



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGIA EXPERIMENTAL

**ASOCIACIÓN DE LA PRESENCIA DE CÉLULAS SUPRESORAS DE ORIGEN
MIELOIDE Y SUPRESIÓN FUNCIONAL DE CÉLULAS T DE SANGRE PERIFÉRICA
EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

RODRIGUEZ RODRIGUEZ CARMEN ANGELICA

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. LOURDES MARIA BARRERA RAMIREZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM
DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM**

MÉXICO, D.F.

AGOSTO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 01 de diciembre de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ CARMEN ANGÉLICA** con número de cuenta **512025023**, con la tesis titulada **"ASOCIACIÓN DE LA PRESENCIA DE CÉLULAS SUPRESORAS DE ORIGEN MIELOIDE Y SUPRESIÓN FUNCIONAL DE CÉLULAS T DE SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. LOURDES MARÍA BARRERA RAMÍREZ**:

Presidente: DR. ANGEL ALFONSO ZARAIN HERZBERG
Vocal: DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA
Secretario: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
Suplente: M. EN C. ÓSCAR GERARDO ARRIETA RODRÍGUEZ
Suplente: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 25 de marzo de 2015

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 a la cual me fue posible dedicarme en tiempo completo al programa.

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

Tutor principal: Dra. Lourdes María Barrera Ramírez

Comité Tutorial:

Dr. Enrique Ortega Soto

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

Agradezco de todo corazón a mis padres, por el apoyo brindado durante mi desarrollo académico. Gracias por su cariño y comprensión, por guiar mi camino y estar junto a mí en los momentos más difíciles.

A mis Abuelitos, a quienes jamás encontraré la forma de agradecer el cariño, comprensión y apoyo brindado, por esos abrazos de consuelo cuando estaba triste y por celebrar conmigo mis triunfos, y a mis hermanos por su apoyo incondicional y por ser parte importante de mi vida.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCION.....	5
I. ANTECEDENTES.....	9
1.1. CANCER.....	9
1.1.1. <i>Inmunología del Cáncer.....</i>	10
1.2. CÁNCER PULMONAR.....	14
1.2.1. <i>Epidemiología del cáncer pulmonar.....</i>	15
1.2.2. <i>Etiología del cáncer pulmonar.....</i>	18
1.2.3. <i>Clasificación de Cáncer de Pulmón.....</i>	21
1.2.4. <i>Clasificación histopatológica.....</i>	21
1.2.5. <i>Cáncer pulmonar de células no-pequeñas. (CPNM).....</i>	22
1.2.6. <i>Carcinoma de células pequeñas (CPM).....</i>	23
1.2.7. <i>Estadificación.....</i>	23
1.2.8. <i>Inmunología del cáncer de pulmón.....</i>	27
1.3. CÉLULAS MIELOIDES: ORIGEN Y DESARROLLO.....	28
1.3.1. <i>Regulación de las células mieloides durante el desarrollo del tumor.....</i>	30
1.3.2. <i>Células dendríticas en el desarrollo del cáncer.....</i>	32
1.3.3. <i>Macrófagos en la promoción tumoral.....</i>	32
1.3.4. <i>Granulocitos en la progresión del cáncer.....</i>	33
1.3.5. <i>Impacto de los mecanismos tumorales sobre las células mieloides.....</i>	34
1.4. CÉLULAS SUPRESORAS DE ORIGEN MIELOIDE (MDSCs).....	37
1.4.1. <i>Contexto histórico.....</i>	37
1.4.2. <i>Origen de las MDSCs.....</i>	38
1.4.3. <i>Subgrupos de MDSCs.....</i>	39
1.4.4. <i>Expansión y activación.....</i>	41
1.4.5. <i>Regulación de las MDSC en el cáncer.....</i>	43
1.4.6. <i>Mecanismos de Supresión.....</i>	45
1.4.6.1. <i>Mecanismos de supresión dependientes de L-Arginina.....</i>	46
1.4.6.2. <i>Agotamiento de L-Arginina y su efecto en la proliferación y activación de los linfocitos T.....</i>	47
1.4.6.3. <i>Estrés oxidativo.....</i>	49
1.4.6.4. <i>Mecanismos que conducen a una disminución en la expresión de la cadena CD3ζ.....</i>	50
1.4.6.5. <i>Supresión cooperativa de arginasa e iNOS.....</i>	52
1.4.6.6. <i>Nuevos Mecanismos.....</i>	53
1.4.6.6.1. <i>Afectación del tráfico y viabilidad de linfocitos T.....</i>	53
1.4.6.6.2. <i>Inducción de apoptosis en Linfocitos T.....</i>	53
1.4.7. <i>Especificidad de las MDSCs para suprimir la respuesta inmune en tejidos específicos.....</i>	55

1.4.8. Mecanismos de inmunoterapia para suprimir la expansión y activación de MDSCs	57
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	60
III. OBJETIVOS	61
3.1. Objetivo General.....	61
3.2. Objetivos Específicos	61
IV. METODOLOGIA	61
4.1. Población de estudio	61
4.2. Criterios de Inclusión	62
4.3. Criterios de Exclusión	62
4.4. Obtención de células mononucleares de sangre periférica.....	63
4.5. Caracterización fenotípica de MDSCs polimorfonucleares	63
4.6. Caracterización fenotípica de Linfocitos T.....	63
4.7. Evaluación de la expresión de la cadena ζ del receptor de células T	64
4.8. Cuantificación de las citocinas IL-10, IL-6, IL-17A, IL-1 β e INF- γ	64
4.9. Cuantificación de TGF- β 1 por ELISA	65
5. Análisis Estadístico.....	66
V. RESULTADOS	67
5.1. Características clínico - demográficas de los sujetos estudiados	67
5.2. Incremento de la población supresora de origen mieloide CD66b ⁺ CD11b ⁺ CD15 ⁺ CD14 ⁻ HLADR ⁻ en pacientes con adenocarcinoma en estadio IV.....	68
5.3. Evaluación de la expresión de la cadena ζ en las subpoblaciones CD3 ⁺ , CD3 ⁺ CD4 ⁺ y CD3 ⁺ CD8 ⁺	68
5.4. Menor sobrevida en pacientes con alta frecuencia de células supresoras de origen mieloide y en pacientes con baja expresión de CD3 ζ en poblaciones linfocitarias.....	72
5.5. Cuantificación de las citocinas IL-10, IL-6, IL-17A, IL-1 β e INF- γ	74
5.6. Cuantificación de TGF β 1 por ELISA.....	75
VI. DISCUSION	76
VII. CONCLUSION	84
VIII. LITERATURA CITADA.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS

MDSC	Células Supresoras de Origen Mieloide
NK	Célula Asesina Natural
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
APC	Células Presentadoras de Antígeno
DCs	Células Dendríticas
Th	Células T auxiliares
IL	Interleucina
TGF- β	Factor de Crecimiento Tumoral-beta
IFN- γ	Interferón gamma
GM-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos/macrófagos
M-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos
G-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos
TCR	Receptor de Células T
ITAM	Inmunoreceptor Motivos de Activación Basados en Tirosina
TSA _s	Antígenos Específicos de Tumores
Treg	Células T Reguladoras
ADN	Acido Desoxirribonucleico
CPNM	Cáncer Pulmonar No Microcitico
CPM	Cáncer Pulmonar Microcitico
TAM _s	Macrófagos Asociados al Tumor
HSC	Células madre hematopoyéticas multipotentes
PAMP _s	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
DAMP _s	Patrones Moleculares Asociados al Daño
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
HIF1 α	Factor Transcripcional Inducible de Hipoxia
ARG1	Arginasa-1
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
SCF	Factor de Células Madre
STAT3	Transductor de Señal y Activador de la Transcripción 3
Bcl-XL	Linfoma de Células B-XL
iNOS	Óxido Nítrico Sintasa inducida
NF- κ B	Factor Nuclear-kappa beta
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
ATRA	Ácido Trans-retinoico
PBMC _s	Células Mononucleares de Sangre Periférica

RESUMEN

El cáncer de pulmón a nivel mundial es la forma más frecuente de cáncer en términos de incidencia y mortalidad causando miles de muertes cada año, con las tasas más elevadas en países desarrollados. En México representa la segunda causa de muerte por cáncer y a pesar de los esfuerzos por detectarlo tempranamente, generalmente éste se diagnostica en estadios avanzados y con un diagnóstico pobre para los pacientes. El cáncer de pulmón es una enfermedad resultante del crecimiento anormal de células en el tejido pulmonar y se origina a partir de células epiteliales. De acuerdo con la OMS, el cáncer pulmonar puede dividirse en dos grandes grupos: carcinomas pulmonares de células pequeñas (SCLC, por sus siglas en inglés) y carcinomas pulmonares de células no pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés), los cuales y de acuerdo con distintos reportes, señalan que el grupo de NSCLC representa el 80% de todos los casos de cáncer pulmonar. El NSCLC está integrado a su vez por tres tipos histopatológicos principales: carcinoma de células grandes (LCC), carcinomas epidermoides o carcinomas de células escamosas (SCC) y adenocarcinomas (AD).

La capacidad del sistema inmune para identificar y destruir los tumores, y para funcionar de ese modo como una defensa principal contra el cáncer, ha sido estudiado durante las últimas décadas. En éste y en todos los tipos de cáncer, se activa una respuesta inmune antitumoral, sin embargo de alguna manera no descrita por completo, el tumor puede evadir la respuesta inmune, en la cual algunas células accesorias del sistema inmune que son necesarias para una respuesta antitumoral efectiva, son manipuladas por el tumor para participar en la inactivación de poblaciones efectoras encargadas de destruir a las células cancerosas. Así, la respuesta inmune en el microambiente tumoral está cada vez más implicada como un factor determinante en la progresión tumoral y la agresividad. Las Células Supresoras de Origen Mieloide (MDSCs, por sus siglas en inglés: Myeloid Derived Suppressor Cells) constituyen una población heterogénea de células mieloides inmaduras compuesta por macrófagos, granulocitos, células dendríticas y otras poblaciones de origen mieloides en estadios tempranos de diferenciación capaces de modular negativamente la respuesta inmune con su potente incremento y activación inducidos por el propio tumor. Actualmente se sabe que las MDSCs ejercen su efecto mediante diversos mecanismos que generan alteración en el tráfico, viabilidad, activación y proliferación de células T anti-tumorales. Aunado a sus capacidades inmunosupresoras, las MDSCs también promueven la neoangiogénesis y metástasis tumoral. Debido a la relevancia

clínica del incremento de estas poblaciones supresoras en pacientes con diferentes tumores sólidos, comienzan a emplearse como marcadores de carga tumoral, pronóstico, supervivencia y respuesta al tratamiento. Por otro lado, la pérdida de la cadena CD3 ζ es uno de los mecanismos descritos que demuestra tener relevancia en la función de las células T, la cual se expresa bajo condiciones apropiadas de proliferación y su ausencia es un indicativo de anergia celular. Además, la disminución en la expresión de dicha cadena causa una reducción en el efecto citotóxico, en la proliferación celular y en las citocinas cooperadoras Th. Así mismo, se ha demostrado que la secreción de arginasa-1 por parte de los macrófagos activados, granulocitos y MDSC inducen la pérdida de la cadena ζ por lo que es un importante mecanismo de supresión de las células T en ratones portadores de tumores y en humanos. Debido al papel central que juega la cadena TCR ζ en la señalización celular, se espera que las consecuencias biológicas de su baja expresión y/o ausencia sean considerables, lo que resulta en una disminución de la inmunidad antitumoral, peor pronóstico y una menor supervivencia. Con el fin de identificar una posible asociación entre la presencia de células supresoras de origen mieloide y la supresión funcional de las células T de sangre periférica en pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas, se analizaron muestras sanguíneas de pacientes en estadio IV libres de tratamiento y sujetos sanos. Los resultados obtenidos muestran un incremento de células mieloides con fenotipo supresor CD66b⁺ CD11b⁺ CD15⁺ CD14⁻ HLADR⁻ en pacientes con adenocarcinoma pulmonar comparado con controles (p<0.0001). Adicionalmente se observó una disminución en la frecuencia de linfocitos T totales (p<0.0001) así como de las subpoblaciones CD4⁺ (p<0.0001) y CD8⁺ (p<0.0052) en los pacientes con adenocarcinoma pulmonar. Además se demuestra una disminución significativa en la expresión de la cadena ζ del receptor CD3 en la población de linfocitos totales (p<0.0001) en las subpoblaciones de linfocitos colaboradores (p<0.0001) y citotóxicos (p<0.0001), lo que indica una disminución en la señal de proliferación inducida por esta cadena en los pacientes con cáncer de pulmón y su ausencia es un indicativo de anergia celular, ocasionando un peor pronóstico y una menor supervivencia. Finalmente encontramos un incremento significativo en los niveles de interleucina 6 (p<0.0001), IL-10 (p<0.0027), IL-17 (p<0.0001), IL-1 β y TGF- β (p<0.0001) en muestras de pacientes con adenocarcinoma pulmonar con respecto a los sujetos control, en comparación con la citocina INF- γ (p<0.0001) que mostro una disminución significativa. Estos datos sugieren que en los pacientes con adenocarcinoma pulmonar los bajos niveles circulantes de los linfocitos T, sugieren al menos, la afectación de su proliferación y activación.

ABSTRACT

Lung cancer is globally the most common form of cancer in terms of incidence and mortality causing thousands of deaths each year, with the highest rates in developed countries. In Mexico represents the second leading cause of cancer death despite efforts to detect it early, this is usually diagnosed in advanced stages and poor diagnosis for patients. Lung cancer is a disease resulting from abnormal cell growth in lung tissue and originating from epithelial cells. According to OMS, lung cancer can be divided into two groups: small cell lung carcinoma (SCLC) and non-small lung carcinomas (NSCLC), and which according to various reports, indicate that the group of NSCLC it is representing 80% of all lung cancer cases. NSCLC is integrated in turn by three main histological types: large cell carcinoma (LCC), squamous cell carcinomas (SCC) and adenocarcinomas (AD). The ability of the immune system to identify and destroy tumor system, and thereby to function as a primary defense against cancer has been studied for decades. In this and in all types of cancer, anti-tumor immune response is activated, however in a manner not described completely, the tumor can evade the immune response, in which some accessory cells of the immune system that are necessary for an answer antitumor effective, are manipulated by the tumor to participate in the inactivation of effector cell populations responsible for destroying cancer cells. Therefore, the immune response in the tumor microenvironment is increasingly implicated as a factor in tumor progression and aggressiveness. Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSCs) are a heterogeneous population of immature myeloid cells composed of macrophages, granulocytes, dendritic cells and other populations of myeloid origin in early stages of differentiation capable to negatively modulate the immune response with its powerful increase and activation induced by the tumor itself. Currently it is known that MDSCs exert their effect through different mechanisms that generate traffic disruption, viability, activation and proliferation of anti-tumor T cells. In addition to their immunosuppressive capabilities, MDSCs also promote neoangiogenesis and tumor metastasis. Because the clinical relevance of these suppressor populations increased in patients with various solid tumors begin to be used as markers of tumor burden, prognosis, survival and response to treatment. Furthermore, loss of CD3 ζ chain is one of the mechanisms described have relevance in showing the function of T cells, which is expressed under appropriate conditions of growth and its absence is indicative of cellular anergy. Furthermore, the decreased expression of the chain causes a reduction in the cytotoxic effect, cell proliferation and Th helper cytokines. Also, it has been

shown that secretion of arginase-1 by activated macrophages, granulocytes and MDSC induce loss of the ζ chain so it is an important mechanism of suppression of T cells in tumor bearing mice and human. Given the central role of TCR ζ chain in cell signaling, it is expected that the biological consequences of its low expression and / or absence are considerable, resulting in decreased anti-tumor immunity, poor prognosis and decreased survival. In order to identify a possible association in the presence of Myeloid-Derived Suppressor Cells and functional suppression of T cells from peripheral blood in patients with non-small cells lung cancer, blood samples were analyzed in patients free treatment stage IV and healthy subjects. The results showed an increase in myeloid cells with suppressor phenotype CD66b⁺ CD11b⁺ CD15⁺ CD14⁻ HLADR⁻ (p <0.0001) compared to healthy controls. Additionally we observed a decrease in the frequency of total T lymphocytes (p <0.0001), and subpopulations of CD4⁺ (p <0.0001) and CD8⁺ (p <0.0052) in patients with pulmonary adenocarcinoma. Furthermore demonstrated a significant decrease in the expression of ζ chain CD3 receptor in total lymphocyte population (p<0.0001) and helpers lymphocytes subpopulations (p<0.0001) and cytotoxic (p<0.0001), indicating a decrease in the signal of this chain induced proliferation in patients with lung cancer and its absence is indicative of cell anergy, resulting in poor prognosis and decreased survival. Finally found a significant increase in the levels of interleukin-6 (p <0.0001), IL-10 (p <0.0027), IL-17 (p <0.0001), IL-1 β and TGF- β (p <0.0001) in samples lung adenocarcinoma patients compared to control subjects, compared with IFN- γ (p <0.0001) cytokine that showed a significant decrease. These data suggest that in patients with lung adenocarcinoma low circulating levels of T cells, at least the effect on the proliferation and activation.

INTRODUCCION

El cáncer es un proceso multifactorial, en el cual se involucran mutaciones genéticas de las células normales, así como cambios fisiológicos dentro de las células cancerosas, originando una serie de daños en el material genético que conlleva a una alteración en el ciclo celular, provocando que una célula se vuelva inmortal y se replique de manera descontrolada (1, 2). El cáncer de pulmón es una enfermedad resultante del crecimiento anormal de células en el tejido pulmonar y se origina a partir de células epiteliales (carcinomas). Este crecimiento maligno deriva generalmente en invasión y metástasis (2). De acuerdo con la OMS, el cáncer pulmonar puede dividirse en dos grandes grupos: carcinomas pulmonares de células pequeñas (SCLC) y carcinomas pulmonares de células no pequeñas (NSCLC), los cuales y de acuerdo con distintos reportes, señalan que el grupo de NSCLC representa el 80% de todos los casos de cáncer pulmonar. El NSCLC está integrado a su vez por tres tipos histopatológicos principales: carcinoma de células grandes (LCC), carcinomas epidermoides o carcinomas de células escamosas (SCC) y adenocarcinomas (AD), abarcando el SCC y AD, cerca del 85% de todos los casos de NSCLC (3). Reportes de Estados Unidos han señalado un índice de supervivencia de cinco años cercano al 5% para el estadio clínico IIIB y prácticamente nulo (1%) para estadios IV (clasificación TNM, séptima edición). Así, en la actualidad no se ofrece solución terapéutica alguna, lo que conlleva a altos índices de mortalidad y baja eficiencia terapéutica (4).

La etiología del cáncer de pulmón, así como del cáncer en general, incluye a la predisposición genética, la radiación ionizante y la exposición a agentes carcinógenos (en particular los productos de la combustión como el tabaco y el humo de leña). El tabaco constituye un grave problema de salud a nivel mundial. Se estima que 500 millones de personas fumadoras morirán en los próximos años a causa del cáncer (5). Los productos del tabaco contienen una variedad de carcinógenos químicos que favorecen el desarrollo de diversos cánceres. Se han descrito más de 60 carcinógenos contenidos en el humo del tabaco, siendo los más peligrosos (por su demostrada capacidad para producir cáncer en animales de experimentación en pequeñas dosis) los hidrocarburos aromáticos policíclicos, las nitrosaminas y las aminas aromáticas (6). Existe una clara relación entre la exposición al humo del tabaco y el riesgo de desarrollar un carcinoma pulmonar. La exposición a estos agentes causa cambios acumulativos sobre el ADN de las células, induciendo alteraciones genéticas progresivas que al perpetuarse inician un evento

carcinogénico que transformara el epitelio que reviste los bronquios del pulmón.

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

Las células supresoras de origen mieloide (MDSCs) constituyen una población heterogénea de células mieloides inmaduras compuesta por macrófagos, granulocitos, células dendríticas y otras poblaciones de origen mieloide en estadios tempranos de diferenciación que ejercen una actividad inmunosupresora en el microambiente tumoral (10, 11). Estas células pueden considerarse un elemento basal de regulación inmune natural, ya que pueden evitar el daño e inflamación que causarían poblaciones citotóxicas, después de haber eliminado al agente extraño. Sin embargo, en algunos estados patológicos, traumas, inflamación, trasplantes y otras condiciones de estrés, estas células supresoras pueden expandirse en la medula y viajar al torrente sin haber madurado correctamente. Como resultado de esta liberación, las MDSCs se acumulan en órganos linfoides periféricos en donde pueden expandirse y migrar a sitios blanco y al torrente sanguíneo. Estas subpoblaciones ejercen su efecto supresor sobre las células y moléculas de la respuesta inmune innata y adaptativa, en particular sobre los linfocitos T (11). La actividad funcional de las MDSC se manifiesta a través de su capacidad de inhibir la producción de Interferón gamma (IFN- γ) producido por linfocitos T CD8⁺ en respuesta a péptidos provenientes de antígenos tumorales presentados en la superficie de las MDSCs (12). Este efecto depende de la expresión de MHC-I por las MDSC y no es mediado por factores solubles sino que requiere del contacto célula-célula.

