veces en pacientes con presencia de oligometástasis con respecto a pacientes con ausencia de oligometástasis. La densidad de expresión de CD47 total está asociada a niveles bajos de albúmina de suero. En pacientes con hipoalbuminemia, la densidad de expresión de CD47 es casi el doble con respecto a pacientes con niveles normales de albumina.

La alta expresión de CD47 total en sangre periférica de pacientes correlaciona con peor sobrevida global. Encontramos que la alta expresión de CD47 en neutrófilos correlaciona con una tendencia a menor sobrevida global.

## IX. REFERENCIAS.

1. OMS. *Organización Mundial de la Salud (2011). Cáncer. Nota Descriptiva No. 297.* Documento revisado el 7 de enero del 2013; Available from: <http://www.who.int/mediacenter/factsheets/fs297/es.html>.
2. Lu, H., W. Ouyang, and C. Huang, *Inflammation, a key event in cancer development.* Mol Cancer Res, 2006. **4**(4): p. 221-33.
3. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer.* Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
4. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation.* Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
5. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008.* Int J Cancer, 2010. **127**(12): p. 2893-917.
6. Warren, J.L., et al., *Evaluation of Trends in the Cost of Initial Cancer Treatment.* Journal of the National Cancer Institute, 2008. **100**(12): p. 888-897.
7. Jemal, A., et al., *Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010. **19**(8): p. 1893-907.
8. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics.* CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
9. Bray, F., et al., *Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study.* The Lancet Oncology, 2012. **13**(8): p. 790-801.
10. Thun, M.J., et al., *The global burden of cancer: priorities for prevention.* Carcinogenesis, 2010. **31**(1): p. 100-10.
11. Ginsburg, O.M., et al., *The global cancer epidemic: opportunities for Canada in low- and middle-income countries.* CMAJ, 2012. **184**(15): p. 1699-704.
12. Wallace, T.A., D.N. Martin, and S. Ambis, *Interactions among genes, tumor biology and the environment in cancer health disparities: examining the evidence on a national and global scale.* Carcinogenesis, 2011. **32**(8): p. 1107-21.
13. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2012.* CA Cancer J Clin, 2012. **62**(1): p. 10-29.
14. Aldaco-Sarvide, F., et al., *Mortalidad por cáncer en México 2000-2010: el recuento de los daños.* TITLEREVISTA, 2012. **11**(06): p. 371-379.
15. Mohar, A., et al., *[Available resources for the treatment of breast cancer in Mexico].* Salud Publica Mex, 2009. **51 Suppl 2**: p. s263-9.
16. Knaul, F.M., et al., *[Breast cancer in Mexico: an urgent priority].* Salud Publica Mex, 2009. **51 Suppl 2**: p. s335-44.
17. Sosa-Durán, E and FM García-Rodríguez. *Panorama epidemiológico del cáncer en México.* Rev. Mex. Anest, 2013. **36 Suppl 1**: p.s130-132.
18. Liu, Y. and G. Zeng, *Cancer and innate immune system interactions: translational potentials for cancer immunotherapy.* J Immunother, 2012. **35**(4): p. 299-308.
19. Chung, C.Y., et al., *Dendritic cells: cellular mediators for immunological tolerance.* Clin Dev Immunol, 2013. **2013**: p. 972865.

20. Rabinovich, G.A., D. Gabilovich, and E.M. Sotomayor, *Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells*. *Annu Rev Immunol*, 2007. **25**: p. 267-96.
21. Lakshmi Narendra, B., et al., *Immune system: a double-edged sword in cancer*. *Inflamm Res*, 2013. **62**(9): p. 823-34.
22. Stojanovic, A., M.P. Correia, and A. Cerwenka, *Shaping of NK cell responses by the tumor microenvironment*. *Cancer Microenviron*, 2013. **6**(2): p. 135-46.
23. Finn, O.J., *Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer*. *Ann Oncol*, 2012. **23 Suppl 8**: p. viii6-9.
24. Lanca, T. and B. Silva-Santos, *The split nature of tumor-infiltrating leukocytes: Implications for cancer surveillance and immunotherapy*. *Oncoimmunology*, 2012. **1**(5): p. 717-725.
25. de Visser, K.E., A. Eichten, and L.M. Coussens, *Paradoxical roles of the immune system during cancer development*. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(1): p. 24-37.
26. Disis, M.L., *Immune regulation of cancer*. *J Clin Oncol*, 2010. **28**(29): p. 4531-8.
27. Hao, N.B., et al., *Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors*. *Clin Dev Immunol*, 2012. **2012**: p. 948098.
28. Eljaszewicz, A., et al., *Collaborating with the enemy: function of macrophages in the development of neoplastic disease*. *Mediators Inflamm*, 2013. **2013**: p. 831387.
29. Dalton, D.K. and R.J. Noelle, *The roles of mast cells in anticancer immunity*. *Cancer Immunol Immunother*, 2012. **61**(9): p. 1511-20.
30. Tazzyman, S., H. Niaz, and C. Murdoch, *Neutrophil-mediated tumour angiogenesis: subversion of immune responses to promote tumour growth*. *Semin Cancer Biol*, 2013. **23**(3): p. 149-58.
31. Fridlender, Z.G. and S.M. Albelda, *Tumor-associated neutrophils: friend or foe?* *Carcinogenesis*, 2012. **33**(5): p. 949-55.