Recientemente, se han definido de manera más precisa la heterogeneidad morfológica de las MDSC y se han detectado dos subclases de células supresoras de origen mielóide: Las MDSC granulocíticas y aquellas con morfología monocítica. La evidencia indica que estos dos fenotipos quizá tengan funciones diferentes en el cáncer, infección y en enfermedades autoinmunes (13, 14). En sangre de pacientes con diferentes tipos de cáncer se ha detectado un incremento en el número de MDSC de hasta 10 veces y también se observó un número inusualmente alto de células mieloides de fenotipo granulocítico en circulación.

Por otro lado, se han identificado diferentes factores que están implicados en la inmunosupresión de estas células, como son la Arginasa, especies reactivas de oxígeno e iNOS. La expresión de las enzimas Arginasa-1 e iNOS agotan de manera constante en el medio extracelular los niveles de L-arginina y L-cisteína, aminoácidos necesarios para la proliferación de los linfocitos T CD8⁺, ya que bajo cantidades limitadas de L-arginina, iNOS produce peroxinitritos (ONOO₂), un agente oxidante altamente reactivo que causa la nitración y la nitro-acilación de diferentes aminoácidos (cisteína, metionina, triptófano y tirosina) del TCR y moléculas CD8 (15). Esto parece afectar la flexibilidad conformacional del receptor TCR de las células T CD8⁺ y su interacción con el complejo principal de histocompatibilidad (MHC de clase I), provocando que las células T CD8⁺ no respondan a un estímulo antígeno específico, induciendo vías apoptóticas en estos linfocitos (16, 17). Asimismo, se ha demostrado in vitro que el agotamiento de L-arginina bloquea la proliferación celular (arresto del ciclo celular en la fase G0-G1), disminuye la producción de citocinas por parte de las células T e induce la pérdida de la cadena CD3- ζ (18).

En ese sentido, otro de los mecanismos responsables de la baja expresión de la cadena ζ en pacientes con distintos tipos de cáncer, puede ser la secreción de citocinas inmunosupresoras por las células tumorales, las cuales producen TGF- β 1 e IL-10 (19) y aún más importante, los elevados niveles séricos de estas citocinas también se han correlacionado con una disminución en la expresión de la cadena ζ . Además se ha sugerido que la baja expresión de la cadena ζ se asocia con una disminución de las citocinas de tipo 1 como IFN γ , IL-2 y TNF- α (20, 21). Así mismo, la disminución en la expresión de dicha cadena causa una reducción en el efecto citotóxico, en la proliferación celular y en las citocinas cooperadoras Th, y se ha descrito en el contexto de diferentes tipos de tumores humanos.

Es por ello que la cadena ζ del CD3 es un importante componente para la transducción de señales en el TCR y se requiere para el correcto ensamblaje del receptor. La pérdida de

esta cadena es uno de los mecanismos descritos que demuestra tener relevancia en la función de las células T, la cual se expresa bajo condiciones apropiadas de proliferación y su ausencia es un indicativo de anergia celular (21). Debido al papel central que juega la cadena TCR ζ en la señalización celular, se espera que las consecuencias biológicas de su baja expresión y/o ausencia sean considerables, lo que resulta en una disminución de la inmunidad antitumoral, peor pronóstico y una menor supervivencia.

Por lo anterior, este estudio pretende identificar una posible asociación entre la presencia de células supresoras de origen mieloides y la supresión funcional de las células T de sangre periférica en pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas.

I. ANTECEDENTES

1.1. Cáncer

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

El cáncer también se caracteriza por inducir una desregulación celular y molecular a distintos niveles y estos aspectos pueden resumirse bien en lo que hoy se conoce como “características” o “hallmarks” del cáncer (Figura 1). El cáncer se desarrolla manteniendo la señalización proliferativa, la evasión a la acción de moléculas supresoras de crecimiento, la inducción de la angiogénesis, la resistencia a la muerte celular, la replicación sin límite, la activación de la invasión y metástasis, la generación de hipoxia, y la remodelación del metabolismo energético así como la evasión del sistema inmune. El trabajo conjunto de algunos ó todos estos eventos aportan información acerca de cómo podrían llevarse a cabo los eventos de iniciación, progresión y metástasis (7).

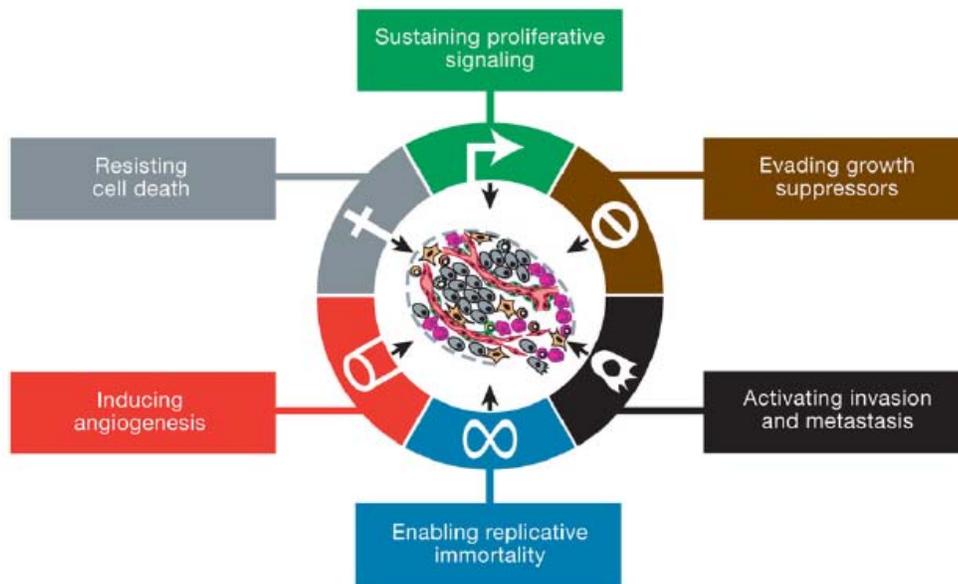


Figura 1. Capacidades adquiridas del Cáncer. Las células tumorales de la mayoría de los cánceres comparten 6 características generales: Auto suficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis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

Particularmente la evasión de la respuesta antitumoral inducida por el mismo proceso neoplásico ha sido de gran interés científico. La comprensión funcional y el manejo terapéutico de poblaciones celulares del sistema inmune que se acumulan y se expanden durante el crecimiento tumoral en vez de contrarrestar su progresión, promueven el desarrollo del cáncer (7). Ya que 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 y de esta forma favorecen el desarrollo tumoral.

1.1.1. Inmunología del cáncer

El sistema inmune es un sistema complejo y se compone de elementos que mantienen una relación estrecha para el correcto cumplimiento de sus funciones. Los componentes de la inmunidad celular (linfocitos, células fagocíticas y células presentadoras de antígenos) y de la inmunidad humoral (inmunoglobulinas y citocinas) activan en conjunto para poder establecer una respuesta contra agentes extraños (22).

El sistema inmune tiene tres funciones principales en la prevención de tumores. En primer lugar, puede proteger al huésped de tumores inducidos por virus mediante la eliminación o la supresión de infecciones virales. En segundo lugar, la eliminación oportuna de los patógenos pueden impedir el establecimiento de un microambiente inflamatorio propicio para la tumorigénesis. Y por último, el sistema inmune puede identificar y eliminar específicamente a las células tumorales en ciertos tejidos mediante la expresión de antígenos específicos de tumores (TSAs por sus siglas en inglés) o moléculas inducidas por el estrés celular (22). Este último proceso se conoce como vigilancia inmune y comprende un sistema de monitoreo constante de células y tejidos, mediante el cual el sistema inmune identifica a las células cancerígenas y/o pre-cancerígenas y las elimina antes de que puedan causar daño. Éste proceso es responsable de reconocer y eliminar la gran mayoría de las células transformadas (22). De alguna manera no del todo clara, la vigilancia inmune no siempre tiene éxito, lo que resulta en el crecimiento y expansión de tumores que han evitado las distintas defensas del sistema inmune (inmunoedición) (23). Durante este proceso, el sistema inmune destruye muchas células pre-cancerosas y malignas. Sin embargo, algunas células evaden la respuesta inmune e inducen el crecimiento progresivo de tumores. La inmunoedición del cáncer es un proceso dinámico

compuesto por tres fases distintas: eliminación, equilibrio, y escape (Figura 2). En la fase de eliminación las células tanto de la inmunidad innata como adaptativa trabajan juntas para detectar la presencia de un tumor en desarrollo y destruyen muchos otros antes de que se vuelvan clínicamente evidentes. En la primera fase del proceso, las células del sistema inmune localizan, reconocen y destruyen a las células recién transformadas y previenen el desarrollo de nuevas células cancerígenas (22, 23). Sin embargo, la fase de eliminación se dice que es completa, cuando todas las células tumorales se erradican con éxito, o incompleta, cuando algunas clonas de células tumorales a veces no pueden ser completamente eliminadas, y entran en una fase de equilibrio con el hospedero. Los tumores en esta fase son un subconjunto de tumores latentes que son controlados específicamente por los componentes del sistema inmune. Así, el sistema inmune del hospedero y las células tumorales entran en un equilibrio dinámico, donde a pesar de la presencia de una potente inmunidad antitumoral, no se erradican totalmente las poblaciones heterogéneas de células tumorales. Algunas de estas células adquieren ciertas características para evadir el reconocimiento inmune y la destrucción. Un posible resultado de la inmunoección del cáncer ocurre cuando los tumores escapan del control inmunológico, lo que lleva a la aparición del cáncer (22, 23). Por lo tanto, la fase de escape representa el fracaso del sistema inmune, ya sea para eliminar o controlar a las células transformadas, lo que permite que sobrevivan algunas clonas de células tumorales y se repliquen de manera descontrolada (22, 23).

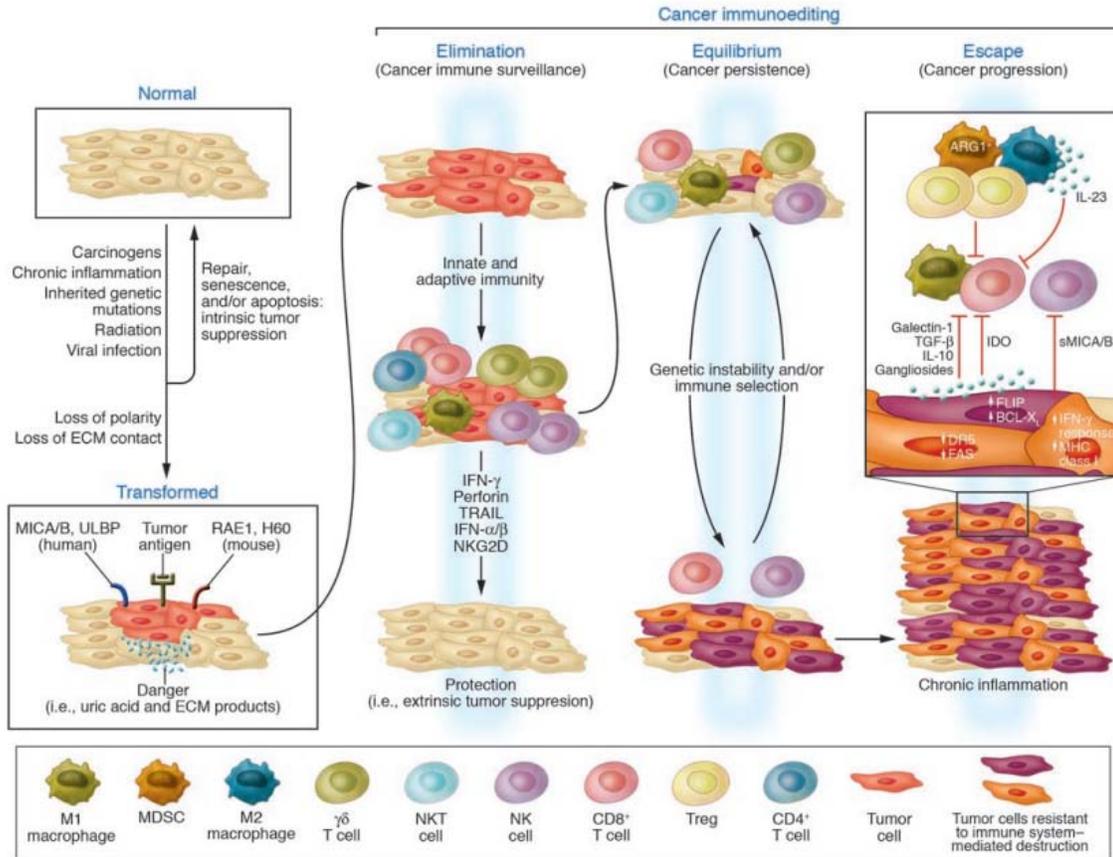


Figura 2. Supresión tumoral extrínseca por el sistema inmune. Las células transformadas se escapan del control intrínseco al que son sometidos los mecanismos supresores de tumores extrínsecos que detectan y eliminan los tumores en desarrollo antes de que sean clínicamente evidentes. Esto se conoce como la fase de eliminación de un proceso más amplio que se ha denominado inmunoedición del cáncer. La inmunoedición del cáncer es ahora considerada como un proceso compuesto por tres fases: Eliminación: Después de la transformación de células normales en cancerosas, el ataque de las diferentes células del sistema inmune, que comprenden la red de inmunovigilancia del cáncer pueden erradicar el tumor en desarrollo y proteger al hospedero de la formación de tumores. Equilibrio: Si la eliminación se realiza correctamente, el sistema inmunológico y el cáncer pueden llegar a un equilibrio en el que las células inmunes mantienen al cáncer bajo control y están inmunológicamente bajo “inmunoeditores” que producen nuevas poblaciones de variantes tumorales con inmunogenicidad reducida y una mayor capacidad para sobrevivir a un ataque inmunológico. Estas variantes pueden eventualmente evadir el sistema inmune por una variedad de mecanismos, expandirse de una manera incontrolada y convertirse clínicamente en la fase de Escape, en la cual participan un gran número de posibles mecanismos inmunosupresores para atenuar la respuesta inmune antitumoral que conduce a la aparición de tumores (Imagen de Jeremy B. Swann and Mark J. Smyth, Review The Journal of Clinical Investigation 2007).

Así mismo, factores derivados del tumor y citocinas producidas por los linfocitos activados reclutan a muchos componentes del sistema inmune como parte de la respuesta antitumoral. Los antígenos tumorales y factores derivados del tumor atraen a células mieloides y linfoides que se infiltran en ganglios linfáticos para la presentación de

antígenos a los linfocitos T vírgenes, promoviendo la activación de linfocitos T colaboradores con perfil de tipo 1 que inducen la activación y expansión de linfocitos T citotóxicos. Estos linfocitos efectores son capaces de destruir células cancerosas a través de moléculas efectoras como la granzima B y la perforina (24, 25).

Distintos estudios han demostrado la existencia de una respuesta inmune antitumoral en algunas formas de cáncer humano (26-28). Se ha descrito que pacientes con tumores en colon y ovario que están fuertemente infiltrados con linfocitos T citotóxicos y células NK (NK; natural killers, asesinas naturales, por sus siglas en inglés), y tienen un mejor pronóstico que aquellos que carecen de estos linfocitos (29) (Figura 3). Sin embargo, se ha observado que la respuesta que se establece durante el desarrollo del cáncer puede estar sujeta a la inactivación de componentes del sistema inmune que se encargan de destruir células cancerosas. Por ejemplo, el complejo microambiente tumoral puede paralizar la infiltración de linfocitos T citotóxicos y células NK, mediante la secreción de TGF- β y de otros factores inmunosupresores (30, 31). Así mismo, se han descrito ampliamente mecanismos más sutiles que operan a través del reclutamiento y acumulación de células inflamatorias inmunosupresoras, incluyendo las células T reguladoras (Treg) y MDSCs que pueden suprimir la acción de los linfocitos T citotóxicos (32, 33).

pérdida del apetito o fatiga. Desde el punto de vista topográfico predomina la localización en el pulmón derecho. Principalmente en los lóbulos superiores y dentro de éstos en el segmento anterior. Con menor frecuencia se localiza en los lóbulos inferiores y rara vez en el lóbulo medio y lingula (34).

Así mismo, el pulmón es un sitio común para la metástasis diseminada de tumores que comienzan en alguna otra parte del cuerpo. Esto es debido a que los pulmones reciben todo el flujo linfático, sanguíneo y contienen la red capilar más densa de todo el organismo. Por lo que, la heterogeneidad morfológica de la metástasis pulmonar es enorme. Los tumores más comunes que se propagan a los pulmones son los provenientes del cáncer de vejiga, mama, colon, próstata, estómago, páncreas, riñón, hígado, melanoma y neuroblastomas (35).

Por otro lado, los tumores primarios del pulmón hacen metástasis especialmente en las glándulas suprarrenales, hígado, cerebro, y hueso.

1.2.1. Epidemiología del cáncer pulmonar

El cáncer de pulmón es una neoplasia muy agresiva y mortal dado que gran parte de los pacientes mueren antes del primer año después del diagnóstico, dependiendo del estado de sus pulmones, su capacidad para generar defensas y la tolerancia ante la radioterapia y/o quimioterapia. A nivel mundial, el cáncer de pulmón es la forma más frecuente de cáncer en términos de incidencia y mortalidad causando miles de muertes cada año, con las tasas más elevadas en países desarrollados (34, 36)

El segmento poblacional más afectado con esta enfermedad, son los pacientes mayores de 50 años de edad que tienen antecedentes de tabaquismo. Mientas que menos de la sexta parte de los casos ocurren en pacientes menores de 30 años. La edad promedio de las personas diagnosticadas con cáncer del pulmón es cercana a los 60 años. Sin embargo, esta tendencia se modifica conforme aumenta la cantidad de fumadores jóvenes (3), con lo cual se ha establecido que a menor edad de inicio del tabaquismo, y a mayor cantidad de cigarros y años fumando, es mayor el riesgo de desarrollar cáncer pulmonar, aunque también es importante la predisposición genética. El cáncer pulmonar constituye la principal causa de muerte por cáncer a nivel mundial. De acuerdo con datos de la OMS, de un total de 7.9 millones de defunciones por cáncer en 2007, 1.4 millones fueron secundarias al cáncer pulmonar, lo cual representó 17.7% del total de muertes por cáncer (37). En México el cáncer de pulmón es la primera causa de muerte. En 2008, las muertes por esta enfermedad en el país fueron 6,697, las cuales exceden a las

producidas por otros tumores (estómago, próstata, mama e hígado). En México se ha observado un aumento en la incidencia a partir de 1970, particularmente durante 1998 a 2004, periodo en el que se registraron 397,400 muertes por neoplasias malignas, de éstas, 45,578 (11.5%) correspondieron a cáncer pulmonar. En este lapso, la incidencia del cáncer pulmonar aumentó en aproximadamente 16% (Figura 4).

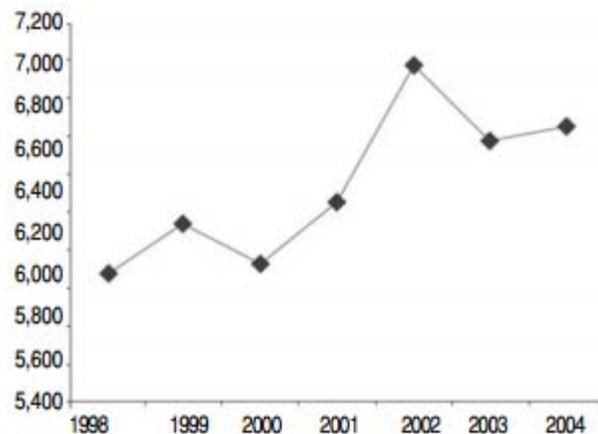


Figura 4. Incidencia de cáncer pulmonar en México (1998-2004). Modificado de Meneses-García 2007.