32. Dumitru, C.A., S. Lang, and S. Brandau, *Modulation of neutrophil granulocytes in the tumor microenvironment: mechanisms and consequences for tumor progression*. *Semin Cancer Biol*, 2013. **23**(3): p. 141-8.
33. Schiavoni, G., L. Gabriele, and F. Mattei, *The tumor microenvironment: a pitch for multiple players*. *Front Oncol*, 2013. **3**: p. 90.
34. Prado-Garcia, H., et al., *Tumor-induced CD8+ T-cell dysfunction in lung cancer patients*. *Clin Dev Immunol*, 2012. **2012**: p. 741741.
35. Monu, N.R. and A.B. Frey, *Myeloid-derived suppressor cells and anti-tumor T cells: a complex relationship*. *Immunol Invest*, 2012. **41**(6-7): p. 595-613.
36. Umansky, V. and A. Sevko, *Tumor microenvironment and myeloid-derived suppressor cells*. *Cancer Microenviron*, 2013. **6**(2): p. 169-77.
37. Adeegbe, D.O. and H. Nishikawa, *Natural and induced T regulatory cells in cancer*. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 190.
38. Tanchot, C., et al., *Tumor-infiltrating regulatory T cells: phenotype, role, mechanism of expansion in situ and clinical significance*. *Cancer Microenviron*, 2013. **6**(2): p. 147-57.
39. Vesely, M.D., et al., *Natural innate and adaptive immunity to cancer*. *Annu Rev Immunol*, 2011. **29**: p. 235-71.

40. Zitvogel, L., A. Tesniere, and G. Kroemer, *Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 715-27.
41. Finn, O.J., *Cancer immunology*. N Engl J Med, 2008. **358**(25): p. 2704-15.
42. Kim, R., M. Emi, and K. Tanabe, *Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape*. Immunology, 2007. **121**(1): p. 1-14.
43. Teng, M.W., et al., *Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer*. J Leukoc Biol, 2008. **84**(4): p. 988-93.
44. Poon, I.K., M.D. Hulett, and C.R. Parish, *Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance*. Cell Death Differ, 2010. **17**(3): p. 381-97.
45. Chao, M.P., R. Majeti, and I.L. Weissman, *Programmed cell removal: a new obstacle in the road to developing cancer*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(1): p. 58-67.
46. Ravichandran, K.S., *Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways*. Immunity, 2011. **35**(4): p. 445-55.
47. Ravichandran, K.S., *Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums*. J Exp Med, 2010. **207**(9): p. 1807-17.
48. Brown, S., et al., *Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment*. Nature, 2002. **418**(6894): p. 200-3.
49. de Almeida, C.J. and R. Linden, *Phagocytosis of apoptotic cells: a matter of balance*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(14): p. 1532-46.
50. Brown, E.J. and W.A. Frazier, *Integrin-associated protein (CD47) and its ligands*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(3): p. 130-5.
51. Frazier, W.A., Isenberg, J.S., Kaur, S., Roberts, D.D., 2010. CD47., Nature Signaling Gateway.
52. Takizawa, H. and M.G. Manz, *Macrophage tolerance: CD47-SIRP-alpha-mediated signals matter*. Nat Immunol, 2007. **8**(12): p. 1287-9.
53. Barclay, A.N., *Signal regulatory protein alpha (SIRPalpha)/CD47 interaction and function*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(1): p. 47-52.
54. Matozaki, T., et al., *Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPalpha signalling pathway*. Trends Cell Biol, 2009. **19**(2): p. 72-80.
55. Ostrand-Rosenberg, S., *Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity*. Curr Opin Genet Dev, 2008. **18**(1): p. 11-8.
56. Tesniere, A., et al., *Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death*. Cell Death Differ, 2008. **15**(1): p. 3-12.
57. Kim, M.Y., et al., *Tumor self-seeding by circulating cancer cells*. Cell, 2009. **139**(7): p. 1315-26.
58. Aguirre-Ghiso, J.A., *On the theory of tumor self-seeding: implications for metastasis progression in humans*. Breast Cancer Res, 2010. **12**(2): p. 304.
59. Yatabe, Y., A.C. Borczuk, and C.A. Powell, *Do all lung adenocarcinomas follow a stepwise progression?* Lung Cancer, 2011. **74**(1): p. 7-11.
60. Saintigny, P. and J.A. Burger, *Recent advances in non-small cell lung cancer biology and clinical management*. Discov Med, 2012. **13**(71): p. 287-97.

61. Tsvetkova, E. and G.D. Goss, *Drug resistance and its significance for treatment decisions in non-small-cell lung cancer*. *Curr Oncol*, 2012. **19**(Suppl 1): p. S45-51.
62. Raparia, K., et al., *Molecular profiling in non-small cell lung cancer: a step toward personalized medicine*. *Arch Pathol Lab Med*, 2013. **137**(4): p. 481-91.
63. Goldstraw, P., et al., *The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours*. *J Thorac Oncol*, 2007. **2**(8): p. 706-14.
64. Reynales-Shigematsu, L.M., S.A. Juarez-Marquez, and R. Valdes-Salgado, *[Costs of medical care attributable to tobacco consumption at the Mexican Institute of Social Security (IMSS), Morelos]*. *Salud Publica Mex*, 2005. **47**(6): p. 451-7.
65. Moran, C., *Importance of molecular features of non-small cell lung cancer for choice of treatment*. *Am J Pathol*, 2011. **178**(5): p. 1940-8.
66. Kerr, K.M., *Classification of lung cancer: proposals for change?* *Arch Pathol Lab Med*, 2012. **136**(10): p. 1190-3.
67. Bareschino, M.A., et al., *Treatment of advanced non small cell lung cancer*. *J Thorac Dis*, 2011. **3**(2): p. 122-33.
68. Favaretto, A.G., G. Pasello, and C. Magro, *Second and third line treatment in advanced non-small cell lung cancer*. *Discov Med*, 2009. **8**(43): p. 204-9.
69. Sechler, M., et al., *Non-small-cell lung cancer: molecular targeted therapy and personalized medicine - drug resistance, mechanisms, and strategies*. *Pharmgenomics Pers Med*, 2013. **6**: p. 25-36.
70. Yu, J.L., et al., *Impact of new chemotherapeutic and targeted agents on survival in stage IV non-small cell lung cancer*. *Oncologist*, 2011. **16**(9): p. 1307-15.
71. Arrieta, O., et al., *Genotyping non-small cell lung cancer (NSCLC) in Latin America*. *J Thorac Oncol*, 2011. **6**(11): p. 1955-9.
72. Zhang, X., et al., *Combined EGFR and VEGFR versus single EGFR signaling pathways inhibition therapy for NSCLC: a systematic review and meta-analysis*. *PLoS One*, 2012. **7**(8): p. e40178.
73. *Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework*. *Clin Pharmacol Ther*, 2001. **69**(3): p. 89-95.
74. Strimbu, K. and J.A. Tavel, *What are biomarkers?* *Curr Opin HIV AIDS*, 2010. **5**(6): p. 463-6.
75. Italiano, A., *Prognostic or predictive? It's time to get back to definitions!* *J Clin Oncol*, 2011. **29**(35): p. 4718; author reply 4718-9.
76. Cary, K.C. and M.R. Cooperberg, *Biomarkers in prostate cancer surveillance and screening: past, present, and future*. *Ther Adv Urol*, 2013. **5**(6): p. 318-29.
77. Wallace, T.J., et al., *Current Approaches, Challenges and Future Directions for Monitoring Treatment Response in Prostate Cancer*. *J Cancer*, 2014. **5**(1): p. 3-24.
78. Wang, H.F. and J.S. Wang, *Research progress in potential urinary markers for the early detection, diagnosis and follow-up of human bladder cancer*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012. **13**(5): p. 1723-6.
79. Walker, A.S., et al., *Future Directions for Monitoring Treatment Response in Colorectal Cancer*. *J Cancer*, 2014. **5**(1): p. 44-57.

80. Thumar, J., E. Giesen, and H.M. Kluger, *Drug targets and predictive biomarkers in the management of metastatic melanoma*. *Pharmgenomics Pers Med*, 2012. **5**: p. 139-48
81. Shao, Y.Y., C.H. Hsu, and A.L. Cheng, *Predictive Biomarkers of Antiangiogenic Therapy for Advanced Hepatocellular Carcinoma: Where Are We?* *Liver Cancer*, 2013. **2**(2): p. 93-107.
82. Zheng, H., et al., *Advances in circulating microRNAs as diagnostic and prognostic markers for ovarian cancer*. *Cancer Biol Med*, 2013. **10**(3): p. 123-130.
83. Krawczyk, N., et al., *Circulating tumour cells in breast cancer*. *Ecancermedicalscience*, 2013. **7**: p. 352.
84. Bergot, E., et al., *Predictive biomarkers in patients with resected non-small cell lung cancer treated with perioperative chemotherapy*. *Eur Respir Rev*, 2013. **22**(130): p. 565-76.
85. Byron, E. and M. Pinder-Schenck, *Systemic and targeted therapies for early-stage lung cancer*. *Cancer Control*, 2014. **21**(1): p. 21-31.
86. Domvri, K., et al., *Molecular Targeted Drugs and Biomarkers in NSCLC, the Evolving Role of Individualized Therapy*. *J Cancer*, 2013. **4**(9): p. 736-754.
87. D'Amico, T.A., *Molecular biologic staging of lung cancer*. *Ann Thorac Surg*, 2008. **85**(2): p. S737-42.
88. Botling, J., et al., *Biomarker discovery in non-small cell lung cancer: integrating gene expression profiling, meta-analysis, and tissue microarray validation*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(1): p. 194-204.
89. Brown, E., et al., *Integrin-associated protein: a 50-kD plasma membrane antigen physically and functionally associated with integrins*. *J Cell Biol*, 1990. **111**(6 Pt 1): p. 2785-94.
90. Lindberg, F.P., et al., *Molecular cloning of integrin-associated protein: an immunoglobulin family member with multiple membrane-spanning domains implicated in alpha v beta 3-dependent ligand binding*. *J Cell Biol*, 1993. **123**(2): p. 485-96.
91. Kaur, S., et al., *Heparan sulfate modification of the transmembrane receptor CD47 is necessary for inhibition of T cell receptor signaling by thrombospondin-1*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(17): p. 14991-5002.
92. Mawby, W.J., et al., *Isolation and characterization of CD47 glycoprotein: a multispinning membrane protein which is the same as integrin-associated protein (IAP) and the ovarian tumour marker OA3*. *Biochem J*, 1994. **304** ( Pt 2): p. 525-30.