Entre los diferentes estados de la República Mexicana existen diferencias epidemiológicas. En general, las tasas de mortalidad por cáncer pulmonar tienden a ser mayores en los estados del norte de México que en los del sur (Figura 5). Este hallazgo se explica, al menos en parte, por la difusión más tardía de la epidemia de tabaquismo en los estados del sur de México (37). La mortalidad por cáncer pulmonar en varones, ajustada por edad, fue de 9.25 casos por cada 100,000 personas mayores de 30 años en 1980, y aumentó a 11.91 para 1989, para luego descender gradualmente hasta el 2000, cuando fue de 8.65 muertes. En mujeres, la tasa disminuyó de 3.93 casos en 1980 a 3.55 en 2000. Tales cambios representan una reducción de 6.5% en varones y de 9.67% entre mujeres. En comparación con los países desarrollados, en México los enfermos con cáncer pulmonar se presentan a recibir atención especializada en etapas más avanzadas de la enfermedad. Ello se debe al bajo nivel académico de la mayoría de la población, aunado a la falta de programas de educación para la salud que informen sobre los signos y síntomas característicos del cáncer pulmonar. En el Instituto Nacional de Cancerología, sólo 1.2% de los pacientes se detecta en etapas tempranas, 16% con enfermedad localmente avanzada y hasta 82% con enfermedad metastásica (37). Los motivos de la

falta de diagnóstico en etapas tempranas en México, en comparación con países desarrollados como Estados Unidos (16 vs. 20%) y Japón (~40%), son la falta de cultura y educación para la salud en la población, la poca difusión en medios masivos de comunicación, la falta de capacitación de los médicos de primer contacto y un sistema de referencia lento.



Figura 5. Epidemiología del cáncer pulmonar en México. A. Mujeres. B. Hombres. Modificado de Meneses-García 2007.

1.2.2. Etiología del cáncer pulmonar

La susceptibilidad genética y el medio ambiente, incluido el humo del tabaco, interactúan para favorecer la carcinogénesis. El daño al tejido que causa el humo del tabaco se refleja en pulmones con coloración oscura y cambios que ocurren a nivel genético y epigenético (como mutaciones, pérdida de heterocigocidad, y metilación de promotores) y a nivel del transcriptoma (inflamación y vías apoptóticas). Si los cambios se perpetúan desembocan en la activación de vías aberrantes para la función celular, dando inicio a la malignidad. Los cambios moleculares que promueven la angiogénesis, invasión y metástasis, seguirán apareciendo conforme avanza la enfermedad (Figura 6). Por otro lado, el cáncer no asociado al tabaquismo puede ser inducido por factores genéticos, hormonales, o ambientales.

Unas de las principales causas del cáncer de pulmón, así como del cáncer en general, incluyen a carcinógenos tales como los productos de la combustión y la radiación ionizante. La exposición a estos agentes causa cambios acumulativos sobre el ADN de las células, induciendo progresivamente alteraciones genéticas que transforman el epitelio que reviste los bronquios del pulmón. A medida que el daño es más extenso, se desarrolla el cáncer (25).

Los principales factores de riesgo, por orden de importancia, son el tabaquismo activo y pasivo, y la exposición a humo de leña. Otros factores de riesgo incluyen la exposición a elementos como arsénico, sílice, asbesto, ácido crómico, éter, clorometilo, níquel e hidrocarburos policíclicos aromáticos; así como factores genéticos y la contaminación ambiental (38). La causa más común de cáncer de pulmón es el tabaquismo, correspondiendo a la mayor parte de los sujetos diagnosticados, aquellos que son fumadores o ex fumadores. La demostración de que existe una relación directa entre el consumo del tabaco y la aparición del cáncer de pulmón está bien establecida, y se considera más un factor causal que un factor de riesgo (25). Según el número de cigarrillos fumados al día, las personas tienen un riesgo de 10 a 20 veces mayor de desarrollar cáncer de pulmón que aquellas que no fuman (39).

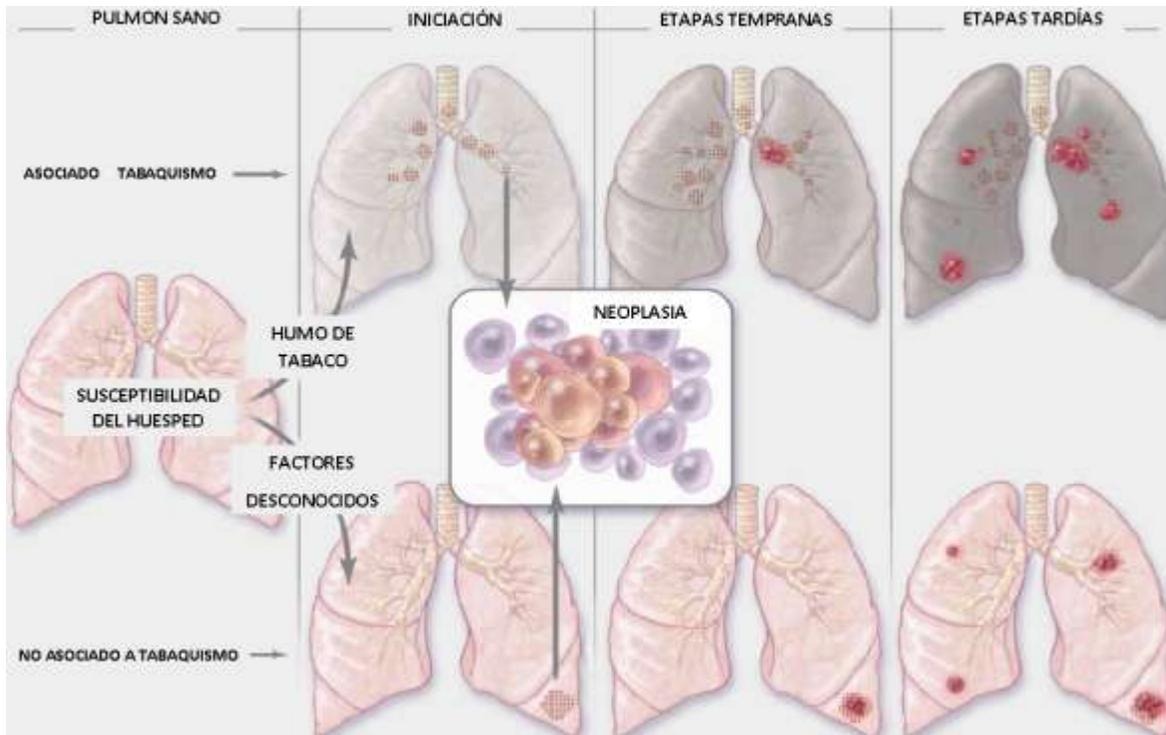


Figura 6. Evolución del Cáncer de Pulmón. En el cáncer de pulmón asociado al tabaco existe una ruta de evolución distinta a la que sigue el cáncer asociado a otros factores. En ambos casos la susceptibilidad del huésped influirá en el proceso neoplásico (Imagen de Herbst RS, N. Engl. J. Med. Lung cancer. 2008).

En las distintas fases del humo de tabaco (gaseosa y sólida o de partículas) se encuentran al menos 4.000 compuestos químicos, de los cuales alrededor de 50 se han asociado a una capacidad para generar cáncer, destacando el benceno y cloruro de vinilo, benzopireno, formaldehído, hidrazina, nitropropano, nitrosaminas, uretano, etc. El efecto individual de los carcinógenos es difícil de estudiar a nivel molecular, ya que en la práctica, lo que se produce es una exposición crónica a una mezcla compleja de moléculas consideradas carcinógenas o pro-carcinógenas (39). La combustión del humo de tabaco genera además, grandes cantidades de radicales libres, derivados del oxígeno, nitrógeno, etc., altamente reactivos y con gran capacidad de dañar macromoléculas, incluido el DNA. Estos agentes también pueden activar a macrófagos alveolares, los cuales dan lugar a una inflamación crónica capaz de favorecer la transformación tumoral. Cuantos más años haya fumado una persona y sobre todo en edad temprana, ésta puede ser susceptible a desarrollar cáncer, debido a que la dosis de sustancias carcinógenas se vuelven acumulativas. Aunque el abandono del tabaquismo reduce el riesgo de contraer

cáncer de pulmón, no lo reduce a los niveles de quienes nunca fumaron. En los fumadores se producen alteraciones estructurales y funcionales en el epitelio bronquial (alteración de los cilios, hiperplasia mucosa con metaplasia escamosa, etc.) que pueden tardar años en desaparecer una vez que se ha abandonado el hábito, inclusive, hasta más de 10 años (39).

Por otro lado, se considera que los fumadores pasivos, son aquellas personas expuestas al humo de tabaco del ambiente y/o al humo exhalado por un fumador activo. Para que tal exposición resulte significativa, es necesario generalmente, que ésta tenga lugar en espacios cerrados. Se sabe que las personas fumadoras pasivas presentan alteraciones genéticas similares a las encontradas en los fumadores activos y que los llamados marcadores biológicos de exposición al humo de tabaco ambiental como la cotinina, se pueden encontrar en esas personas a concentraciones más altas que en la población no expuesta (40).

En las personas no expuestas al humo del tabaco, la aparición del cáncer de pulmón es el resultado de una combinación de factores genéticos y la exposición a carcinógenos del entorno, los cuales, pueden dar origen a este tipo de malignidad (41). El grupo de agentes carcinógenos que se pueden encontrar en el ambiente son de diversa naturaleza y se pueden asociar a la carcinogénesis del cáncer pulmonar. El incremento en el riesgo a padecer cáncer se incrementa en la medida que aumenten los años de exposición a éstos agentes, y de manera especial cuando coexiste el tabaquismo.

Noventa por ciento de los casos de cáncer pulmonar se atribuyen al tabaquismo. El otro 10% tiene etiología multifactorial, en la cual diversos carcinógenos, factores genéticos y factores ambientales como el radón (^{86}Rn) y el asbesto han sido asociados. El primero es un gas radioactivo liberado por la descomposición normal del uranio en las rocas y se encuentra en subterráneos y en las minas (37). Es invisible e inodoro, se filtra a través del suelo y se difunde en el aire. Puede contaminar el agua, principalmente en las norias, y liberarse mediante evaporación. En relación con el asbesto, se trata del carcinogénico ocupacional más estudiado, y al que los albañiles están más expuestos, pero también los trabajadores de astilleros de barcos, los obreros de la industria de fabricación de filtros y aislamientos (que utilizan el amianto en tuberías y calderas) y los empleados en cartonaje, textiles, reparación de frenos y tintorería industrial. El arsénico es un metaloide que está presente en forma sólida, líquida y gaseosa. Se utiliza en la fabricación de vidrio, pigmento y juegos pirotécnicos. La exposición más prolongada puede resultar por el consumo de agua contaminada. Sobre el riesgo y población expuesta, parece muy

probable que el asbesto, las radiaciones ionizantes y el humo de tabaco ambiental, sean los agentes que en mayor medida puedan inducir la aparición de esta neoplasia en los trabajadores. Estos y otros agentes nocivos se han asociado al desarrollo de aproximadamente al 10% de los tumores diagnosticados en hombres y mujeres (42).

1.2.3. Clasificación de Cáncer de Pulmón

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

El cáncer de pulmón periférico, es aquel que aparece a partir de los bronquios de quinta generación, los cuales no son accesibles con el broncoscopio y principalmente se presentan en forma de adenocarcinoma. Este tipo de cáncer pulmonar rara vez llega a localizarse en áreas muy alejadas, junto a la pleura (43).

1.2.4. Clasificación histopatológica

El cáncer de pulmón se clasifica según su función y apariencia en dos tipos principales: el cáncer pulmonar de células pequeñas (microcítico) y el de células no pequeñas (no microcítico) (43). Esta clasificación está basada en criterios histológicos y tiene importantes implicaciones para el tratamiento y el pronóstico de la enfermedad. El diagnóstico temprano del cáncer de pulmón es la condición principal para el éxito en su tratamiento. En estadios tempranos éste puede ser tratado en alrededor del 20% de los casos, mediante resección quirúrgica con éxito de curación. Sin embargo, debido a su invasividad y a la dificultad para su detección, en la mayoría de los casos diagnosticados se ha presentado metástasis. El cáncer de pulmón presenta, junto con el cáncer de hígado, páncreas y esófago, los peores pronósticos, con una esperanza de vida promedio de 8 meses aproximadamente (3).

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

Los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC por sus siglas en inglés), 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 (44). 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, mientras solo del 20 al 30% de los pacientes son diagnosticados en estadios tempranos de la enfermedad (I a IIA).

El índice de supervivencia 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, 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).

Los carcinomas pulmonares de células no-pequeñas se agrupan debido a que su pronóstico y tratamiento son muy similares. Existen tres subtipos principales: el carcinoma de células escamosas (25 a 30 %), el carcinoma de células grandes (10-15%) y los adenocarcinomas (40% de los casos). Menos de la tercera parte de todos los carcinomas de pulmón corresponde con un carcinoma de células escamosas y por lo general éstos comienzan cerca de un bronquio central. Aquellos tumores de células escamosas bien diferenciadas suelen crecer lentamente que los otros tipos de cáncer. Estos subtipos difieren en cuanto a lugar de origen y las características de los pacientes, por ejemplo el carcinoma de células escamosas, está asociada con el tabaquismo y el origen de las células epiteliales bronquiales, mientras que el adenocarcinoma se deriva principalmente de las células bronqueo-alveolares (2, 44).

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

También en aquellos sujetos que nunca han fumado, el adenocarcinoma es la forma más frecuente de cáncer de pulmón (41). Uno de los subtipos de adenocarcinomas, el carcinoma bronquioalveolar, se ve con más frecuencia entre mujeres que nunca han

fumado y generalmente muestran una respuesta diferente al tratamiento de un individuo con respecto al otro. Los carcinomas de células gigantes representan aproximadamente una décima parte de todas las formas de cáncer de pulmón. Son tumores que crecen con rapidez cercanos a la superficie del pulmón. A menudo son células pobremente diferenciadas y tienden a invadir y provocar metástasis de manera rápida (41).

1.2.6. Carcinoma de células pequeñas (CPM)

El cáncer de pulmón de células pequeñas es mucho menos frecuente y tiende a aparecer en las vías aéreas de mayor calibre como en los bronquios primarios y secundarios, llegando a formar rápidamente un gran tamaño. Estos tumores malignos están constituidos por células pequeñas, con escaso citoplasma y cromatina finamente granular, con nucléolo pequeño o poco aparente. La necrosis es extensa y los eventos de mitosis son altamente frecuentes. Además suele presentar adenopatías mediastínicas y colapso lobar. En la mayoría de las ocasiones se observan masas perihiliares blandas de color blanco-marrón. Tan solo un 5% de este tipo de cáncer pulmonar es de carácter periférico (45).

El carcinoma de células pequeñas se caracteriza por presentar células en forma de hojuelas de avena que contienen gránulos neurosecretorios densos, es decir, vesículas con hormonas neuroendocrinas y que se asocian con un síndrome endocrino o paraneoplásico. Como una neoplasia de carácter neuroendocrino el CPM puede mostrar crecimiento en nidos o trabéculas, con formación de rosetas, no obstante, también es frecuente el crecimiento difuso. Estas células tumorales tienen núcleos de diferente forma con escaso citoplasma y con tendencia al moldeamiento. La excesiva tendencia a estar diseminado en el momento del diagnóstico solía limitar la utilidad del sistema TNM para su estadificación y se definía como enfermedad limitada versus enfermedad diseminada (45), sin embargo en la actualidad este sistema ya es empleado para estadificar también a este tipo de cáncer pulmonar (46).

1.2.7. Estadificación

El objetivo de la estadificación es determinar el tipo y estado de avance de la enfermedad así como el grado de diseminación. La clasificación anatómica TNM-estadios permite una descripción estandarizada de los tumores pulmonares, una comparación de resultados

entre distintos estudios clínicos y la ubicación de los pacientes en estadios clínicos específicos. Este sistema determina el tamaño del tumor primario (T), la afectación de ganglios linfáticos (N) y la presencia de metástasis a distancia (M) (37, 46).

Para alcanzar el éxito en esta estrategia, la estadificación TNM que sugiere la IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer) es el modelo común que se aplica a nivel global hoy en día. Este comité internacional de estadificación creado por el International Union Against Cancer (UICC) y el American Joint Committee on Cancer (AJCC) reúne y actualiza los datos de diversos centros en el mundo que comparten sus estadísticas regionales. Así, la séptima y última edición TNM de la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón IASLC comprende la información retrospectiva de 100,869 pacientes diagnosticados entre 1990 y 2000, seguidos clínicamente por 5 años y provenientes de 45 fuentes distintas en 20 países, incluido México. De estos pacientes 68,463 cumplieron con los criterios de calidad suficientes para ser analizados como cáncer pulmonar no microcítico y 13,032 como cáncer pulmonar microcítico. En total 81,495 pacientes recibieron los siguientes tratamientos: cirugía 41%, quimioterapia 23%, radioterapia 11%, y el 25%, combinación de los anteriores (46).

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

Componente T

Este componente hace referencia a la extensión y tamaño del tumor primario. Se comparó la supervivencia a 5 años de los pacientes con tumores T2 >7cm frente a la de los de tumores T3. Se encontraron cifras similares en las diferentes poblaciones, excepto en los casos N0 con resección completa, en los cuales se comprobó que la supervivencia era incluso superior en los T3 (41%) que en los T2 >7cm (35%), por lo que se decidió reclasificar a estos últimos como T3 (tabla 1). Cuando se analizaron los tumores que, con estadificación patológica, presentaban nódulos adicionales pudo apreciarse que: la supervivencia a los 5 años era en los T3 (31%) similar a la de los T4 clasificados como tal por la existencia de nódulos adicionales en el mismo lóbulo del tumor primario (28%), que los T4 por diseminación pleural que tienen un pronóstico claramente peor (11% de

supervivencia a los 5 años). Se aconsejó, por tanto, para la nueva clasificación, considerar T3 a los tumores con nódulo/s adicional/es en el mismo lóbulo del tumor primario, considerar T4 a los tumores con nódulo/os adicional/es en un lóbulo homolateral diferente al del tumor primario, e incluir en la categoría M a los tumores con diseminación pleural (tabla 1).

Componente N

En el componente N que refiere a la afectación de ganglios linfáticos regionales, en el cual se confirmó la disminución de la supervivencia a medida que aumentaba la afectación ganglionar, encontrando diferencias significativas en la supervivencia a los 5 años, sin embargo, estos hallazgos no pudieron ser validados por áreas geográficas ni categorías T, por lo que no se recomendaron cambios relativos al componente N para la nueva clasificación (47).

Componente M

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

Tabla 1. Sistema Internacional de Estadificación TNM-estadios

Cuadro 1. Clasificación TNM, 7a edición.⁹⁵

<p>T: tumor primario. TX: el tumor no puede ser evaluado o células tumorales en citología de esputo o lavados bronquiales, pero el tumor no puede ser visualizado. T0: sin evidencia de tumor primario. Tis: carcinoma <i>in situ</i>.</p>			
<p>T1: tumor de 3 cm o menor, rodeado por pulmón o pleura visceral, sin invasión más proximal que un bronquio lobar: <ul style="list-style-type: none"> • T1a: tumor de 2 cm o menor. • T1b: tumor > 2 cm, pero no > 3 cm. </p>			
<p>T2: tumor > 3 cm, pero no > 7 cm, o un tumor con cualquiera de las siguientes características: <ul style="list-style-type: none"> • Involucro del bronquio principal, a más de 2 cm de la carina. • Invasión de la pleura visceral. • Se asocia a atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hilar, pero no involucra a todo el pulmón. <p style="margin-left: 20px;">T2a: tumor > 3 cm, pero no > 5 cm. T2b: tumor > 5 cm, pero no > 7 cm.</p> </p>			
<p>T3: tumor > 7 cm o con cualquiera de las siguientes características: <ul style="list-style-type: none"> • Invasión directa a pared torácica (incluye tumores del sulcus superior, diafragma, nervio frénico, pleura mediastinal, pericardio parietal). • Tumor en el bronquio principal a menos de 2 cm de la carina, pero sin involucro de la misma. • Atelectasia o neumonitis obstructiva de todo el pulmón. • Nódulos satélites en el mismo lóbulo que el tumor primario. </p>			
<p>T4: tumor de cualquier tamaño que invade cualquiera de las siguientes estructuras: mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio recurrente laríngeo, esófago, cuerpos vertebrales, carina. O bien, la presencia de nódulos satélites en un lóbulo diferente al del tumor primario (ipsilateral).</p>			
<p>N: ganglios regionales. NX: no se pueden evaluar los ganglios regionales. N0: sin metástasis a ganglios regionales. N1: metástasis en ganglios peribronquiales y/o hilares ipsilaterales (incluyendo extensión directa del tumor). N2: metástasis en ganglios mediastinales ipsilaterales y/o subcarinales. N3: metástasis a ganglios supraclaviculares y/o metástasis en ganglios contralaterales (mediastinales y/o hilares).</p>			
<p>M: metástasis a distancia. MX: las metástasis no pueden ser evaluadas. M0: sin metástasis a distancia. M1a: nódulos contralaterales al tumor primario; implantes pleurales o derrame pleural o pericárdico (citología positiva). M1b: metástasis fuera del tórax.</p>			
<p>Etapas clínicas:</p>			
EC 0 Tis	N0	M0	
EC IA T1	N0	M0	
EC IB T2a	N0	M0	
EC IIA	T2b	N0	M0
	T1 o T2a	N1	M0
EC IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
EC IIIA	T4	N0	M0
	T3 o T4	N1	M0
	T1, T2 o T3	N2	M0
EC IIIB	T4	N2	M0
	Cualquier T	N3	M0
EC IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a
EC IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1b

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

1.2.8. Inmunología del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es uno de los tipos de cáncer más agresivo y letal. Esto puede deberse a que el tumor evade la respuesta inmune favoreciendo su rápido crecimiento. En el cáncer pulmonar de células no pequeñas se han identificado poblaciones celulares inmunes que participan en el microambiente tumoral y son de gran importancia para el cuadro clínico de los pacientes. Dichas subpoblaciones suelen estar presentes en niveles variables respecto al estadio de la enfermedad y al subtipo histopatológico.

Si bien la participación de poblaciones inmunes no está bien definida en el cáncer de pulmón, las evidencias indican que tienen un papel importante y han sido sugeridas para ser empleadas como biomarcadores pronósticos de invasividad, sobrevida y respuesta al tratamiento, entre otros (46,48,49). Se ha descrito con anterioridad la presencia e influencia que ejercen en el microambiente tumoral las poblaciones de macrófagos asociados al tumor (TAMs por sus siglas en inglés), células dendríticas inmaduras, neutrófilos asociados al tumor, linfocitos T reguladores que infiltran tumores, células supresoras de origen mieloide, entre otros. En diversos estudios estas células se asocian generalmente a un peor estado de la enfermedad y un pronóstico pobre para el paciente (32, 50, 51).

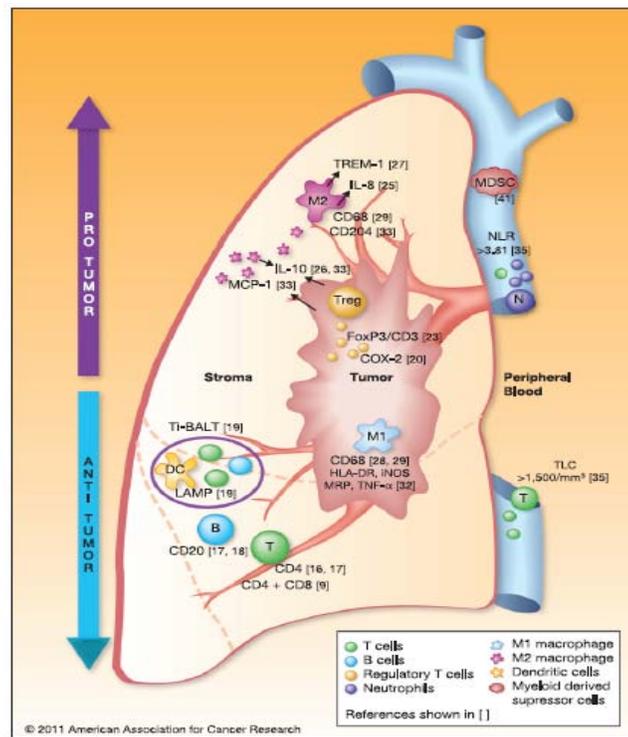


Figura 7. Eventos inmunes en Cáncer de Pulmón de Células no Pequeñas Células B y T en

compañía de células dendríticas y otras poblaciones efectoras se asocian a mejores niveles de supervivencia. De manera opuesta, linfocitos Tregs, poblaciones mieloides asociadas al tumor, Células Supresoras de Origen Mieloide y poblaciones inmunes maduras direccionadas a un perfil de tipo 2 promueven bajos niveles de supervivencia. (Imagen de Finn, O.J., N Engl. J. Med. Cancer Immunology, 2008).

Por otra parte, la participación predominante de poblaciones efectoras, como las células NK, linfocitos y células mieloides maduras con fenotipos tumoricidas pueden asociarse a mejor respuesta y pronóstico (52) (Figura 7).

No se ha logrado establecer por completo que niveles de linfocitos T en el microambiente tumoral corresponden a un mejor pronóstico, ya que observaciones aisladas han sugerido la participación de éstos para promover el crecimiento tumoral (53, 54). Sin embargo, se han asociado niveles elevados de linfocitos a un mejor pronóstico.

Las poblaciones linfocitarias y otras poblaciones con capacidades tumorales se encuentran inactivadas para una destrucción potencial de células cancerosas (55), además estas células son vulnerables a los efectos adversos propios del desarrollo tumoral como la hipoxia, la manipulación de factores solubles y a la supresión que establecen poblaciones supresoras, entre otros.

1.3. Células mieloides: Origen y desarrollo

Las células mieloides representan las células hematopoyéticas más abundantes en el cuerpo humano con gran variedad de funciones y fenotipos. Estas células vigilan en todo momento el correcto funcionamiento del sistema inmune innato y adaptativo, participan en la remodelación tisular y eliminan a las células muertas. Todas las células mieloides se derivan de las células madre hematopoyéticas multipotenciales (HSC) y a través de pasos secuenciales de diferenciación se convierten en células mieloides maduras. Sin embargo, los progenitores mieloides no forman un sistema jerárquico único, sino que son consideradas como una red de células que pueden diferenciarse en varios subconjuntos de células mieloides más especializadas (10) (Figura 8). Los tres grupos de células mieloides diferenciadas: granulocitos, células dendríticas y macrófagos juegan un papel crucial en el manejo de agentes patógenos que ingresan a nuestro cuerpo.

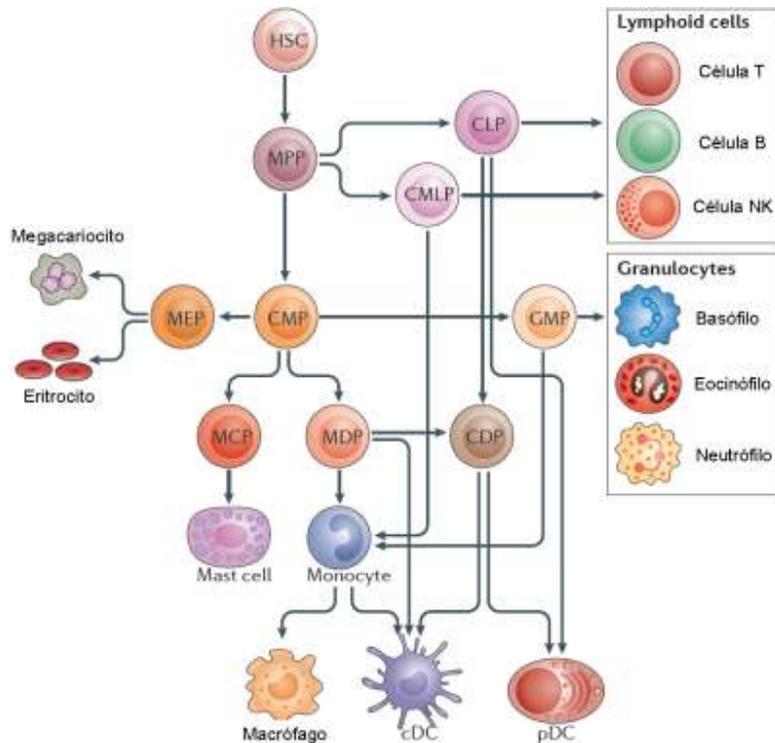


Figura 8. Diferenciación de poblaciones del sistema inmune bajo condiciones normales.

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

Las células dendríticas (DCs por sus siglas en inglés) son células mieloides diferenciadas que se especializan en el procesamiento y presentación de antígenos. Éstas se diferencian en la médula ósea a partir de diversos progenitores, en humanos los monocitos son los precursores más importantes de las DCs. Existen dos subgrupos principales de células dendríticas: las DCs convencionales y las DCs plasmocitoides (pDCs) (56). Aunque éstas células comparten algunos de sus progenitores comunes, su

diferenciación está controlada por distintos programas genéticos y tienen diferente función, morfología y marcadores. Cuando las DCs se encuentran funcionalmente activas, pueden estimular efectivamente la respuesta inmune, debido a que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados al daño (DAMPs). Éstas se activan y responden a estímulos asociados con bacterias, virus o tejidos dañados. La activación de las DCs da lugar a profundos cambios en su expresión génica, lo que resulta en una mayor expresión de moléculas co-estimuladoras y citocinas que promueven la activación de las células T así como en la sobre-regulación de los receptores de quimiocinas que impulsan la migración de las DCs a los tejidos linfoides (56). Por otra parte las pDCs constituyen una población menor de DCs, tienen una morfología similar a la de las células plasmáticas y produce grandes cantidades de interferón gamma (IFN- γ) en respuesta a la activación de sus receptores de tipo T por ácidos nucleicos virales o ADN (57).

Los macrófagos pertenecen a un grupo de células mieloides diferenciadas que se comunican constantemente con una gran variedad de células inmunes y no inmunes, y su correcto funcionamiento representa una pieza clave en el establecimiento de una respuesta inmune efectiva. La población de macrófagos incluye una amplia gama de células, marcadores y funciones que son reflejo de su microambiente tisular. Su función en individuos sanos es eliminar los agentes infecciosos, promover la cicatrización de heridas y regular la inmunidad adaptativa. Se han descrito dos tipos funcionales de macrófagos, los activados clásicamente (M1) que se activan por IFN- γ , productos bacterianos y expresan bajos niveles de IL-10 y altos de IL-12, considerándolos tumorocidas (58). Por otra parte, los macrófagos activados por la vía alterna (M2) estimulados por las citocinas IL-4, IL-10, IL-13 y hormonas glucocorticoides, expresan altos niveles de IL-10 y bajos de IL-12; relacionándose en gran medida a la inflamación y progresión tumoral (59).

1.3.1. Regulación de las células mieloides durante el desarrollo del tumor

Las células mieloides en la patogénesis del cáncer han sido reconocidas durante las últimas dos décadas y se ha demostrado su papel crucial en la promoción, angiogénesis tumoral, metástasis, invasión celular y alteración de la respuesta inmune (60-62). Distintos estudios indican que el microambiente tumoral altera a diversas poblaciones de células mieloides y puede convertirlas en potentes células inmunosupresoras (10). Las células

mieloides están íntimamente relacionadas y funcionan como un sistema único y complejo el cual interactúa con el entorno y responde a estímulos tanto en condiciones fisiológicas como patológicas por ejemplo, la manipulación a la que se someten durante el desarrollo tumoral (Figura 9).

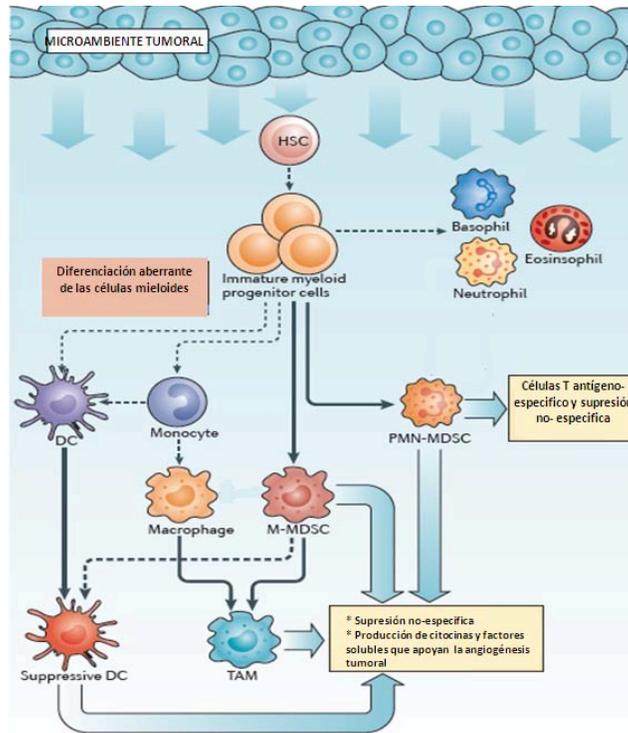


Figura 9. Cambios que ocurren en las células mieloides en cáncer. Los factores producidos en el microambiente tumoral por células tumorales y células del estroma promueven la diferenciación aberrante de las células del linaje mieloides. Las líneas punteadas muestran las vías normales de diferenciación que siguen las células mieloides a partir de un precursor mieloides inmaduro. Las líneas continuas indican las vías de diferenciación aberrantes que siguen las células mieloides durante el cáncer en las cuales el microambiente tumoral puede promover el desarrollo de poblaciones inmunosupresoras, incluidas las células supresoras de origen mieloides monocíticas M-MDSCs, células supresoras de origen mieloides polimorfonucleares PMN-MDSCs, células dendríticas supresoras DCs y macrófagos asociados a tumores TAMs. Las líneas punteadas claras ilustran vías de diferenciación sugeridas pero aun no confirmadas. (Imagen de Gabrilovich.D. , Nat. Rev. Immunol, 2012)

1.3.2. Células Dendríticas en el desarrollo del cáncer

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

Los resultados de una diferenciación anormal en estas células suelen ser la disminución en la producción de las DCs maduras funcionalmente competentes, aumento en la acumulación de DCs inmaduras en el sitio del tumor y un aumento en la producción de las células mieloides inmaduras (63). Se ha observado una presencia menor y función deficiente de las DCs maduras en pacientes con cáncer de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas, de páncreas, cervico-uterino, hepático, prostático y glioma (64-66).

Además, se han asociado diversos factores solubles derivados del tumor en la diferenciación anormal de las DCs, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF por sus siglas en ingles), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, por sus siglas en ingles) y la interleucina-6 (IL-6) entre otros, que dentro del microambiente tumoral limitan el funcionamiento normal de las DCs (51). Así mismo, algunas DCs en huéspedes portadores del tumor suprimen la función de las células T fenotípicamente inmaduras y maduras (67). Distintos estudios indican que poblaciones inmaduras de DCs que sufren alteraciones en su programa de diferenciación y que se encuentran condicionadas por el microambiente, pueden promover una tolerancia inmunológica.

De manera relevante, se ha descrito que las DCs infiltradas en tumores de próstata alteran las funciones de las células T CD8+ intratumorales, utilizando mecanismos inmunosupresores como la sobre-expresión de arginasa-1 (ARG1), atribuidos anteriormente sólo a células supresoras como los TAMs y MDSCs, (68). Esta clase de evidencias sugieren que los programas de inmunosupresión pueden ser compartidos por diferentes células mieloides en el cáncer.

1.3.3. Macrófagos en la promoción tumoral

Se ha descrito que los macrófagos se organizan durante el cáncer para facilitar el crecimiento tumoral. Los macrófagos M1 son anti-tumorales y promueven el rechazo del

tumor, mientras que los macrófagos M2 facilitan la progresión tumoral. Muchos tumores sólidos que crecen progresivamente contienen TAMs, que promueven la progresión del tumor a través de una variedad de mecanismos y tienen el fenotipo de los macrófagos M2 (69) Su presencia se asocia con un peor pronóstico clínico (70), y recientemente se demostró que los TAMs con genes específicos, se asocian al fracaso del tratamiento primario en pacientes con linfoma de Hodgkin (71).

Estas poblaciones mieloides son similares a los macrófagos M2 y median sus efectos a través de mecanismos inmunes y no inmunes. Los mecanismos no inmunes incluyen la promoción de la angiogénesis, facilitan la invasión de células tumorales, favorecen la metástasis y la protección de células tumorales a la quimioterapia inducida por apoptosis (72). Los mecanismos inmunes propios de un macrófago M1 resultan afectados por la actividad de TAMs ya que éstos eliminan a los primeros mediante el bloqueo de su activación. Acorde a esto, se ha observado que los TAMs son ineficientes como células presentadoras de antígeno y que producen quimiocinas como el ligando CC-22 (CCL22), que atraen a las células Treguladoras inhibiendo la activación de las células T(72). De manera similar a lo que sucede con las DCs inmaduras y las MDSCs, los TAMs tienen la capacidad de sobre expresar ARG1(73) y más que cualquier célula mieloides, privan a las células T de L-arginina necesaria para su proliferación y correcto funcionamiento. El microambiente presente en los diversos tumores humanos contienen TAMs que varían en fenotipo y función. Se han identificado diversos subconjuntos de TAMs en carcinomas, los cuales, tienen diferentes vidas medias y frecuencias relativas que varían a medida que el microambiente tumoral evoluciona (74).

Es importante señalar que todos los subconjuntos de TAMs al igual que las DCs y granulocitos supresores que se encuentran estrechamente relacionados con el tumor, comparten mecanismos biológicos que son producto del constante direccionamiento que ejerce el tumor mediante la liberación de factores solubles.

1.3.4. Granulocitos en la progresión del Cáncer

Recientemente, las evidencias vinculan a los granulocitos, en particular a los neutrófilos, con procesos que promueven el desarrollo tumoral mediante la angiogénesis, supresión de la respuesta inmune, metástasis e invasión (50, 62, 75). Las células tumorales y asociadas al estroma celular atraen fuertemente a neutrófilos maduros e inmaduros mediante la expresión de quimiocinas tipo CXC y procinetina 2.

En el cáncer pulmonar el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, por sus siglas en inglés) producido en exceso por el tumor también recluta granulocitos pre-metastáticos hacia nichos particulares, en donde promueven la iniciación de la metástasis subsecuente (50).

Es probable que los granulocitos promuevan la angiogénesis mediante la expresión de metaloproteína 9 de matriz (MMP9) que induce la sobreexpresión del factor VEGF en tejidos neoplásicos (76). Adicionalmente, algunos granulocitos reclutados al tumor liberan elastasa, que penetra en el compartimento endosomal de las células neoplásicas y degrada el sustrato del receptor de insulina 1 (IRS1). Esta degradación facilita la interacción entre fosfoinositol cinasa-3 (PI3K) y el receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), promoviendo así la proliferación de células tumorales (77). Como sucede en otras poblaciones mieloides los neutrófilos pueden presentar un fenotipo antitumoral tipo (N1) ó un fenotipo pro-tumoral (N2). En el microambiente tumoral se ha observado un direccionamiento y reversión hacia el fenotipo N2. El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , por sus siglas en inglés), impulsa el fenotipo N2, y su bloqueo promueve un fenotipo N1 con actividad antitumoral (78).

1.3.5. Impacto de los mecanismos tumorales sobre las células mieloides

Las células neoplásicas y las células del estroma asociadas al tumor liberan múltiples factores solubles que perturban a las diversas poblaciones de células mieloides. Las citocinas tales como el factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), granulocitos G-CSF y macrófagos M-CSF, el factor de células madre (SCF, también conocido como ligando KIT), el VEGF e IL-3 promueven la mielopoyesis y contribuyen en parte, a un bloqueo en la maduración de estas células (79) (Figura 10). Así mismo, los factores solubles pro-inflamatorios derivados del tumor como la IL-1 β , IL-6, S100A8 y S100A9, así como citocinas liberadas por las células T activadas como el IFN- γ , IL-4, IL-10 y IL-13 (80, 81), inician vías inmunosupresoras que comprometen a las células mieloides inmaduras a convertirse en MDSCs y a promover aún más la diferenciación de las MDSC hacia DCs y macrófagos inmunosupresores.

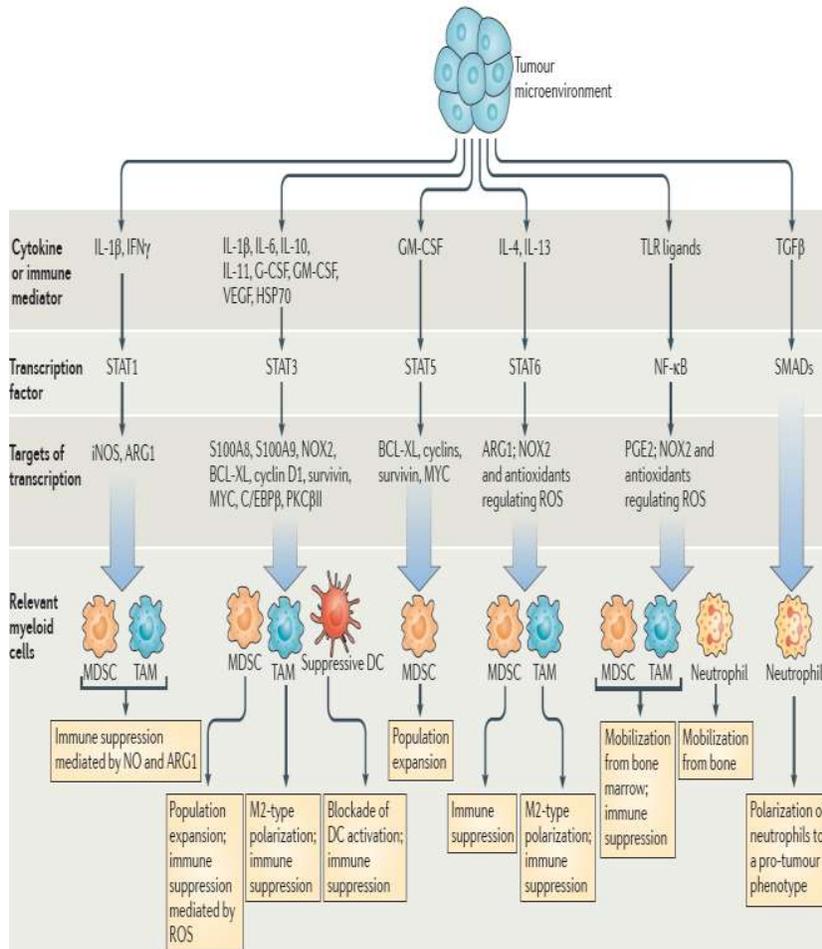


Figura 10. Mecanismos moleculares de células mieloides afectados en cáncer. En el microambiente tumoral se secretan diferentes citocinas y mediadores inmunes que regulan la actividad de múltiples factores de transcripción que afectan tanto a precursores mieloides como a células mieloides maduras. Estos factores de transcripción, a su vez, regulan la síntesis de sus proteínas blanco afectando así funciones de las células mieloides. ARG1, arginasa 1; BCL-XL, linfoma XL de células B; C/EBP β , proteína de unión al enhancer CCAAT; DC, célula dendrítica; G-CSF, factor estimulador de colonias de granulocitos; GM-CSF, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos. INF γ , interferon- γ entre otros.