93. Lindberg, F.P., et al., *Rh-related antigen CD47 is the signal-transducer integrin-associated protein*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(3): p. 1567-70.
94. Sick, E., et al., *CD47 update: a multifaceted actor in the tumour microenvironment of potential therapeutic interest*. *Br J Pharmacol*, 2012. **167**(7): p. 1415-30.
95. Oldenborg, P.A., *CD47: A Cell Surface Glycoprotein Which Regulates Multiple Functions of Hematopoietic Cells in Health and Disease*. *ISRN Hematol*, 2013. **2013**: p. 614619.
96. Reinhold, M.I., et al., *In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47)*. *J Cell Sci*, 1995. **108** ( Pt 11): p. 3419-25.

97. Huang, A.M., et al., *Expression of integrin-associated protein gene associated with memory formation in rats*. J Neurosci, 1998. **18**(11): p. 4305-13.
98. Lee, E.H., et al., *Induction of integrin-associated protein (IAP) mRNA expression during memory consolidation in rat hippocampus*. Eur J Neurosci, 2000. **12**(3): p. 1105-12
99. Gao, A.G., et al., *Integrin-associated protein is a receptor for the C-terminal domain of thrombospondin*. J Biol Chem, 1996. **271**(1): p. 21-4.
100. Chung, J., A.G. Gao, and W.A. Frazier, *Thrombospondin acts via integrin-associated protein to activate the platelet integrin alphaIIb beta3*. J Biol Chem, 1997. **272**(23): p. 14740-6.
101. Wang, X.Q. and W.A. Frazier, *The thrombospondin receptor CD47 (IAP) modulates and associates with alpha2 beta1 integrin in vascular smooth muscle cells*. Mol Biol Cell, 1998. **9**(4): p. 865-74.
102. Brittain, J.E., et al., *Mechanism of CD47-induced alpha4beta1 integrin activation and adhesion in sickle reticulocytes*. J Biol Chem, 2004. **279**(41): p. 42393-402.
103. Bamberger, M.E., et al., *A cell surface receptor complex for fibrillar beta-amyloid mediates microglial activation*. J Neurosci, 2003. **23**(7): p. 2665-74.
104. Jiang, P., C.F. Lagenaur, and V. Narayanan, *Integrin-associated protein is a ligand for the P84 neural adhesion molecule*. J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 559-62.
105. Vernon-Wilson, E.F., et al., *CD47 is a ligand for rat macrophage membrane signal regulatory protein SIRP (OX41) and human SIRPalpha 1*. Eur J Immunol, 2000. **30**(8): p. 2130-7.
106. Babic, I., et al., *SHPS-1 induces aggregation of Ba/F3 pro-B cells via an interaction with CD47*. J Immunol, 2000. **164**(7): p. 3652-8.
107. Mouro-Chanteloup, I., et al., *Evidence that the red cell skeleton protein 4.2 interacts with the Rh membrane complex member CD47*. Blood, 2003. **101**(1): p. 338-44.
108. Miyashita, M., et al., *Promotion of neurite and filopodium formation by CD47: roles of integrins, Rac, and Cdc42*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(8): p. 3950-63.
109. Isenberg, J.S., W.A. Frazier, and D.D. Roberts, *Thrombospondin-1: a physiological regulator of nitric oxide signaling*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(5): p. 728-42.
110. Kaczorowski, D.J. and T.R. Billiar, *Targeting CD47: NO limit on therapeutic potential*. Circ Res, 2007. **100**(5): p. 602-3.
111. Roberts, D.D., et al., *The matricellular protein thrombospondin-1 globally regulates cardiovascular function and responses to stress via CD47*. Matrix Biol, 2012. **31**(3): p. 162-9.
112. Miller, T.W., J.S. Isenberg, and D.D. Roberts, *Thrombospondin-1 is an inhibitor of pharmacological activation of soluble guanylate cyclase*. Br J Pharmacol, 2010. **159**(7): p. 1542-7.
113. Isenberg, J.S., et al., *Enhancing cardiovascular dynamics by inhibition of thrombospondin-1/CD47 signaling*. Curr Drug Targets, 2008. **9**(10): p. 833-41.
114. Kaur, S., et al., *Thrombospondin-1 inhibits VEGF receptor-2 signaling by disrupting its association with CD47*. J Biol Chem, 2010. **285**(50): p. 38923-32.

115. Kaur, S. and D.D. Roberts, *CD47 applies the brakes to angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptor-2*. *Cell Cycle*, 2011. **10**(1): p. 10-2.
116. Yao, M., D.D. Roberts, and J.S. Isenberg, *Thrombospondin-1 inhibition of vascular smooth muscle cell responses occurs via modulation of both cAMP and cGMP*. *Pharmacol Res*, 2011. **63**(1): p. 13-22.
117. Frazier, W.A., et al., *The thrombospondin receptor integrin-associated protein (CD47) functionally couples to heterotrimeric Gi*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(13): p. 8554-60.
118. Li, Z., et al., *Interactions of thrombospondins with alpha4beta1 integrin and CD47 differentially modulate T cell behavior*. *J Cell Biol*, 2002. **157**(3): p. 509-19.
119. Li, S.S., A. Forslow, and K.G. Sundqvist, *Autocrine regulation of T cell motility by calreticulin-thrombospondin-1 interaction*. *J Immunol*, 2005. **174**(2): p. 654-61.
120. Manna, P.P. and W.A. Frazier, *The mechanism of CD47-dependent killing of T cells: heterotrimeric Gi-dependent inhibition of protein kinase A*. *J Immunol*, 2003. **170**(7): p. 3544-53.
121. Johansson, U., K. Higginbottom, and M. Londei, *CD47 ligation induces a rapid caspase-independent apoptosis-like cell death in human monocytes and dendritic cells*. *Scand J Immunol*, 2004. **59**(1): p. 40-9.
122. Manna, P.P. and W.A. Frazier, *CD47 mediates killing of breast tumor cells via Gi-dependent inhibition of protein kinase A*. *Cancer Res*, 2004. **64**(3): p. 1026-36.
123. Mateo, V., et al., *Mechanisms of CD47-induced caspase-independent cell death in normal and leukemic cells: link between phosphatidylserine exposure and cytoskeleton organization*. *Blood*, 2002. **100**(8): p. 2882-90.
124. Manna, P.P., et al., *CD47 augments Fas/CD95-mediated apoptosis*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(33): p. 29637-44.
125. Porter, J.C. and N. Hogg, *Integrins take partners: cross-talk between integrins and other membrane receptors*. *Trends Cell Biol*, 1998. **8**(10): p. 390-6.
126. Green, J.M., et al., *Role of cholesterol in formation and function of a signaling complex involving alphavbeta3, integrin-associated protein (CD47), and heterotrimeric G proteins*. *J Cell Biol*, 1999. **146**(3): p. 673-82.
127. McDonald, J.F., A. Zheleznyak, and W.A. Frazier, *Cholesterol-independent interactions with CD47 enhance alphavbeta3 avidity*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(17): p. 17301-1.
128. Johansen, M.L. and E.J. Brown, *Dual regulation of SIRPalpha phosphorylation by integrins and CD47*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(33): p. 24219-30.
129. Oldenborg, P. A., A. Zheleznyak, Y. F. Fang, C. F. Lagenaur, H. D. Gresham and F. P. Lindberg (2000). "Role of CD47 as a marker of self on red blood cells." *Science* **288**(5473): 2051-2054.
130. Fujioka, Y., T. Matozaki, T. Noguchi, A. Iwamatsu, T. Yamao, N. Takahashi, M. Tsuda, T. Takada and M. Kasuga (1996). "A novel membrane glycoprotein, SHPS-1, that binds the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-2 in response to mitogens and cell adhesion." *Mol Cell Biol* **16**(12): 6887-6899.
131. Timms, J. F., K. Carlberg, H. Gu, H. Chen, S. Kamatkar, M. J. Nadler, L. R. Rohrschneider and B. G. Neel (1998). "Identification of major binding proteins

- and substrates for the SH2-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 in macrophages." *Mol Cell Biol* **18**(7): 3838-3850.
132. Kharitonov, A., Z. Chen, I. Sures, H. Wang, J. Schilling and A. Ullrich (1997). "A family of proteins that inhibit signalling through tyrosine kinase receptors." *Nature* **386**(6621): 181-186.
  133. Tsai, R.K. and D.E. Discher, *Inhibition of "self" engulfment through deactivation of myosin-II at the phagocytic synapse between human cells.* *J Cell Biol*, 2008. **180**(5): p. 989-1003.
  134. Kinchen, J.M. and K.S. Ravichandran, *Phagocytic signaling: you can touch, but you can't eat.* *Curr Biol*, 2008. **18**(12): p. R521-4.
  135. Tsai, R. K., P. L. Rodriguez and D. E. Discher (2010). "Self inhibition of phagocytosis: the affinity of 'marker of self' CD47 for SIRPalpha dictates potency of inhibition but only at low expression levels." *Blood Cells Mol Dis* **45**(1): 67-74.
  136. Liu, Y., Q. Tong, Y. Zhou, H. W. Lee, J. J. Yang, H. J. Buhning, Y. T. Chen, B. Ha, C. X. Chen, Y. Yang and K. Zen (2007). "Functional elements on SIRPalpha IgV domain mediate cell surface binding to CD47." *J Mol Biol* **365**(3): 680-693.
  137. Yoshida, H., Y. Tomiyama, J. Ishikawa, K. Oritani, I. Matsumura, M. Shiraga, T. Yokota, Y. Okajima, M. Ogawa, J. Miyagawa, T. Nishiura and Y. Matsuzawa (2000). "Integrin-associated protein/CD47 regulates motile activity in human B-cell lines through CDC42." *Blood* **96**(1): 234-241.
  138. Yoshida, H., Y. Tomiyama, K. Oritani, Y. Murayama, J. Ishikawa, H. Kato, J. Miyagawa Ji, N. Honma, T. Nishiura and Y. Matsuzawa (2002). "Interaction between Src homology 2 domain bearing protein tyrosine phosphatase substrate-1 and CD47 mediates the adhesion of human B lymphocytes to nonactivated endothelial cells." *J Immunol* **168**(7): 3213-3220.
  139. Avice, M. N., M. Rubio, M. Sergerie, G. Delespesse and M. Sarfati (2000). "CD47 ligation selectively inhibits the development of human naive T cells into Th1 effectors." *J Immunol* **165**(8): 4624-4631.