En ese sentido, el TGF- β derivado del tumor regula la acumulación de MDSC y promueve la polarización hacia neutrófilos supresores. De manera similar, la liberación al torrente sanguíneo de exosomas que contienen péptidos señal, mRNAs, microARNs y lípidos por parte de células neoplásicas y células del estroma asociadas al tumor, promueve la expansión de MDSCs.

Los factores solubles derivados del tumor regulan linajes mieloides en múltiples niveles a

través de una variedad de factores de transcripción como el transductor de señales activadoras de la transcripción 3 (STAT3, por sus siglas en inglés) que desempeña un papel importante en la regulación de las DCs, induciendo la expansión de la población de MDSCs así como alteraciones en los macrófagos (82-84). Este factor transcripcional no sólo previene la apoptosis y promueve la proliferación celular mediante la sobre-regulación de factores anti-apoptóticos y pro-proliferativos como (Bcl-XL), MYC, ciclina D1 y survivin (85), sino que también regula la expresión de múltiples proteínas que son cruciales para la diferenciación de células mieloides. Adicionalmente, el incremento de las proteínas pro- inflamatorias de unión a calcio S100A8 y S100A9 regulan positivamente a STAT3, lo que induce la activación de vías que afectan la diferenciación de DCs y promueven la acumulación de MDSC (86).

El factor de transcripción STAT1 inducido por la actividad de IFN- γ regula en las células mieloides la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS, por sus siglas en inglés) que es crucial para los procesos inmunosupresores ejercidos por TAMs y MDSCs (87, 88). Adicionalmente el factor STAT6 inducido por IL-4 controla la polarización de TAMs mediante la unión al promotor del gen que codifica a la proteína 3 con dominio desmetilasa (JMJD3, por sus siglas en inglés) lo que da lugar a la desmetilación de la lisina 27 de la histona H3 en un loci genético específico que origina el aumento de la expresión de ARG1, YM1 y FIZZ1 promoviendo así, la polarización hacia M2 (85).

La familia receptores de linfocitos T (TLR, por sus siglas en inglés) también tiene un papel destacado en el desarrollo de células mieloides, principalmente a través de la activación de la diferenciación mioide de la proteína 88 de respuesta primaria (MyD88) y la inducción río abajo del factor nuclear- κ B (NF- κ B). Esta vía de señalización es crucial para el reclutamiento de células mieloides a sitios de infección, lesión o crecimiento del tumor. Acorde con estos hallazgos los mediadores pro-inflamatorios COX2 y prostaglandina E2 (PGE2, por sus siglas en inglés), que inducen la acumulación y actividad supresora de MDSC también son blancos potenciales para la acción del NF- κ B. Como se mencionó, el microambiente puede condicionar a las células mieloides para convertirse en poblaciones inmunosupresoras. En la actualidad este fenómeno se estudia ampliamente por distintos grupos, destacando de manera importante el efecto de la acumulación excesiva de células mieloides inmaduras. Estas poblaciones celulares con capacidad para suprimir la respuesta antitumoral fueron etiquetadas como MDSCs porque comparten el origen mioide y las propiedades inmunorreguladoras (14, 89, 90).

1.4. Células supresoras de origen mieloide (MDSCs)

Las células supresoras de origen mieloide constituyen una población mieloide heterogénea (granulocitos, células dendríticas y macrófagos) en un estado inmaduro con capacidad de suprimir la respuesta inmune del hospedero (11). Las MDSCs pueden considerarse un elemento basal de regulación inmune natural, ya que pueden evitar el daño e inflamación que causarían poblaciones citotóxicas, después de haber eliminado al agente extraño. En este contexto las células mieloides inmaduras con fenotipo de MDSCs que se generaron en la médula ósea de individuos sanos, se diferencian en células mieloides maduras. Los factores solubles como el GM-CSF, SCF y diversas citocinas favorecen el origen de células mieloides maduras capaces de establecer una respuesta inmune efectiva. Sin embargo, durante estados patológicos, traumas, inflamación, trasplantes y otras condiciones de estrés, estas células supresoras se expanden en medula y viajan al torrente sin haber madurado correctamente. Como resultado de esta liberación, las MDSCs se acumulan en órganos linfoides periféricos en donde pueden expandirse y migrar a sitios blanco y torrente sanguíneo. Los efectos supresores de esta población se pueden ejercer así, sobre la respuesta inmune innata y adaptativa (11).

1.4.1. Contexto histórico

Las células supresoras de origen mieloide fueron descritas hace más de 20 años en pacientes con cáncer, pero su importancia funcional en el sistema inmune ha sido apreciada sólo recientemente (91). Debido a lo heterogéneo de estas poblaciones fueron denominadas como: células supresoras naturales, células mieloides inmaduras, progenitores mieloides inmaduros o células supresoras mieloides entre otros. Dado que ninguna de estas nomenclaturas abarca completamente las características de este tipo de células, la propuesta hecha por el Dr. Gajthya y sus colaboradores, designa el nombre de “Células supresoras de origen mieloide” (92). Esta nomenclatura transmite mejor las propiedades de este tipo celular porque indica que pertenecen al linaje mieloide, implica la heterogeneidad del fenotipo y la plasticidad funcional, además de que describe la naturaleza inmunosupresora de estas células.

Además, permite distinguir a esta población de otras con características

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

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

1.4.2. Origen de las MDSCs

Como se mencionó anteriormente, las células supresoras de origen mieloides que se expanden y se acumulan en condiciones patológicas, no son una población bien definida de células mieloides, sino una población heterogénea de células mieloides diferencialmente inmaduras. Estas células mieloides pueden ser parte del proceso normal de mielopoyesis, el cual tiene lugar en la médula ósea y es controlado por una red compleja de factores solubles que incluye a GM-CSF, SCF, IL-3 y Receptor 3 con actividad de tirosina cinasa semejante a Fms (FLT3, por sus siglas en inglés: Fms-like tyrosine kinase 3 receptor) (11).

Las células madre hematopoyéticas se diferencian en células progenitoras mieloides comunes y luego en células mieloides inmaduras. Normalmente las células mieloides inmaduras migran a órganos periféricos, donde se diferencian en macrófagos, células dendríticas o granulocitos. Sin embargo, los factores que son producidos durante infecciones agudas o crónicas, trauma o sépsis y en el microambiente tumoral, promueven la acumulación de las células mieloides inmaduras en estos sitios, impidiendo su diferenciación e induciendo su activación. Estas células presentan funciones inmunosupresoras y por lo tanto son nombradas células supresoras de origen mieloides. Las MDSCs se acumulan también en órganos linfoides periféricos en respuesta a factores de origen tumoral. Además, estas células pueden también diferenciarse en TAMs dentro de un microambiente tumoral, en el cual el fenotipo y función de TAMs es distinto de aquel expresado por las MDSCs (11) (Figura 11).

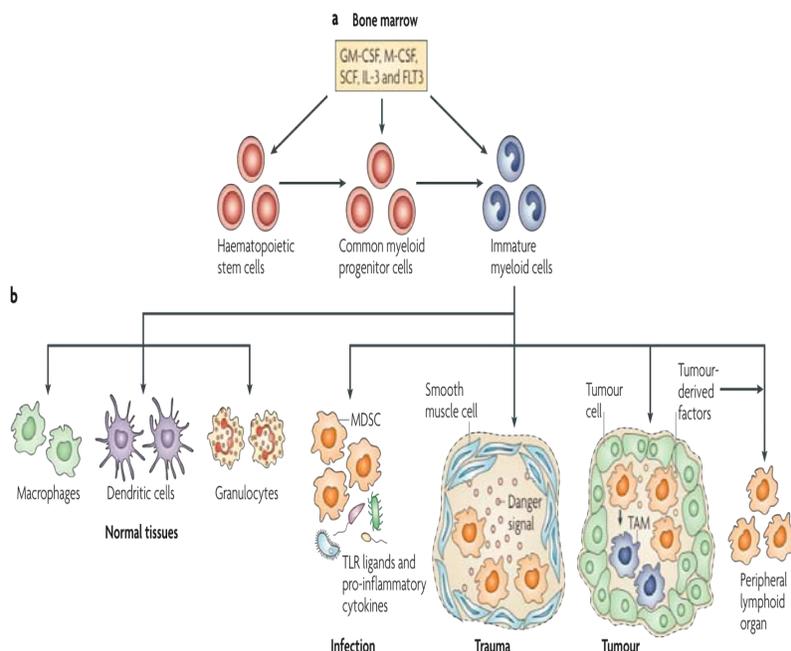


Figura 11. El origen de MDSCs. A partir de un progenitor mielode común las células mieloides pueden dar origen a células mieloides maduras o a MDSCs. (Imagen de Gabilovich.D. Nat. Rev. Immunol. 2009)

1.4.3. Subgrupos de MDSCs.

Dado que las células supresoras de origen mielode carecen de la expresión de marcadores de superficie celular específicos y comparten algunos que son expresados por monocitos, macrófagos, células dendríticas y granulocitos, éstas han sido estudiadas con diversos fenotipos (Figura 12). En ratones, las células supresoras de origen mielode están caracterizadas por la co-expresión del antígeno de diferenciación de linaje celular mielode GR1 y CD11b (también conocido como α M-integrina), lo que permite un fácil análisis y aislamiento para su estudio (11, 93). Normalmente la médula ósea de ratón contiene un 20-30% de células con este fenotipo, pero estas células son sólo una pequeña proporción (2.4%) de las células del bazo y están ausentes en los ganglios linfáticos.

En humanos las MDSCs han sido caracterizadas de diversas formas. Éstas suelen ser identificadas como células CD14-CD11b+ y frecuentemente como células que expresan el marcador común de células mieloides CD33, que carecen de la expresión de marcadores de células maduras, y de moléculas de MHC clase II, HLA-DR. Además, en diversos

estudios estas células han sido identificadas dentro de una población granulocítica en sangre periférica(87, 89, 94).

El uso de los anticuerpos monoclonales antes mencionados llevó a la identificación de dos subclases de células supresoras de origen mieloide: las MDSCs granulocíticas que tienen un fenotipo CD11b+LY6G+LY6Clow y aquellas con morfología monocítica con un fenotipo CD11b+LY6G-LY6Chi para células de ratón (95). Posteriormente, en humanos también se estableció la expansión de ambas subclases que involucran diversos fenotipos debido a la limitante mencionada sobre la falta de marcadores específicos (87).

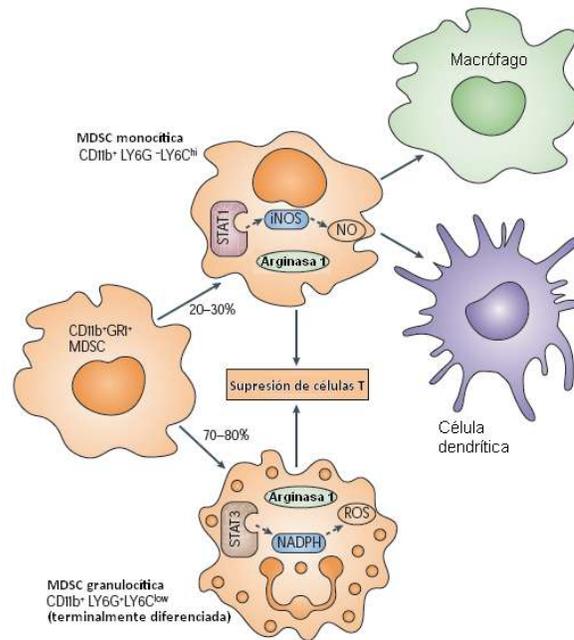


Figura 12. Mecanismos supresores mediados por los diferentes subgrupos de MDSCs. Las MDSCs en el ratón se diferencian en dos principales subgrupos: Las MDSCs monocíticas, las cuales tienen un fenotipo CD11b+LY6G-LY6Chi; y las MDSCs granulocíticas con fenotipo CD11b+LY6G+LY6Clow. En la mayoría de los modelos tumorales predomina el linaje granulocítico (70-80%). Se ha sugerido que el subgrupo granulocítico tiene una actividad incrementada de STAT3 y NADPH, lo que resulta en niveles elevados de ROS y niveles bajos de óxido nítrico. ROS y peroxinitritos [el producto químico de la reacción entre el óxido nítrico (NO) y anión superóxido (O₂⁻)], inducen la modificación post-traduccional del receptor de las células T, ocasionando una falta de respuesta en este tipo celular. El linaje monocítico, tiene una expresión sobre-regulada de STAT1 y de la enzima óxido nítrico inducida (iNOS o NOS2) y niveles incrementados de NO pero producción baja de ROS. El óxido nítrico que es producido por el metabolismo de la L-arginina por iNOS, suprime la función de las células T a través de varios mecanismos, que involucran la inhibición de cinasas Janus-3 (JAK-3, por sus siglas en inglés) y STAT-5, la inhibición en la

expresión del MHC clase II y la inducción de apoptosis. Ambos subgrupos tienen niveles incrementados de arginasa 1, la cual causa la supresión de las células T a través de la depleción de la L-arginina. Solo el linaje monocítico, puede diferenciarse *in vitro* en células dendríticas maduras y macrófagos. (Imagen de Gabrilovich.D. Nat. Rev. Immunol. 2009)

Se ha sugerido que la fracción monocítica de las MDSCs ejerce un mayor efecto inmunosupresor con respecto a la fracción granulocítica, sin embargo, en la mayoría de los casos la expansión de estas últimas es superior que las de subclase monocítica. Además, las MDSCs polimorfonucleares representan un importante subconjunto por su participación en otros procesos del desarrollo tumoral como la angiogenesis y la metástasis (11).

1.4.4. Expansión y activación de MDSCs

Para que se lleve a cabo la actividad supresora de las MDSCs, éstas requieren de factores que simultáneamente promuevan su expansión y activación. La expresión de estos factores son producidos principalmente por patógenos, células tumorales y células T. Mediante una compleja vía de señalización en la que intervienen diversos factores como IL-6, GM-CSF, IL-10, M-CSF, G-CSF y VEGF se desencadenan diferentes vías de señalización en las MDSCs que involucran principalmente, a la familia de moléculas activadoras de la transcripción y transductores de señales (STATs) (11) (Figura 13). La activación de STAT-6, STAT-1 y del factor NF- κ B mediada por receptores tipo Toll, resulta en la activación de las MDSCs, lo que lleva a estas células a sobre regular las enzimas arginasa 1 y sintasa de óxido nítrico, (enzimas que otorgan diversos mecanismos inmunosupresores a estas poblaciones).

Recientes hallazgos indican que la vía corriente abajo de STAT3 también pueden regular la expansión de MDSC mediante la expresión de las proteínas S100A8 y S100A9, las cuales son miembros de la familia de proteínas de unión a calcio S100 que se libera en respuesta al daño celular, la infección o la inflamación, y están involucradas específicamente en la acumulación y la función de MDSCs granulocítica (11). Así mismo, estas proteínas están involucradas en la producción de ROS en MDSCs.

Aunque las proteínas S100A8 y S100A9 inducen su efecto sobre las MDSCs a través de la activación de la vía del factor nuclear κ B, este mecanismo todavía no se entiende

completamente, pero parece tener un papel importante en regular la expansión de MDSC y puede proporcionar un enlace interesante entre la supresión inmune y la progresión del cáncer (11, 69).

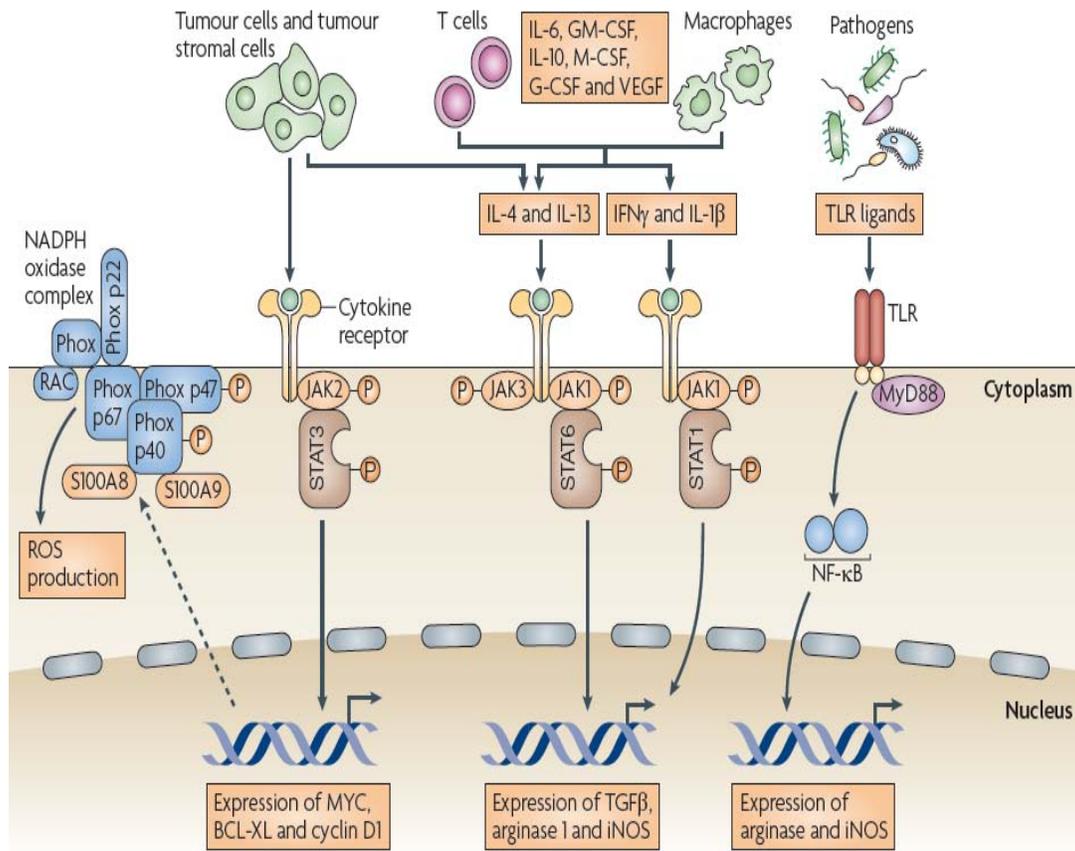


Figura 13. Vías de señalización involucradas en la expansión de las MDSCs. La acumulación de las MDSCs está regulada por varios factores que son liberados por células tumorales, células del estroma, células T activadas y macrófagos, células tumorales apoptóticas, agentes virales y bacterianos y células infectadas por patógenos. Estos factores (IL-6, GM-CSF, IL-10, M-CSF, G-CSF y VEGF) desencadenan diferentes vías de señalización en las MDSCs que involucran, principalmente, a la familia de moléculas activadoras de la transcripción y transductores de señales (STATs, por sus siglas en inglés). STAT 3, regula la expansión de las MDSCs, estimulando la mielopoyesis e inhibiendo la diferenciación de células mieloides y promoviendo la supervivencia de las MDSCs a través de factores transcripcionales como MYC (factor transcripcional que es codificado por el protooncogen Myc) y proteínas que inhiben la apoptosis, como la proteína XL del linfoma de células B (BCL-XL, por sus siglas en inglés) y ciclina D. STAT-3, contribuye también en el incremento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en las MDSCs. La activación de STAT-6

y STAT-1, así como de la activación del factor nuclear-kb (NF-kb) mediada por receptores tipo Toll, resulta en la activación de las MDSCs, lo que lleva a estas células a la sobre-regulación de las enzimas arginasa 1 y óxido nítrico sintasa inducida (iNOS o NOS2), así como al incremento en la producción de citocinas supresoras como el factor de crecimiento transformante-b (TGF-b). Las proteínas de unión al calcio S100 (S100A8 y S100A9) se unen directamente a componentes del complejo NADPH. Esta unión potencia la activación del complejo oxidasa NADPH en las MDSCs, lo que causa un incremento en la producción ROS, y por ende de la actividad supresora observada. Abreviaturas en inglés: G-CSF, granulocyte colony- stimulating factor (factor estimulante de colonias de granulocitos); GM-CSF, granulocyte/Macrophages CSF (Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos); IFN- γ , (interferón gamma); IL, interleukin (interleucina); JAK, Janus kinase (quinasas Janus); MyD88, myeloid differentiation primary-response gen 88 (gen de respuesta primaria para diferenciación mieloide que codifica para una molécula adaptadora del receptor tipo Toll); Phox, (phagocyte oxidase); VEGF, vascular endothelial growth factor (factor de crecimiento endotelial vascular). (Imagen de Gabrilovich.D. Nat. Rev. Immunol. 2009)

1.4.5. Regulación de las MDSC en el cáncer

El impacto de las MDSCs en el cáncer podría ser descrito como un efecto de dos etapas, la primera es una mielopoyesis anormal y el reclutamiento de MDSCs al tejido tumoral y la segunda es la producción de citocinas que activan a las MDSC y las interacciones célula-célula en el microambiente tumoral para la adicional progresión del cáncer (96)

La etapa del reclutamiento está estrechamente regulada por varias moléculas solubles, así como por la sobre-regulación de STAT3 y de otras vías de señalización. En una actualización más reciente en este tema, se encontró que la vía de señalización del TNF- α impulsa la acumulación de MDSC en el tejido tumoral para evadir la respuesta inmune en un modelo murino portador del tumor.