  140. Latour, S., H. Tanaka, C. Demeure, V. Mateo, M. Rubio, E. J. Brown, C. Maliszewski, F. P. Lindberg, A. Oldenborg, A. Ullrich, G. Delespesse and M. Sarfati (2001). "Bidirectional negative regulation of human T and dendritic cells by CD47 and its cognate receptor signal-regulator protein-alpha: down-regulation of IL-12 responsiveness and inhibition of dendritic cell activation." *J Immunol* **167**(5): 2547-2554.
  141. Bouguermouh, S., V. Q. Van, J. Martel, P. Gautier, M. Rubio and M. Sarfati (2008). "CD47 expression on T cell is a self-control negative regulator of type 1 immune response." *J Immunol* **180**(12): 8073-8082.
  142. Van, V. Q., N. Baba, M. Rubio, K. Wakahara, B. Panzini, C. Richard, G. Soucy, D. Franchimont, G. Fortin, A. C. Torres, L. Cabon, S. Susin and M. Sarfati (2012). "CD47(low) status on CD4 effectors is necessary for the contraction/resolution of the immune response in humans and mice." *PLoS One* **7**(8): e41972.
  143. Van, V. Q., M. Raymond, N. Baba, M. Rubio, K. Wakahara, S. A. Susin and M. Sarfati (2012). "CD47(high) expression on CD4 effectors identifies functional long-lived memory T cell progenitors." *J Immunol* **188**(9): 4249-4255.
  144. Stefanidakis, M., G. Newton, W. Y. Lee, C. A. Parkos and F. W. Luscinskas (2008). "Endothelial CD47 interaction with SIRPgamma is required for human T-

- cell transendothelial migration under shear flow conditions in vitro." Blood **112**(4): 1280-1289.
145. Azcutia, V., M. Stefanidakis, N. Tsuboi, T. Mayadas, K. J. Croce, D. Fukuda, M. Aikawa, G. Newton and F. W. Luscinskas (2012). "Endothelial CD47 promotes vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation and participates in T cell recruitment at sites of inflammation in vivo." J Immunol **189**(5): 2553-2562.
  146. Martinelli, R., G. Newton, C. V. Carman, J. Greenwood and F. W. Luscinskas (2013). "Novel role of CD47 in rat microvascular endothelium: signaling and regulation of T-cell transendothelial migration." Arterioscler Thromb Vasc Biol **33**(11): 2566-2576.
  147. Piccio, L., W. Vermi, K. S. Boles, A. Fuchs, C. A. Strader, F. Facchetti, M. Cella and M. Colonna (2005). "Adhesion of human T cells to antigen-presenting cells through SIRPbeta2-CD47 interaction costimulates T-cell proliferation." Blood **105**(6): 2421-2427.
  148. Van, V. Q., S. Lesage, S. Bouguermouh, P. Gautier, M. Rubio, M. Levesque, S. Nguyen, L. Galibert and M. Sarfati (2006). "Expression of the self-marker CD47 on dendritic cells governs their trafficking to secondary lymphoid organs." EMBO J **25**(23): 5560-5568.
  149. Iwamura, H., Y. Saito, M. Sato-Hashimoto, H. Ohnishi, Y. Murata, H. Okazawa, Y. Kanazawa, T. Kaneko, S. Kusakari, T. Kotani, Y. Nojima and T. Matozaki (2011). "Essential roles of SIRPalpha in homeostatic regulation of skin dendritic cells." Immunol Lett **135**(1-2): 100-107.
  150. Braun, D., L. Galibert, T. Nakajima, H. Saito, V. V. Quang, M. Rubio and M. Sarfati (2006). "Semimature stage: a checkpoint in a dendritic cell maturation program that allows for functional reversion after signal-regulatory protein-alpha ligation and maturation signals." J Immunol **177**(12): 8550-8559.
  151. Saito, Y., H. Iwamura, T. Kaneko, H. Ohnishi, Y. Murata, H. Okazawa, Y. Kanazawa, M. Sato-Hashimoto, H. Kobayashi, P. A. Oldenborg, M. Naito, Y. Kaneko, Y. Nojima and T. Matozaki (2010). "Regulation by SIRPalpha of dendritic cell homeostasis in lymphoid tissues." Blood **116**(18): 3517-3525.
  152. Cooper, D., F. P. Lindberg, J. R. Gamble, E. J. Brown and M. A. Vadas (1995). "Transendothelial migration of neutrophils involves integrin-associated protein (CD47)." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(9): 3978-3982.
  153. Liu, Y., D. Merlin, S. L. Burst, M. Pochet, J. L. Madara and C. A. Parkos (2001). "The role of CD47 in neutrophil transmigration. Increased rate of migration correlates with increased cell surface expression of CD47." J Biol Chem **276**(43): 40156-40166.
  154. Chin, A. C., B. Fournier, E. J. Peatman, T. A. Reaves, W. Y. Lee and C. A. Parkos (2009). "CD47 and TLR-2 cross-talk regulates neutrophil transmigration." J Immunol **183**(9): 5957-5963
  155. Lawrence, D. W., S. B. King, W. A. Frazier and J. M. Koenig (2009). "Decreased CD47 expression during spontaneous apoptosis targets neutrophils for phagocytosis by monocyte-derived macrophages." Early Hum Dev **85**(10): 659-663.