Así mismo diferentes citosinas se han involucrado en el reclutamiento de MDSC, incluyendo VEGF y CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). De hecho, elevados niveles séricos de VEGF están directamente correlacionados con el número de MDSC en sangre y en bazo, y se han asociado a un peor pronóstico en pacientes con cáncer (96).

Además del reclutamiento en el microambiente tumoral y el promover la evasión inmune también se ha demostrado que las MDSC tienen un papel importante en la metástasis y en la angiogénesis (96).

Mientras que en individuos sanos los niveles de MDSCs permanecen en niveles casi

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

La inclusión de estas poblaciones en estudios clínicos que se ha incrementado en las últimas dos décadas comienza a reflejar su importancia en el manejo de cánceres humanos. Las MDSCs con el fenotipo LIN⁻HLA-DR⁻CD33⁺CD11b⁺ se ha aislado de la sangre de pacientes con glioblastoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón o cáncer de riñón (128) (Tabla 2). La frecuencia de esta población de células inmaduras puede reflejar la carga tumoral y su alta frecuencia se correlaciona con un mal pronóstico y la progresión radiográfica en pacientes con cáncer colorrectal (129).

Las células monocíticas CD14⁺CD11b⁺HLA-DR^{low/-}, circulan en la sangre de los pacientes con melanoma, mieloma múltiple, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular o el cáncer de cabeza y cuello. De igual forma, los pacientes con cáncer renal se ven afectados por MDSCs polimorfonucleares CD11b⁺CD14⁻CD15⁺CD66b⁺VEGFR⁺ (89). Estos y otros fenotipos han sido empleados para la caracterización de poblaciones mieloides supresoras en cáncer.

Tabla 2. Fenotipos de MDSCs en cáncer

<i>MDSC subset</i>	<i>Phenotype</i>	<i>Cancer type</i>	<i>Source</i>
<i>Unclassified</i>	LIN ⁻ HLA-DR ⁻ CD33 ⁺ CD11b ⁺	Breast Colon Lung Renal Pancreatic Oesophageal Gastric	Peripheral blood
	CD14 ⁺ /arginase ⁺ CD11b ⁺ CD14 ⁻ CD15 ⁻	Multiple myeloma Melanoma	Peripheral blood and tumour tissue
<i>Granulocytic</i>	C11b ⁺ CD14 ⁻ CD15 ⁺ CD66b ⁺ VEGFR1 ⁺ CD15 ⁺ IL-4R ⁺ CD124	Renal Colon Melanoma	Peripheral blood Peripheral blood
	CD11b ⁺ CD14 ⁻ CD15 ⁺ CD33 ⁺ CD11b ⁺ CD14 ⁻ CD15 ^{int}	Lung Melanoma	Peripheral blood Peripheral blood and tumour tissue
<i>Monocytic</i>	CD14 ⁺ CD11b ⁺ HLA-DR ^{low/-}	Melanoma Prostate HCC Head and neck	Peripheral blood
	CD14 ⁺ IL-4R ⁺ CD124	Colon Melanoma	Peripheral blood
	CD14 ⁺	Melanoma	Peripheral blood and tumour tissue

(Tabla desde YS Khaled et al., Review Immunology and Cell Biology 2013)

1.4.6. Mecanismos de Supresión

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

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

Durante el proceso carcinogénico, las MDSCs son capaces de inhibir esta respuesta a través de mecanismos específicos que se siguen describiendo actualmente. Éstas pueden

usar diferentes mecanismos para suprimir la proliferación de las células T, demostrando que ambos subgrupos de MDSCs usan diversas vías y moléculas de señalización para ejercer su función (87). Sin embargo, el papel que juegan en la supresión antígeno específica y a medida en que afectan la respuesta antitumoral en humano aún no han sido determinadas.

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

1.4.6.1. Mecanismos de supresión dependientes de L-Arginina

Los mecanismos supresores de las MDSCs descritos con mayor frecuencia en la literatura están basados en el metabolismo que llevan a cabo las MDSCs sobre el aminoácido esencial L-arginina, el cual es un importante nutriente para una gran diversidad de procesos celulares (99). La L-arginina es un aminoácido utilizado en la biosíntesis de proteínas como creatina y agmatina, ésta es metabolizada principalmente por las enzimas arginasa y sintasa de óxido nítrico, las cuales producen respectivamente: urea y L-ornitina, y óxido nítrico y L-citrulina (Figura 14). El consumo y transformación de la L-arginina, a través de las enzimas iNOS y ARG-1 alteran funciones vitales para los linfocitos T como su activación y proliferación. Además, un incremento en el metabolismo de estos factores por las células mieloides, ocasiona un daño a los linfocitos antígeno específicos durante la respuesta antitumoral (100).

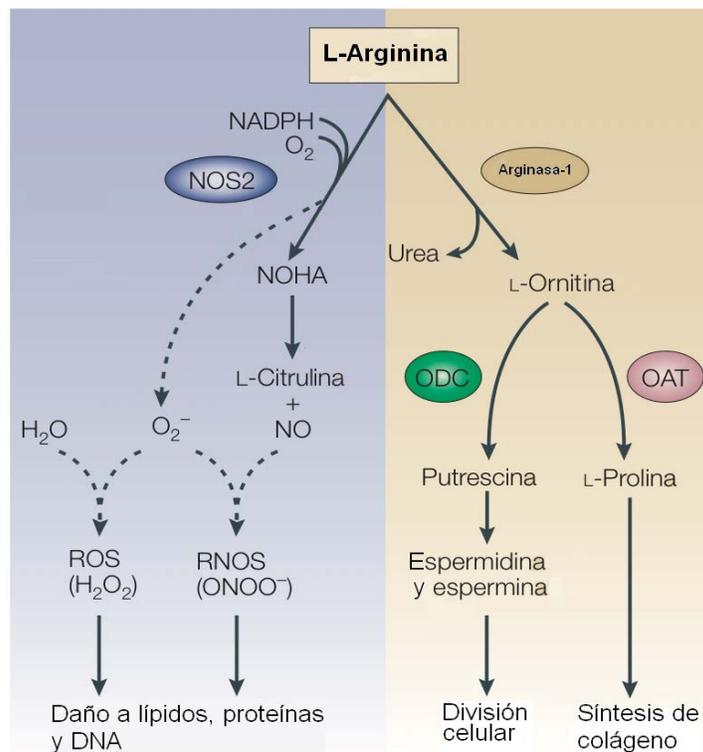


Figura 14. Representación esquemática de rutas metabólicas dependientes de las enzimas arginasa-1 e iNOS (NOS2). Las actividades de ambas enzimas se ilustran junto con las rutas metabólicas corriente abajo, que son activadas por la L-Arginina. Las líneas continuas indican la actividad enzimática principal, mientras que la línea punteada indica la ruta metabólica alternativa. En particular, cuando las concentraciones de la L-arginina son limitadas, los electrones se transfieren a través de subunidades de iNOS al co-sustrato O_2 , el cual genera al ión superóxido (O_2^-). El O_2^- (de esta reacción o de otra fuente) puede reaccionar con óxido nítrico para generar peroxinitritos ($ONOO^-$) o con agua para producir peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Se ha reportado la producción de peroxinitritos por la actividad combinada de arginasa-1 e iNOS, la producción de H_2O es indicada, considerando el mecanismo de reacción química y por las observaciones iniciales, aunque aún no ha sido comprobado completamente. Debe notarse que otras reacciones oxidativas generan a las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés reactive oxygen species) en la célula. NOHA, NG-hydroxy-L-arginine; RNOS, reactive nitrogen-oxide species.) (Imagen de Bronte, Nat Rev Immunol, 2005).

1.4.6.2. Agotamiento de L-Arginina y su efecto en la proliferación y activación de los linfocitos T

El consumo y agotamiento de la L-arginina tiene un efecto importante en la función de distintos tipos celulares. En organismos unicelulares, el agotamiento de nutrientes es una estrategia utilizada para regular la proliferación de células que compiten en un microambiente (101). La familia de enzimas arginasas, está altamente conservada entre

las especies.

La arginasa hidroliza a la L-arginina a L-ornitina y urea (Figura 11). La L-ornitina es un precursor para la síntesis de poliaminas a través de la ornitina descarboxilasa (ODC) y para la síntesis de la L-prolina por la enzima ornitina aminotransferasa (ODC), las poliaminas están involucradas en la diferenciación y crecimiento celular, mientras que la L-prolina afecta la producción del colágeno (101).

Es importante señalar que la mayor parte de información referente a los procesos moleculares que involucran a esta enzima dentro del contexto de las MDSCs se ha obtenido de numerosos modelos murinos bien diseñados. Así se han identificado dos isoformas de la L-arginasa: arginasa-1 y arginasa-2, que son codificadas por diferentes genes. Las isoformas son idénticas en un 58% a nivel de la secuencia de aminoácidos, pero tienen distintas distribuciones celulares. La arginasa-1 (también conocida como arginasa de tipo hepática) se localiza en el citosol de hepatocitos y es un componente importante del ciclo de la urea (101). Además, su expresión es inducida en células mieloides de ratón a través de la exposición a citocinas de tipo Th2, como IL-4 ó IL-13, así como por el TGF- β (100). Así mismo, el factor de transcripción más importante para la arginasa-1 es el STAT6, pero también hay rutas independientes. El STAT-1 también se puede requerir para inducir la expresión de arginasa-1 e iNOS pero estas rutas moleculares no han sido totalmente dilucidadas (85).

La arginasa-1 humana, se expresa constitutivamente en granulocitos mientras que la arginasa-2 conocida comúnmente como arginasa tipo renal se expresa constitutivamente en la mitocondria de varios tipos celulares, incluyendo células renales, neuronas, macrófagos y enterocitos (101). La inducción de la expresión de esta enzima en varios sistemas biológicos también se ha vinculado con la sobre-regulación de los transportadores de membrana de la L-arginina, indicando que ambos forman una unidad funcional. Los transportadores de aminoácidos catiónicos de ratón CAT2A, CAT2B, CAT3 y CAT4 (CATs, por sus siglas en inglés) son proteínas integrales de membrana que transfieren L- lisina, L-arginina y L-ornitina a través de una vía independiente del pH, sensible a estimulación y saturable. Las CATs bombean L-arginina desde el compartimiento extracelular al intracelular para compensar su metabolismo por la arginasa-1 intracelular o por iNOS. Se ha observado que las MDSCs sobre-regulan coordinadamente la expresión de ARG-1 y del transportador de aminoácidos catiónico CAT2B, lo cual resulta en una disminución de L-arginina extracelular, por debajo de los niveles normales (100). En un modelo de cáncer pulmonar en ratón, se encontró que

infiltrados de células con fenotipo supresor, (CD11b⁺GR1-F4/80-CD16⁺CD32) con alta expresión de arginasa-1 y CAT2B incorporan y consumen rápidamente L-arginina del medio extracelular, lo que resulta en daño a la función de células T, mediante la inhibición de la expresión de la cadena ζ del CD3, después de la internalización inducida del TCR en células T antígeno específicas (102). Este mecanismo parece ser relevante para la proliferación tumoral y para evadir su eliminación *in vivo*, ya que al inhibir la arginasa con (N-hidroxi-nor-L-arginina), se limitó el crecimiento tumoral de manera dependiente a la dosis (100). La cadena ζ del CD3 es un importante componente para la transducción de señales en el TCR y se requiere para el ensamblaje correcto del complejo receptor. La pérdida de esta cadena es uno de los mecanismos descritos que demuestra tener relevancia en la función de las células T (73).

1.4.6.3. Estrés Oxidativo

La L-arginina es también el sustrato para la familia de enzimas de óxido nítrico sintasa (NOS). Se han descrito tres isoformas de la enzima NOS, como productos de diferentes genes. Estas isoformas son idénticas en un 50% pero difieren en su localización intracelular, regulación, propiedades catalíticas y sensibilidad inhibitoria: NOS1 (también llamada nNOS) predomina en tejido neuronal; NOS2 (también llamada iNOS) es la isoforma inducida, la cual está presente en varias células del sistema inmune, incluyendo varios tipos de células mieloides, y NOS3 (también llamada eNOS) se encuentra en células endoteliales (103).

La expresión de iNOS y la producción de NO se han descrito claramente en macrófagos, neutrófilos, DCs y otras células que participan en la respuesta inmune. Se sabe que los inductores principales de iNOS son el IFN- γ y el lipopolisacárido, pero también puede ser activada por otras citocinas inflamatorias como IL-1, TNF, o IFN- γ . Estas citocinas regulan varios factores de transcripción tales como el NF-K β , la proteína activadora 1 (AP1) y STAT-1 (103). Las especies reactivas de oxígeno conducen a diversos bloqueos moleculares en las células T, que van desde la pérdida de la expresión de la cadena ζ del TCR (104), hasta la desregulación en la señalización de la vía del IL-2R (103) y la desensibilización subsecuente del TCR (15). Se sabe que el óxido nítrico (NO) regula negativamente a proteínas de señalización intracelulares, ya sea directamente a través de la nitrosilación de residuos de cisteína, o indirectamente por la activación de la enzima

guanilato ciclasa (GC) y a la proteína cinasa dependiente de guanosín monofosfato cíclico (cGMP). En las células T, el NO puede bloquear la fosforilación y por lo tanto la activación de importantes proteínas de señalización. Estudios en humanos han demostrado que el NO afecta la estabilidad del mRNA que codifica para la IL-2 en linfocitos activados (103). Por otro lado, el peroxinitrito (ONOO-) es una potente molécula oxidante producto de la reacción entre el NO y el anión superóxido, induce la nitración y nitrosilación de los aminoácidos cisteína, metionina, triptófano y tirosina del TCR y de moléculas CD8. También se encuentra en altos niveles en sitios donde las MDSCs y células inflamatorias se acumulan, incluyendo sitios de reacciones inmunológicas y puede funcionar como un mensajero intra e intercelular poco común que induce modificaciones post-traduccionales en las proteínas, a través de la nitración de los residuos de tirosina. La nitración de los residuos de tirosina puede por lo tanto, influir en diferentes actividades biológicas, como la actividad o inactividad enzimática, diferenciación, proliferación e inducir apoptosis celular. En dosis altas, los peroxinitritos controlan la muerte celular, por nitración de componentes de la membrana mitocondrial, lo cual causa daño en este organelo celular y por lo tanto la liberación de factores que promueven la muerte celular, como el citocromo c (103). Por otra parte en pacientes con cáncer avanzado, el peróxido de hidrogeno H₂O₂ producido por granulocitos circulantes de baja densidad, han sido reconocidos como los causantes del daño funcional en las células T por la alteración en la expresión de la cadena ζ del CD3 (103).

Es importante mencionar que la falla del reconocimiento antígeno específico que puede producir el estrés oxidativo antes descrito sobre las moléculas de superficie de los linfocitos T, no necesariamente los conducen a la muerte, ni evita su activación específica contra otros estímulos sin relación con los antígenos tumorales, incluyendo virus, lectinas, moléculas co-estimuladoras, interleucinas u otros estímulos (105).

1.4.6 4. Mecanismos que conducen a una disminución de la expresión de la cadena ζ del receptor CD3

La cadena ζ es una molécula de señalización transmembranal de 16 kDa implicada en la transducción de la señal durante la activación de las células T. Se descubrió primero como una subunidad del complejo TCR, y más tarde como un componente de los receptores activadores NKp46, NKp30 y CD16, expresados por las células NK (106).

Se presenta como un homodímero unido por disulfuro, que consiste en un dominio citoplásmico más largo y uno corto extracelular, que contiene tres inmunoreceptores

motivos de activación basados en tirosinas (ITAM por sus siglas en inglés). La fosforilación de la tirosina desencadena una cascada de señalización tras el reclutamiento inicial de la proteína cinasa de 70 kDa (ZAP-70) asociada a la cadena ζ específica de las células T, generando una cascada de señales intracelulares (106). Estos procesos son críticos para el desarrollo de las células T, la diferenciación, la expansión clonal, funciones efectoras, y / o la producción de citocinas (107).

La baja expresión de la cadena ζ en las células T y NK fue descrita por primera vez en cáncer colorrectal (108) y el carcinoma de células renales (109), pero posteriormente se observó en tumores malignos como en el melanoma (110), cervico uterino (111), páncreas, ovario (112), de mama (113) y cáncer de cabeza y cuello (114), y con frecuencia se correlaciona con la progresión tumoral y una menor supervivencia (115-118). Así mismo, la disminución en la expresión de dicha cadena causa una reducción en el efecto citotóxico, en la proliferación celular y en las citocinas cooperadoras Th, y se ha descrito en el contexto de diferentes tipos de tumores humanos (119).

Sin embargo, reportes en otras enfermedades sugieren que la pérdida de CD3 ζ no es exclusivo del cáncer, se ha descrito en estados inflamatorios crónicos, en enfermedades autoinmunes (lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoide), y en infecciones crónicas, como el VIH y lepra (106).

Por otro lado, se cree que la baja expresión de la cadena ζ puede ser producida por metabolitos oxidativos por ejemplo, el óxido nítrico (NO), peróxido de hidrógeno (120, 121), y por la arginasa-1 (122). Se ha demostrado que la secreción de arginasa-1 por parte de los macrófagos activados, granulocitos y MDSC inducen la pérdida de la cadena ζ por lo que es un importante mecanismo de supresión de las células T en ratones portadores de tumores y en humanos (120, 122).

Sin embargo, otro de los mecanismos responsables de la baja expresión de la cadena ζ en pacientes con distintos tipos de cáncer, puede ser la secreción de citocinas inmunosupresoras por las células tumorales, las cuales producen TGF- β 1 e IL-10 y aún más importante, los elevados niveles séricos de estas citocinas también se han correlacionado con una disminución en la expresión de la cadena ζ . Además se ha sugerido que la baja expresión de la cadena ζ se asocia con una disminución de las citocinas de tipo 1 como IFN- γ , IL-2 y TNF- α (20, 21).

Por lo anterior, la cadena ζ del CD3 es un importante componente para la transducción de señales en el TCR y se requiere para el correcto ensamblaje del receptor. La pérdida de

esta cadena es uno de los mecanismos descritos que demuestra tener relevancia en la función de las células T (123).

Debido al papel central que juega el TCR ζ en la señalización celular, se espera que las consecuencias biológicas de su baja expresión y/o ausencia sean considerables, lo que resulta en una disminución de la inmunidad antitumoral, peor pronóstico y una menor supervivencia. Por lo tanto, la cadena ζ se está convirtiendo en una molécula de señalización clínicamente relevante, lo que también parece predecir una respuesta favorable a las terapias biológicas (21)

1.4.6.5. Supresión cooperativa de Arginasa e iNOS.

La arginasa-1 e iNOS, son enzimas utilizadas tanto individualmente como en conjunto por las MDSCs para suprimir la respuesta de las células T. La elección de cuál de estas enzimas se utilizará, está regulada por una compleja red de señalización la cual es la base para que las MDSCs y células T activadas puedan interactuar. El mecanismo molecular que regula la activación y proliferación de las células T, depende de la predominante actividad enzimática. Las evidencias iniciales indican que el metabolismo de cada una de estas enzimas regula negativamente a la otra por competencia directa del sustrato (L-arginina) (103)

Sin embargo, cuando se induce la expresión de ambas enzimas en el interior de las MDSCs, datos cinéticos indican que la producción del óxido nítrico no debe ser afectada en gran medida, ya que si bien, la ARG-1 tiene menor afinidad por el sustrato, se observó que está cataliza la reacción aproximadamente 1000 veces más rápido que iNOS, lo que indica que la L-arginina es metabolizada a velocidades similares por estas dos enzimas (124) Recientemente se mostró una actividad combinada de arginasa e iNOS, en células mieloides CD11b+ provenientes de infiltrados tumorales. Esto indica que la co-expresión de estas enzimas puede ser un marcador de las MDSCs. Tanto las especies reactivas de oxígeno como él (H₂O₂) y las especies reactivas de nitrógeno como él (ONOO⁻), son capaces de cruzar membranas dentro de las células o entre ellas (103).