  156. Han, X., H. Sterling, Y. Chen, C. Saginario, E. J. Brown, W. A. Frazier, F. P. Lindberg and A. Vignery (2000). "CD47, a ligand for the macrophage fusion

- receptor, participates in macrophage multinucleation." J Biol Chem **275**(48): 37984-37992.
157. Bras, M., V. J. Yuste, G. Roue, S. Barbier, P. Sancho, C. Virely, M. Rubio, S. Baudet, J. E. Esquerda, H. Merle-Beral, M. Sarfati and S. A. Susin (2007). "Drp1 mediates caspase-independent type III cell death in normal and leukemic cells." Mol Cell Biol **27**(20): 7073-7088.
  158. Lamy, L., A. Foussat, E. J. Brown, P. Bornstein, M. Ticchioni and A. Bernard (2007). "Interactions between CD47 and thrombospondin reduce inflammation." J Immunol **178**(9): 5930-5939.
  159. Barbier, S., L. Chatre, M. Bras, P. Sancho, G. Roue, C. Virely, V. J. Yuste, S. Baudet, M. Rubio, J. E. Esquerda, M. Sarfati, H. Merle-Beral and S. A. Susin (2009). "Caspase-independent type III programmed cell death in chronic lymphocytic leukemia: the key role of the F-actin cytoskeleton." Haematologica **94**(4): 507-517.
  160. Zheng, J., C. Song and C. C. Zhang (2011). "A new chapter: hematopoietic stem cells are direct players in immunity." Cell Biosci **1**: 33.
  161. Jaiswal, S., C. H. Jamieson, W. W. Pang, C. Y. Park, M. P. Chao, R. Majeti, D. Traver, N. van Rooijen and I. L. Weissman (2009). "CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis." Cell **138**(2): 271-285.
  162. Rendtlew Danielsen, J. M., L. M. Knudsen, I. M. Dahl, M. Lodahl and T. Rasmussen (2007). "Dysregulation of CD47 and the ligands thrombospondin 1 and 2 in multiple myeloma." Br J Haematol **138**(6): 756-760.
  163. Kim, D., J. Wang, S. B. Willingham, R. Martin, G. Wernig and I. L. Weissman (2012). "Anti-CD47 antibodies promote phagocytosis and inhibit the growth of human myeloma cells." Leukemia **26**(12): 2538-2545.
  164. Chao, M. P., A. A. Alizadeh, C. Tang, M. Jan, R. Weissman-Tsukamoto, F. Zhao, C. Y. Park, I. L. Weissman and R. Majeti (2011). "Therapeutic antibody targeting of CD47 eliminates human acute lymphoblastic leukemia." Cancer Res **71**(4): 1374-1384.
  165. Majeti, R., M. P. Chao, A. A. Alizadeh, W. W. Pang, S. Jaiswal, K. D. Gibbs, Jr., N. van Rooijen and I. L. Weissman (2009). "CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells." Cell **138**(2): 286-299.
  166. Pang, W. W., J. V. Pluvineau, E. A. Price, K. Sridhar, D. A. Arber, P. L. Greenberg, S. L. Schrier, C. Y. Park and I. L. Weissman (2013). "Hematopoietic stem cell and progenitor cell mechanisms in myelodysplastic syndromes." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(8): 3011-3016.
  167. Chao, M. P., A. A. Alizadeh, C. Tang, J. H. Myklebust, B. Varghese, S. Gill, M. Jan, A. C. Cha, C. K. Chan, B. T. Tan, C. Y. Park, F. Zhao, H. E. Kohrt, R. Malumbres, J. Briones, R. D. Gascoyne, I. S. Lossos, R. Levy, I. L. Weissman and R. Majeti (2010). "Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma." Cell **142**(5): 699-713.
  168. Chao, M. P., C. Tang, R. K. Pachynski, R. Chin, R. Majeti and I. L. Weissman (2011). "Extranodal dissemination of non-Hodgkin lymphoma requires CD47 and is inhibited by anti-CD47 antibody therapy." Blood **118**(18): 4890-4901.

169. Nagahara, M., K. Mimori, A. Kataoka, H. Ishii, F. Tanaka, T. Nakagawa, T. Sato, S. Ono, K. Sugihara and M. Mori (2010). "Correlated expression of CD47 and SIRPA in bone marrow and in peripheral blood predicts recurrence in breast cancer patients." Clin Cancer Res **16**(18): 4625-4635.
170. Zhao, X. W., E. M. van Beek, K. Schornagel, H. Van der Maaden, M. Van Houdt, M. A. Otten, P. Finetti, M. Van Egmond, T. Matozaki, G. Kraal, D. Birnbaum, A. van Elsas, T. W. Kuijpers, F. Bertucci and T. K. van den Berg (2011). "CD47-signal regulatory protein-alpha (SIRPalpha) interactions form a barrier for antibody-mediated tumor cell destruction." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(45): 18342-18347.