1.4.6.6. Nuevos mecanismos

Recientemente se ha descrito que las MDSCs aprovechan un exceso de mecanismos para influir negativamente en la respuesta inmune innata y adaptativa. En los mecanismos de supresión de estas poblaciones, se encuentran involucrados los transductores de señal activadores de la transcripción, como STAT3, STAT1 y STAT6, que dan lugar a la expresión de factores inmunosupresores.

1.4.6.6.1. Afectación del tráfico y viabilidad de los linfocitos T

La expresión de ADAM17 (desintegrina y proteína 17 que contiene un dominio metaloproteinasa) en la membrana plasmática de las MDSCs disminuye la expresión de CD62L en la superficie de las células T CD4 + y CD8 +, lo que limita la recirculación de las células T a los ganglios linfáticos (125). Otro ejemplo es la modificación de CCL2 por el peroxinitrito derivado de las MDSCs, un proceso que afecta la migración de las células T CD8 + en el núcleo del tumor (126)

1.4.6.6.2. Inducción de apoptosis en los Linfocitos T

Las MDSCs expresan galectina 9, que se une a la inmunoglobulina de las células T y a la proteína 3 que contiene dominios de mucina (TIM3) en los linfocitos e induce la apoptosis de células T (127). Las MDSCs también disminuyen en número e inhiben la función de las células NK en ratón y humanos, principalmente a través de la membrana en contacto con los mecanismos dependientes (es decir, a través de la membrana envolvente del TGF- β - en el caso de MDSCs ratón) y mediante la interacción con el receptor de las células NK Nkp30 (también conocido como NCR3) (128-130) (Figura 15).

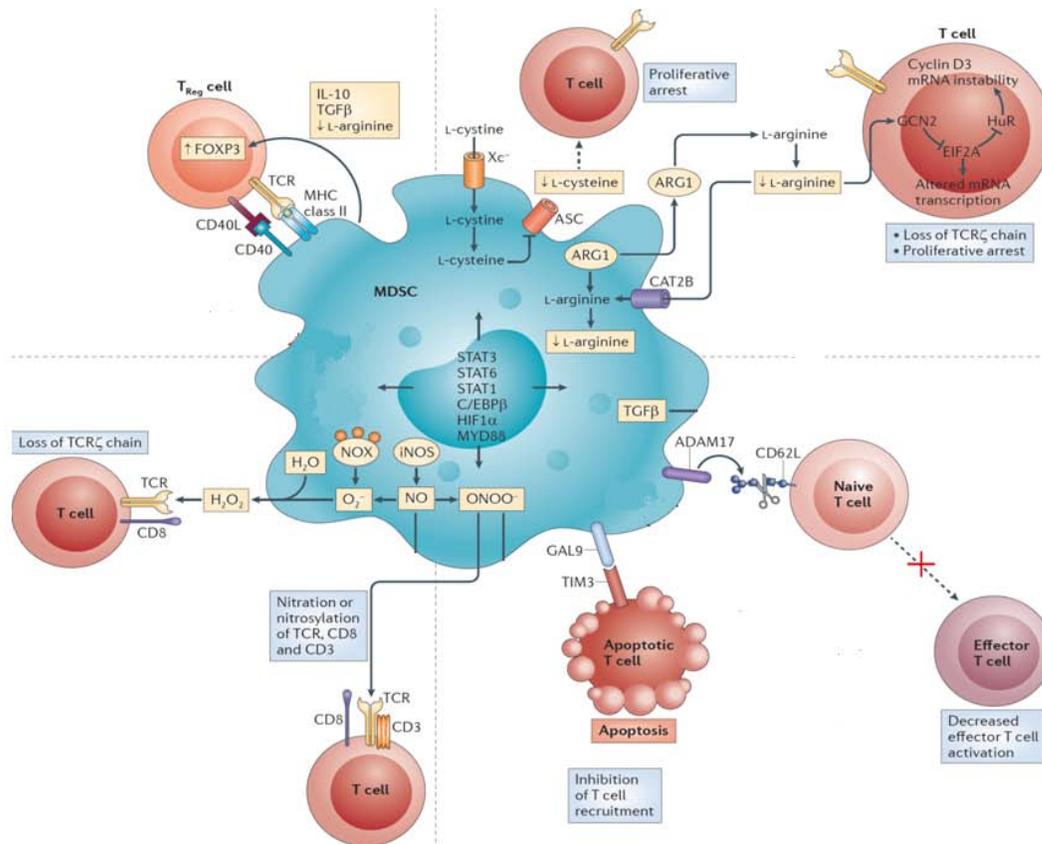


Figura 15. Mecanismos de inhibición dependientes de las MDSCs sobre la activación y proliferación de linfocitos T. Las Células supresoras de origen mieloide (MDSCs) pueden inhibir eficientemente la respuesta antitumoral de células T a través de diferentes mecanismos. a) MDSCs asociadas al tumor inducen el desarrollo de linfocitos T reguladores Treg y también la proliferación de los Treg ya existentes. Las proteínas de unión a calcio S100A8 y S100A9 están involucradas en la quimiotaxis de las MDSCs y otras células mieloides; estos efectos son mediados en parte a través del receptor de glicosilación avanzada de productos finales (RAGE). Al mismo tiempo S100A8 y S100A9 extendidos con gp91phox son parte del complejo NADPH oxidasa (NOX) que es responsable del incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por las MDSCs. b) Células mieloides asociadas al tumor privan a los linfocitos T de aminoácidos esenciales para su diferenciación y crecimiento. c) Células mieloides asociadas al tumor liberan moléculas oxidantes, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y peroxinitrito ($ONOO^-$). El peroxinitrito causa nitración y nitrosilación de componentes del complejo de señalización del receptor de células T (TCR) y el H_2O_2 causa la pérdida de la cadena del TCR, inhibiendo por lo tanto la activación de células T. d) Células mieloides asociadas al tumor también pueden interferir con la migración y viabilidad de células T. La metaloproteína ADAM17 (proteína 17 con dominio

metaloproteinasa y desintegrina) se acopla a CD62L, el cual es necesario en la migración de células T para drenar nódulos linfáticos. Y la galectina 9 (GAL9) puede actuar sobre la inmunoglobulina de células T y sobre la proteína 3 con dominio mucina (TIM3) sobre células T para producir apoptosis. Como la inducción de las vías inmunosupresoras que se muestran en la imagen son reguladas por factores de transcripción comunes, estas vías pueden operar en más de un tipo celular mielóide. (Imagen de Gabrilovich.D. Nature Revs. Immunol. 2012)

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

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

En los órganos linfoides periféricos, la supresión de las MDSCs sobre los linfocitos T CD8+ se produce principalmente de manera antígeno específica y requiere de la presentación de antígenos por MDSCs, así como del contacto directo con células T (103) (Figura 16). Por el contrario, en la periferia (131) y en el sitio del tumor (132-134), la actividad de MDSCs se ve aumentada por las células T activadas, y como resultado las MDSCs son capaces de suprimir a las células T cercanas de forma antígeno no específica. Sin embargo, si las células T se activan y comienzan a expresar el ligando de Fas (también conocido como CD95L), las MDSCs pueden inducir en éstas un proceso apoptótico (131).

La medida en que las MDSCs pueden suprimir la respuesta inmune de manera específica y no específica sigue siendo estudiada por distintos grupos. Sin embargo, las evidencias indican que los factores que median la función supresora de las MDSCs pueden inhibir la proliferación de las células T inespecíficamente, siempre y cuando éstas se encuentren en proximidad con las MDSCs (11). Estos hallazgos se confirman en estudios in vitro que es donde se lleva a cabo una supresión antígeno no específica de las células T, mediada por

las MDSCs. Mientras que las interacciones antígeno específicas entre células presentadoras de antígeno y células T, resultan en un contacto mucho más estable y más prolongado, que las interacciones antígeno no específicas. Estas interacciones célula-célula, son necesarias para que los peroxinitritos y ROS generados por las MDSCs, medien sus efectos en las moléculas expresadas en la superficie de las células T, y hacen que estas células queden sin respuesta a antígenos específicos. Otra evidencia que soporta la hipótesis de que las MDSCs median la supresión de las células T de manera antígeno específica es el hallazgo que demuestra que las MDSCs pueden tomar antígenos solubles, incluyendo antígenos asociados a tumores, procesarlos y presentarlos a las células T para mediar una supresión antígeno específica (102).

Apoyando esto en un estudio in vitro, se observó que al bloquear la interacción MDSC-célula T, con anticuerpos específicos contra el MHC clase I, bloquea la inhibición de la respuesta de células T CD8+ ejercida por las MDSCs. La naturaleza de la supresión de células T CD8+ mediada por las MDSCs, restringida al MHC clase I, se ha demostrado también in vivo en modelos tumorales y modelos de enfermedad intestinal (135, 136).

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

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

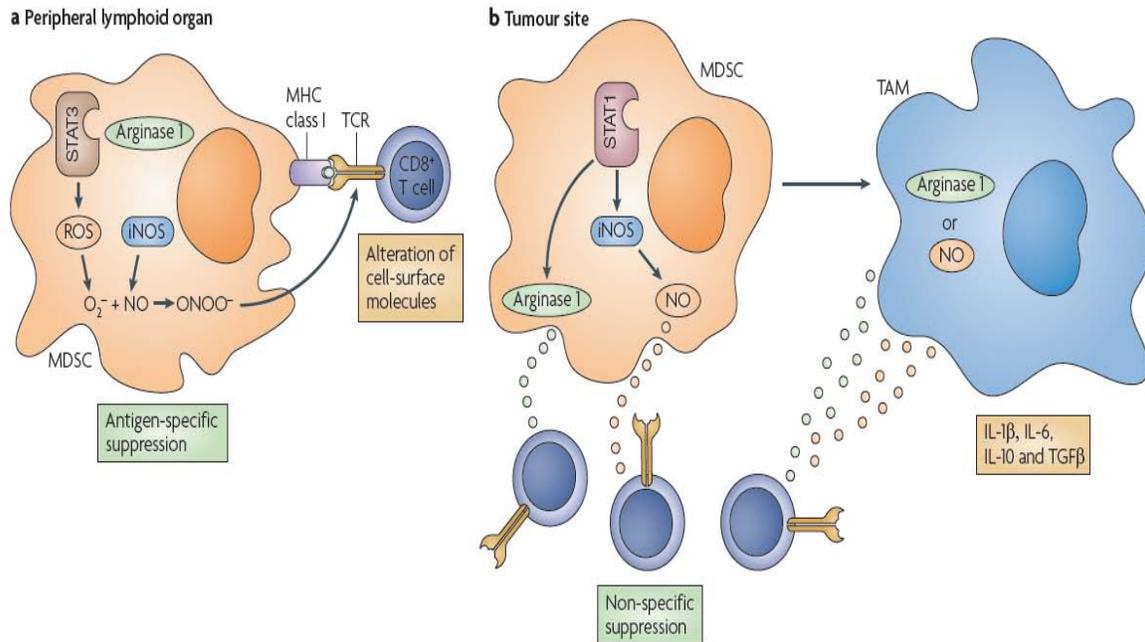


Figura 16. Mecanismos de supresión inmune mediada por las MDSCs en órganos linfoides secundarios y en sitios tumorales (Imagen de Gabrilovich.D. Nat. Rev. Immunol. 2009).

1.4.8. Mecanismos de inmunoterapia para suprimir la expansión y activación de MDSCs

El reconocer recientemente que la supresión inmune es crucial para promover la progresión tumoral, ha resultado en un cambio respecto a los enfoques de la inmunoterapia del cáncer.

Ahora se sabe que el éxito de la inmunoterapia del cáncer sólo será posible con una estrategia que consista en la eliminación de los factores de supresión, como es el caso de las MDSCs que son uno de los principales factores inmunosupresores en el cáncer así como de otras condiciones patológicas. Y actualmente se están estudiando diferentes tipos de estrategias terapéuticas que se dirigen a este tipo de células (137, 138).

Uno de los enfoques más prometedores por el cual MDSCs es blanco terapéutico, es el de promover su diferenciación en células mieloides maduras que no favorezcan funciones supresoras.

La vitamina A ha sido identificada como un compuesto que puede mediar este efecto: los metabolitos de la vitamina A, como el ácido retinoico, estimulan la diferenciación de las células progenitoras mieloides en DCs y macrófagos (12, 138). Los ratones que son deficientes en vitamina A (139) o que han sido tratados con un antagonista del receptor

pan-ácido retinoico (140), muestran una expansión de MDSCs en la médula ósea y el bazo. Por el contrario, la administración de concentraciones terapéuticas de ácido trans-retinoico (ATRA) se traduce en una disminución sustancial en el número de MDSCs en pacientes con cáncer y en ratones portadores del tumor. Se ha demostrado que ATRA induce la diferenciación de MDSCs en DCs y macrófagos *in vitro* e *in vivo* (12, 13, 141). Es probable que ATRA induzca la diferenciación de las MDSCs del subconjunto de monocitos y media la apoptosis del subgrupo de los granulocitos.

El principal mecanismo de diferenciación mediado por ATRA implica una sobre-regulación en la síntesis de glutatión y una reducción en los niveles de ROS en MDSCs (142). En estudios con ratones portadores del tumor, al disminuir el número de MDSC resultó en un incremento en la respuesta de células T tumor-específicas. Así mismo, la combinación de ATRA y de dos tipos de vacunas contra el cáncer, prolongó el efecto antitumoral de la vacuna en diferentes modelos tumorales (141). Por otra parte, la administración de ATRA a los pacientes con carcinoma de células renales metastásico resultó en una disminución sustancial en el número de MDSCs en sangre periférica y mejoró la respuesta de las células T antígeno-específicas (143).

Estudios adicionales podrían conducir a la identificación de otros agentes que tienen un efecto similar. Hasta ahora, la evidencia sugiere que la vitamina D3 puede ser un compuesto que tiene el potencial de disminuir el número MDSC en pacientes con cáncer, ya que también es conocido por promoverla diferenciación de las células mieloides (144).

Por otro lado se sabe que la expansión de MDSC es regulada por factores derivados del tumor, varios estudios se han enfocado en neutralizar los efectos de estos factores. Recientemente, el factor de células madre (SCF) está implicado en causar la expansión de MDSC en ratones portadores de tumores. La inhibición en la señalización de SCF mediante el bloqueo de la interacción con su receptor KIT, disminuye la expansión de MDSC y la angiogénesis tumoral (145). Así mismo, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), otro de los factores derivados del tumor que promueve la expansión de MDSC, también podría ser un blanco útil para manipular a las MDSCs. Sin embargo, en un ensayo clínico de 15 pacientes con tumores sólidos refractarios, en el cual, el tratamiento con VEGF-Trap (una proteína de fusión que une a todas las formas de VEGF y el factor de crecimiento placentario) no mostró ningún efecto sobre el número de MDSC y no produjo un aumento en la respuestas de las células T (146). Por el contrario, el tratamiento de pacientes con carcinoma de células renales metastásicas con un anticuerpo de bloqueo específico del VEGF conocido como Avastin resultó en una

disminución en el tamaño de la población de MDSCs CD11b+VEGFR1+ en sangre periférica (147). Sin embargo, aún no se ha determinado si el tratamiento con avastatin resulta en una mejora en la respuesta antitumoral en estos pacientes. Por último, al inhibir la función de la metaloproteínasa 9 de matriz en ratones portadores del tumor disminuyó el número de MDSCs en el bazo y los tejidos tumorales, y resultó en un retraso significativo en el crecimiento de tumores espontáneos NeuT en ratones transgénicos BALB/c (148). Sin embargo, el mecanismo responsable de este resultado está todavía por dilucidar.

Así mismo, otro enfoque para inhibir a MDSCs es bloquear las vías de señalización que regulan la producción de los factores de supresión por estas células. Uno de los potenciales blancos por lo cual esto podría lograrse es la ciclooxigenasa 2. La ciclooxigenasa 2 es necesaria para la producción de prostaglandina E2, que se ha demostrado que induce la sobre-regulación de arginasa-1 expresada por las MDSCs (y con ello se induce su función supresora) en las células del tumor 3LL (149) y carcinoma de mama (150). En consecuencia, se encontró que los inhibidores de la ciclooxigenasa-2 regulan negativamente la expresión de la arginasa-1 por MDSCs, mejoró la respuesta antitumoral de las células T así como la eficacia terapéutica (151, 152). Del mismo modo, los inhibidores de la fosfodiesterasa 5, como sildenafil, se encontró que regulan negativamente la expresión de la arginasa-1 e iNOS por las MDSCs, inhibiendo la función supresora de los tumores en crecimiento (153). Ocasionalmente una respuesta inmune antitumoral medible y un marcado retraso en la progresión tumoral en varios modelos de ratones. De igual forma, los inhibidores de ROS también han demostrado ser eficaces para disminuir la supresión inmune mediada por las MDSC en ratones portadores del tumor. Uno de estos fármacos, es la nitroaspirina, la cual se encontró que limita la actividad de la arginasa-1 e iNOS en MDSCs del bazo. Además, la nitroaspirina inhibe la función de MDSCs y aumenta el número y función de las células T antígeno-específicas cuando se administra en combinación con antígenos retrovirales endógenos gp70 (154).

Por último, las MDSCs pueden ser directamente eliminadas en cualquier condición patológica mediante el uso de determinados fármacos quimioterapéuticos. La administración de uno de estos fármacos, la gemcitabina, en ratones con tumores de gran tamaño resultó en una reducción significativa en el número de MDSCs en el bazo y una notable mejoría de la respuesta antitumoral. Este efecto era específico para MDSCs, pero no se observó una disminución significativa en el número de células B y T en estos animales (155, 156). La evidencia sugiere que existe una amplia gama de métodos que podrían ser efectivos para orientar el número y/o función de MDSCs *in vivo*. Estas

estrategias, sin duda, ayudarán a investigar más a fondo la biología de estas células para avanzar en aplicaciones clínicas para el tratamiento del cáncer y otras condiciones patológicas.

ANTECEDENTES DIRECTOS DEL PRESENTE ESTUDIO

En un estudio realizado en nuestro laboratorio en 40 pacientes con adenocarcinoma (AD) en estadio clínico IV y 25 sujetos sanos, se analizó la frecuencia de una subpoblación de origen mieloide inmadura (CD33⁺HLA-DR⁻) en células mononucleares de sangre periférica encontrándola incrementada en pacientes ($11.02 \pm 3.65\%$ vs. sanos $2.16 \pm 1.04\%$ $p < 0.0001$), observándose también una disminución en las células T CD8⁺ (AD $16.48 \pm 5.7\%$ vs. sanos $27.6 \pm 5.0\%$). Las MDSC de origen granulocítico se caracterizaron a partir de la fracción de granulocitos de sangre completa de las muestras de controles y pacientes con el fenotipo CD66b⁺CD11b⁺ CD15⁺ CD14⁻ HLADR⁻. Dicha subpoblación se encontró incrementada significativamente (15.7 ± 3.1 vs sanos $1.5 \pm 0.9\%$ $p < 0.05$) en los pacientes con AD etapa IV respecto a los sujetos control. Estos resultados preliminares sugieren que existen al menos dos subpoblaciones de origen mieloide inmaduras presentes en sangre periférica en sujetos con adenocarcinoma en estadio clínico IV que pudieran potencialmente ejercer un efecto inmunosupresor a nivel periférico.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México se estima que, para este año, habrá más de 8000 muertes por cáncer pulmonar, lo que significa un incremento del 50% en tan sólo una década. En el INER y en el Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) el número de casos también va en aumento siendo el adenocarcinoma, el tipo histológico predominante. 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 que intervengan en la regulación de los procesos inmunológicos involucrados en el desarrollo del cáncer pulmonar. Por lo anterior, este estudio pretende identificar una posible asociación en la presencia de células supresoras de origen mieloide y la supresión funcional de las células T de sangre periférica en pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar la supresión funcional de células T de sangre periférica y su asociación con la presencia de la subpoblación CD66b⁺CD11b⁺ CD15⁺ CD14⁻ HLADR⁻ en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas.

3.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar la frecuencia de MDSC en pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas y sujetos control por citometría de flujo
2. Evaluar la expresión de la cadena CD3 ζ del receptor de linfocitos T en pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas y sujetos control por citometría de flujo.
3. Cuantificar las citocinas IL-6, IL-10, IL-17, IL-1 β , INF- γ y TGF- β en plasma de pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas y sujetos control.

IV. METODOLOGIA

4.1. 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 uno de pacientes en las etapas clínicas IIIA, IIIB y 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. Este último está basado en la extensión y tamaño del tumor primario (T), la afectación de ganglios linfáticos regionales (N), y la presencia o ausencia de metástasis a distancia (M). 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 ≤ 2 de acuerdo con las normas del ECOG (Eastern Cooperative Oncologic Group Scale).