171. Willingham, S. B., J. P. Volkmer, A. J. Gentles, D. Sahoo, P. Dalerba, S. S. Mitra, J. Wang, H. Contreras-Trujillo, R. Martin, J. D. Cohen, P. Lovelace, F. A. Scheeren, M. P. Chao, K. Weiskopf, C. Tang, A. K. Volkmer, T. J. Naik, T. A. Storm, A. R. Mosley, B. Edris, S. M. Schmid, C. K. Sun, M. S. Chua, O. Murillo, P. Rajendran, A. C. Cha, R. K. Chin, D. Kim, M. Adorno, T. Raveh, D. Tseng, S. Jaiswal, P. O. Enger, G. K. Steinberg, G. Li, S. K. So, R. Majeti, G. R. Harsh, M. van de Rijn, N. N. Teng, J. B. Sunwoo, A. A. Alizadeh, M. F. Clarke and I. L. Weissman (2012). "The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPa) interaction is a therapeutic target for human solid tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(17): 6662-6667.
172. Zhang, Y., W. Sime, M. Juhas and A. Sjolander (2013). "Crosstalk between colon cancer cells and macrophages via inflammatory mediators and CD47 promotes tumour cell migration." Eur J Cancer **49**(15): 3320-3334.
173. Chan, K. S., I. Espinosa, M. Chao, D. Wong, L. Ailles, M. Diehn, H. Gill, J. Presti, Jr., H. Y. Chang, M. van de Rijn, L. Shortliffe and I. L. Weissman (2009). "Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(33): 14016-14021.
174. Edris, B., K. Weiskopf, A. K. Volkmer, J. P. Volkmer, S. B. Willingham, H. Contreras-Trujillo, J. Liu, R. Majeti, R. B. West, J. A. Fletcher, A. H. Beck, I. L. Weissman and M. van de Rijn (2012a). "Antibody therapy targeting the CD47 protein is effective in a model of aggressive metastatic leiomyosarcoma." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(17): 6656-6661.
175. Edris, B., K. Weiskopf, I. L. Weissman and M. van de Rijn (2012b). "Flipping the script on macrophages in leiomyosarcoma." Oncoimmunology **1**(7): 1202-1204.
176. Herrmann, D., G. Seitz, J. Fuchs and S. Armeanu-Ebinger (2012). "Susceptibility of rhabdomyosarcoma cells to macrophage-mediated cytotoxicity." Oncoimmunology **1**(3): 279-286.
177. Baccelli, I., A. Schneeweiss, S. Riethdorf, A. Stenzinger, A. Schillert, V. Vogel, C. Klein, M. Saini, T. Bauerle, M. Wallwiener, T. Holland-Letz, T. Hofner, M. Sprick, M. Scharpf, F. Marme, H. P. Sinn, K. Pantel, W. Weichert and A. Trumpp (2013). "Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay." Nat Biotechnol **31**(6): 539-544.
178. Leccia, F., A. Nardone, S. Corvigno, L. D. Vecchio, S. De Placido, F. Salvatore and B. M. Veneziani (2012). "Cytometric and biochemical characterization of human

- breast cancer cells reveals heterogeneous myoepithelial phenotypes." *Cytometry A* **81**(11): 960-972.
179. Melotti, A., A. Daga, D. Marubbi, A. Zunino, L. Mutti and G. Corte (2010). "In vitro and in vivo characterization of highly purified human mesothelioma derived cells." *BMC Cancer* **10**: 54.
  180. Chao, M. P., I. L. Weissman and R. Majeti (2012). "The CD47-SIRPalpha pathway in cancer immune evasion and potential therapeutic implications." *Curr Opin Immunol* **24**(2): 225-232.
  181. Cerecedo-Zapata C, L.D., Gonzaga R, *Oncología clínica, genómica y epigenómica en cáncer broncogénico: Parte I*. Rev Inst Nal Enf Resp Mex, 2009. **22**(43): p. 217-229.
  182. Seiffert, M., *Signal-regulatory protein alpha (SIRPalpha) but not SIRPbeta is involved in T-cell activation, binds to CD47 with high affinity, and is expressed on immature CD34+CD38- hematopoietic cells*. Blood, 2001. **97**(9): p. 2741-2749.
  183. Donskov, F., *Immunomonitoring and prognostic relevance of neutrophils in clinical trials*. Semin Cancer Biol, 2013. **23**(3): p. 200-7.
  184. Beyrau, M., J.V. Bodkin, and S. Nourshargh, *Neutrophil heterogeneity in health and disease: a revitalized avenue in inflammation and immunity*. Open Biol, 2012. **2**(11): p. 120134.
  185. Jafri, S.H., R. Shi, and G. Mills, *Advance lung cancer inflammation index (ALI) at diagnosis is a prognostic marker in patients with metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC): a retrospective review*. BMC Cancer, 2013. **13**: p. 158.
  186. Ilie, M., et al., *Predictive clinical outcome of the intratumoral CD66b-positive neutrophil-to-CD8-positive T-cell ratio in patients with resectable nonsmall cell lung cancer*. Cancer, 2012. **118**(6): p. 1726-37.
  187. Gregory, A.D. and A.M. Houghton, *Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy*. Cancer Res, 2011. **71**(7): p. 2411-6.
  188. Jin, Y., L. Zhao, and F. Peng, *Prognostic impact of serum albumin levels on the recurrence of stage I non-small cell lung cancer*. Clinics (Sao Paulo), 2013. **68**(5): p. 686-93.
  189. Arrieta, O., et al., *Association of nutritional status and serum albumin levels with development of toxicity in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with paclitaxel-cisplatin chemotherapy: a prospective study*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 50.
  190. Matsunuma, R., et al., *Prognostic Factors in Patients with Terminal Stage Lung Cancer*. J Palliat Med, 2014.