En el presente trabajo se incluyeron 91 pacientes con diagnóstico confirmado de cáncer pulmonar que se encontraban en estadio clínico IV con diagnóstico de adenocarcinoma. Participaron 25 sujetos control sin síntomas respiratorios, fumadores y no fumadores como grupo control.

4.2. Criterios de inclusión

a) Pacientes con cáncer pulmonar:

Se incluyeron aquellos pacientes que junto con un cuadro clínico-radiológico compatible con cáncer de pulmón, cumplieron 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 en el estudio aquellos sujetos con una evaluación clínica que permita validar su condición como individuos no enfermos.

4.3. Criterios de exclusión

a) Pacientes con cáncer pulmonar

1. Se excluyeron aquellos sujetos en los que existiera la posibilidad de que la lesión pulmonar fuera metastásica o con un tipo histológico diferente al adenocarcinoma

2. Sujetos con infección por VIH

3. Se excluyeron aquellos sujetos que no estén 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 registrarán para los pacientes con diagnóstico positivo para cáncer de pulmón.

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

3. Sujetos con otro diagnóstico oncogénico.

4. Sujetos con enfermedades autoinmunes (artritis, lupus, etc).

5. Aquellos que no estén de acuerdo en participar en el estudio.

4.4. Obtención de células mononucleares de sangre periférica

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

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

4.5. Caracterización fenotípica de MDSCs polimorfonucleares.

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

4.6. Caracterización fenotípica de Linfocitos T.

El análisis de las poblaciones linfocitarias se llevó cabo en la misma fracción de PBMCs para ambos grupos de estudio. Aproximadamente 500 μ l de PMBCs se marcaron con los anticuerpos de superficie anti-ratón dirigidos contra humano CD3, CD4 y CD8 durante 20 minutos. Se lavaron y resuspendieron en PBS para su análisis por citometría de flujo. De igual forma, 100 000 eventos de cada una de las muestras fueron adquiridas en el

citómetro de flujo FACS Aria (BD Biosciences, San José, Cal. USA) y analizadas con el Software FlowJo V. X (Treestar, Inc, Ashland, Or, USA).

4.7. Evaluación de la expresión de la cadena ζ del receptor de células T

A partir de 100 μ l de sangre completa se incubaron con los anticuerpos de superficie anti-humano CD3+, CD4+ y CD8+ durante 20 min a temperatura ambiente en la oscuridad, posteriormente se le agregó 1 ml de solución de lisis 1X la cual se dejó incubar durante 8 min en las mismas condiciones. Se centrifugaron a 1600 rpm durante 5 min y se retiró el sobrenadante, se le agregó 1 ml de PBS/FBS al 1% y se volvió a centrifugar. Se le agregaron 500 μ l de buffer de fijación que se incubó durante 20 min a temperatura ambiente en la oscuridad, se centrifugaron a 1600 rpm 5 min para descartar el sobrenadante, se le agregó 1 ml de Perm Wash se centrifugó 1600 rpm a 10 min, por último se incubaron con los anticuerpos intracelulares CD3 ζ o de isotipo IgG durante 30 min y se lavaron con Perm Wash para resuspender en 250 μ l de buffer de teñido o P-folmadehido para leer en el citometro.

4.8. Cuantificación de las citocinas INF- γ , IL-6, IL-10, IL-17

Se utilizó el Kit CBA Th1/Th2/Th17. Para la preparación del standard se transfirieron las perlas de un vial liofilizado Th1/Th2/Th17 a un tubo de polipropileno de 15 ml, se resuspendieron con 2 ml del diluyente de ensayo y se procuró mezclar bien sólo con pipeteo. Se etiquetaron 8 tubos para realizar las siguientes diluciones 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 y se le agregó 300 μ l del diluyente de ensayo a cada uno de los tubos. Posteriormente se le agregó al tubo rotulado 1:2 300 μ l del standard stop procurando homogenizar bien y se realizaron diluciones seriadas transfiriendo 300 μ l del 1:2 al tubo 1:4 y así sucesivamente hasta el tubo 1:256. Se utilizó como control negativo (0 pg/ml) un tubo que solo contenía el diluyente de ensayo. Para la realización de las perlas de captura de las citocinas Th1/Th2/Th17 primero se determinó el número de tubos a utilizar en el ensayo (incluyendo los controles y el standard) por ejemplo se utilizaron 8 con muestras desconocidas, 9 para la dilución standard de citocinas y un control negativo. Cada suspensión de perla de captura se homogenizó vigorosamente con vortex y se le agregaron 10 μ l de cada una de las perlas a todos los tubos del ensayo; por ejemplo se le

agregaron 10 ul de las perlas de captura IL-2 a los 18 tubos del ensayo para un total de 180 ul de perlas de captura IL-2. Posteriormente se resuspendieron las perlas de captura en el suero, se centrifugó la mezcla de las perlas a 200 g durante 5min y con cuidado se retiró el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 2 ml del buffer de suero y se agitó. Se incubó con la mezcla de las perlas de captura durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Para diluir las muestras con una concentración alta de citocinas, se diluyó por el factor de dilución deseado 1:2, 1:10, 1:100 utilizando un volumen apropiado del diluyente de ensayo. Para la realización del ensayo se agitó la mezcla de las perlas de captura y se le agregaron 50 ul a todos los tubos, se le agregaron 50 ul de la dilución estándar de citocinas Th1/Th2/Th17 a los tubos control rotulados 1:2, 1:4 etc, y se le agregó 50 ul de cada muestra desconocida a los tubos previamente etiquetados. Por último se le agregaron 50 ul del reactivo de detección Th1/Th2/Th17 PE a todos los tubos y se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente en la oscuridad. Transcurrido ese tiempo se le agregó 1 ml del Buffer de lavado a cada uno de los tubos, se centrifugaron 200g durante 5min y se resuspendió en 300 ul del buffer de lavado

4.9. Cuantificación de TGF- β 1 por ELISA.

Para la preparación de la placa se diluyó el anticuerpo de captura 360 ug/ml de anti-TGF- β 1 en PBS y se agregaron 100 ul en cada pozo; se selló la placa y se dejó incubar durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se lavaron 3 veces con 400 ul del buffer de lavado (0.005% Tween 20 en PBS, pH 7.2-7.4) y se bloqueó la placa agregándole 300 ul del buffer de bloqueo (5% Tween 20 en PBS con 0.05% Nan3) que se dejó incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.

Después de incubar con el buffer de bloqueo se le agregaron 100 ul a cada pozo de la muestra activada y sin activar la cual se dejó durante 2 horas a temperatura ambiente; trascurrido este tiempo se le agregaron 100 ul del anticuerpo de detección (54 ug/ml anti TGF-B1 de pollo biotinilado) que se diluyó en 1 ml del reactivo diluyente (1.4 % suero bovino delipidizado) y se dejó incubar durante 2 horas. Posteriormente se lavó 3 veces y se le agregaron 100 ul de la dilución de trabajo de estreptavidina-HRP que se dejó incubar durante 20 min a temperatura ambiente evitando colocar la placa a la luz directa. Se volvió a lavar 3 veces y se le agregaron 100 ul de la solución de sustrato (mezcla 1:1 del reactivo de color A (H₂O₂) y reactivo color B (tetrametilbenzidina)) que se dejó incubar durante 20 min. Por último para detener la reacción se le agregaron 50 ul de la solución

(2N H₂SO₄) y se le determinó la densidad óptica a cada pozo utilizando un lector de microplacas ajustado a 450 nm.

5. Análisis estadístico.

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 adenocarcinoma de variables continuas se realizó con la prueba t de Student o con su alternativa no paramétrica U de Man-Whitney cuando esté indicado de acuerdo a su distribución. El análisis de variables nominales u ordinales se efectuó con prueba de X² o prueba exacta de Fisher. Se consideró un valor significativo de p cuando éste fue ≤ 0.05 . Se utilizó el programa de análisis estadístico SPSS (V. 14.0; SPSS, Inc., Chicago, IL).

V. RESULTADOS

5.1. Características clínico - demográficas de los sujetos estudiados

Se incluyeron en este estudio 91 pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas, 48 mujeres y 43 hombres, la edad media fue de 60.25 años y una desviación estándar de 14.14. Adicionalmente 46 pacientes correspondieron al 51 % del grupo que presentaban antecedentes de tabaquismo, mientras que 41 de los pacientes estuvieron expuestos al humo de leña. Así mismo, el 85 % de los pacientes se encontraron en la etapa clínica IV. El 18 % de los pacientes tenía un ECOG de 2 y la media del Karnofsky fue de 84.72 (± 7.2).

TABLA 3. Características clínico - demográficas de los sujetos estudiados

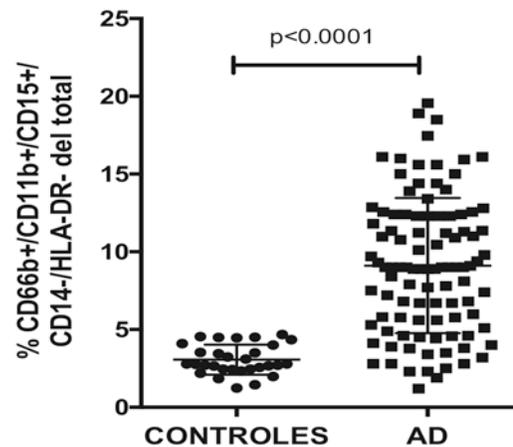
	CASOS (n = 91)	CONTROLES (n = 25)	p
SEXO			
Femenino	48/91(53)	15/25(60)	0.519
Masculino	43/91 (48)	10/25 (40)	
EDAD	60.25 (± 14.14)	61.45 (± 19.03)	
< 60 años	42/91 (45)	15/25 (60)	0.220
>60 años	49/91 (54)	10/25 (40)	
FUMADORES			
Positivo	46/91(51)	3/25 (12)	< 0.001
Negativo	45/91 (49)	22/25 (88)	
HISTOLOGIA (AD)	75/91 (82.5)	NA	
ETAPA CLINICA		NA	
III	14/91 (15)		
IV	77/91 (85)		
HUMO DE LEÑA			
Positivo	41/91 (45)	1 /25 (4)	< 0.001
Negativo	50/91 (55)	24/25 (96)	
ECOG		NA	
1	75/91 (82)		
2	16/91 (18)		
KARNOFSKY(media, desviación estándar)	84.72 (± 7.20)	NA	

Los valores corresponden a número y porcentaje (%) o a media y desviación estándar.

AD: adenocarcinoma ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group

Las muestras sanguíneas de los pacientes fueron comparadas con un grupo de sujetos control libres de cáncer con una edad media de 61 años y desviación estándar de 19.03 años. No se encontraron diferencias significativas entre las edades de ambos grupos.

5.2. Población supresora de origen mieloide CD66b⁺CD11b⁺CD15⁺CD14⁻HLADR⁻ en pacientes con adenocarcinoma en estadio IV.



La población circulante con fenotipo supresor CD66b⁺CD11b⁺CD15⁺CD14⁻HLADR⁻ mostró un incremento significativo en los pacientes con adenocarcinoma pulmonar (9.2±3.9) (n=91) libres de tratamiento, en comparación con el grupo control (3.2±0.9) (n=25) (p<0.0001) (Figura 1).

5.3. Evaluación de la expresión de la cadena ζ en las subpoblaciones CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺

Se evaluó la expresión intracelular basal de la cadena CD3 ζ del receptor CD3⁺ en linfocitos T totales y en las subpoblaciones CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ por citometría de flujo en muestras de células mononucleares de sangre periférica de 91 sujetos con adenocarcinoma (AD) y 25 sujetos sanos pareados por edad y sexo. Las características socio-demográficas se muestran en la tabla 1.

La estrategia de análisis consistió en delimitar una región donde se localizan los linfocitos según su patrón de expresión de tamaño y complejidad – Forward Scatter (FSC-A) vs – Side Scatter (SSC) (Figura 1A). De esta región se realizó una ventana en los linfocitos T CD3⁺ con base a su expresión de complejidad y el anticuerpo anti-CD3 APC (Figura 1B), tanto para los sujetos con adenocarcinoma como controles. Posteriormente se analizó la co-expresión del anticuerpo anti-CD3 ζ y CD3 ϵ en las subpoblaciones de la región 1 (Figura 1C). El análisis de las subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺ se realizó a partir de la subpoblación CD3 ϵ (Figura 1D). Se analizó por último la expresión de CD3 ζ en las

subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺ (Figura 1E). Además se evaluó la unión inespecífica mediante el control del isotipo IgG para todos los casos (Figura 1F).

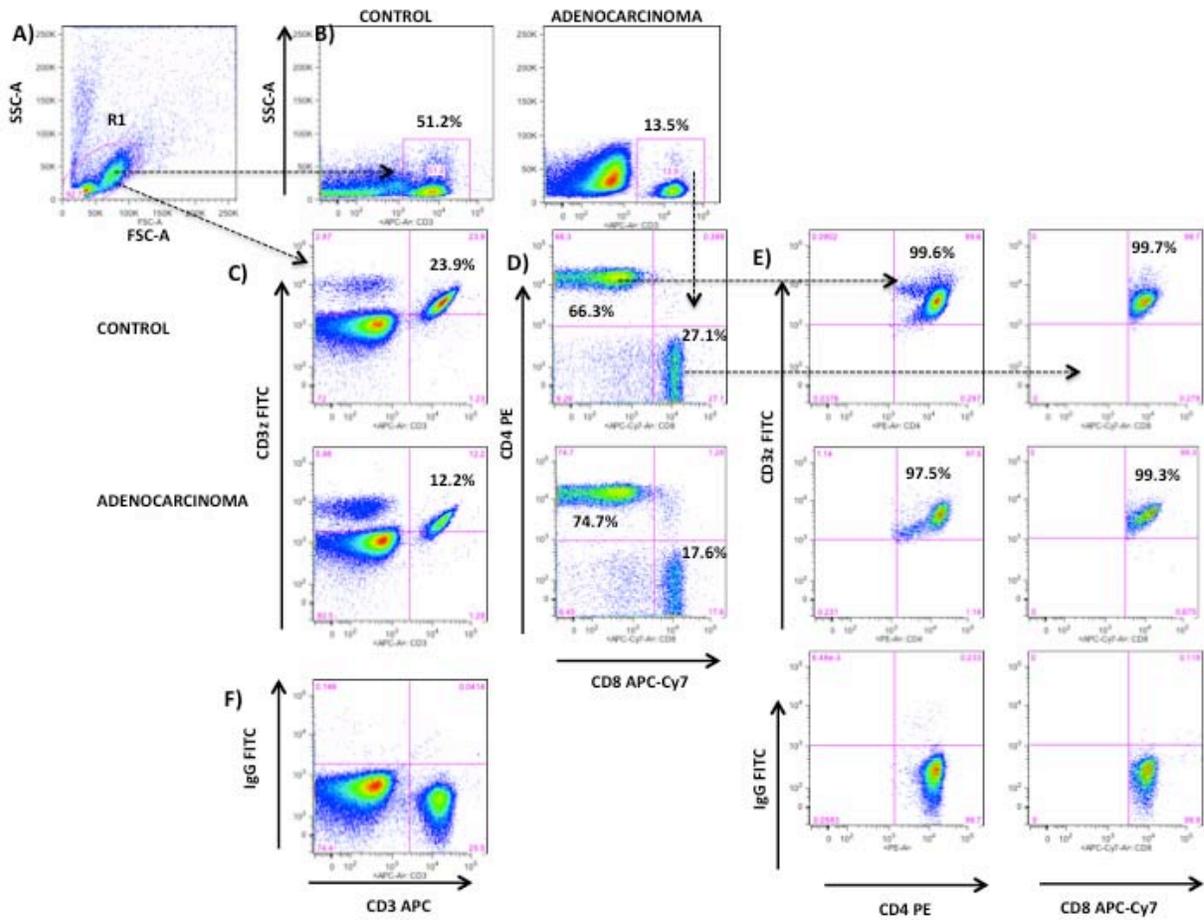


Figura 4. Estrategia de análisis por citometría de flujo para la expresión de la cadena ζ del receptor de células T CD3⁺

Tabla 4. Frecuencia de las poblaciones de linfocitos T y expresión de la cadena ζ del receptor CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺

	CASOS (n = 91)	CONTROLES (n = 25)	p
% CD3 ⁺	30.45 (1.65 – 53.50)	45.8 (30.2 – 77.4)	< 0.001
% CD3 ⁺ CD4 ⁺	31.3 (11.5 – 70.4)	64.8 (43.7 – 75.30)	< 0.001
% CD3 ⁺ CD8 ⁺	20.95 (10.10 – 39.70)	24.5 (13.1 – 41.7)	0.0052
CD3 ⁺ CD3z MFI	3096 (1194 - 7793)	9982 (1002 - 13465)	< 0.001
CD4 ⁺ CD3z MFI	2289 (956 - 4523)	5982 (2257 – 8421)	< 0.001
CD8 ⁺ CD3z MFI	3094 (1067 - 9842)	6937 (5024 - 8874)	< 0.001

*Los valores corresponden a la media (mínimos y máximos)

5.4. Linfocitos T CD3⁺, CD3⁺ CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ en pacientes con adenocarcinoma

El análisis sobre las células mononucleares de sangre periférica mostró una disminución significativa en la población de linfocitos T CD3⁺ totales en pacientes con adenocarcinoma pulmonar comparados con sujetos control ($p < 0.0001$). Adicionalmente los linfocitos T colaboradores CD3⁺ CD4⁺ de pacientes con cáncer pulmonar se encontraron disminuidos significativamente en comparación con el grupo control ($p < 0.0001$). Así como la subpoblación de linfocitos T citotóxicos CD3⁺CD8⁺ también se encontró disminuida significativamente en pacientes comparados con controles ($p < 0.0052$) (Figura 3).

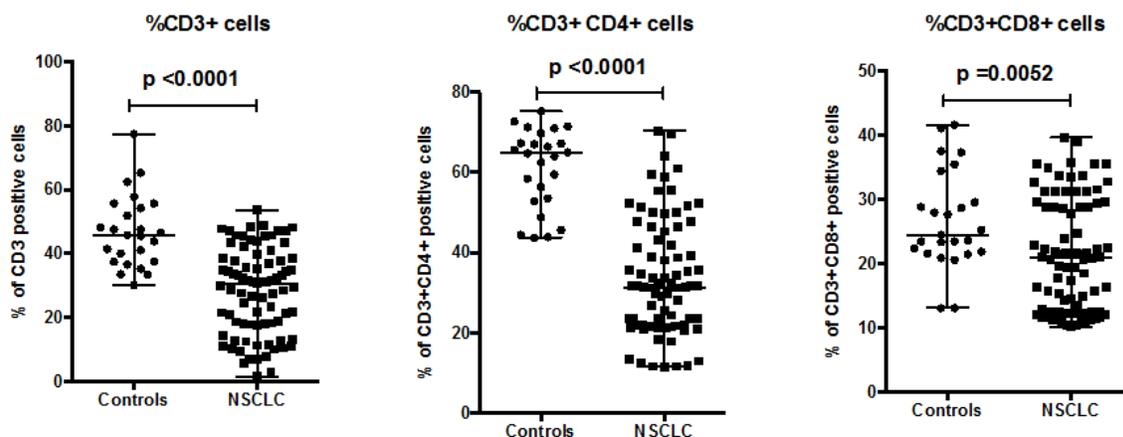


Figura 3.- Análisis de linfocitos sobre células mononucleares de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma y su correlación con el aumento de poblaciones mieloides. a) Disminución significativa ($p < 0.0001$) de células CD3⁺ totales en PBMCs de pacientes libres de tratamiento (n = 91) respecto a sujetos control (n = 25). b) Linfocitos CD3⁺ CD4⁺ de pacientes se encontraron

disminuidos significativamente ($p < 0.0001$) en comparación con controles. c) Disminución significativa ($p < 0.0052$) de Linfocitos $CD3^+CD8^+$ en pacientes comparados con controles.

La intensidad media de fluorescencia de la cadena ζ se encontró disminuida en pacientes con AD en las subpoblaciones $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$ y $CD3^+CD8^+$

El análisis de la intensidad media de fluorescencia del marcador $CD3\zeta^+$ sobre las células mononucleares de sangre periférica mostró una disminución significativa en la población de linfocitos T $CD3^+$ totales en pacientes con adenocarcinoma pulmonar comparados con sujetos control ($p < 0.0001$). Adicionalmente los linfocitos T colaboradores $CD3^+CD4^+$ de pacientes con cáncer pulmonar se encontraron disminuidos significativamente en comparación con el grupo control ($p < 0.0001$). Así como la subpoblación de linfocitos T citotóxicos $CD3^+CD8^+$ también se encontró disminuida significativamente en pacientes comparados con controles ($p < 0.0001$) (Figura5).

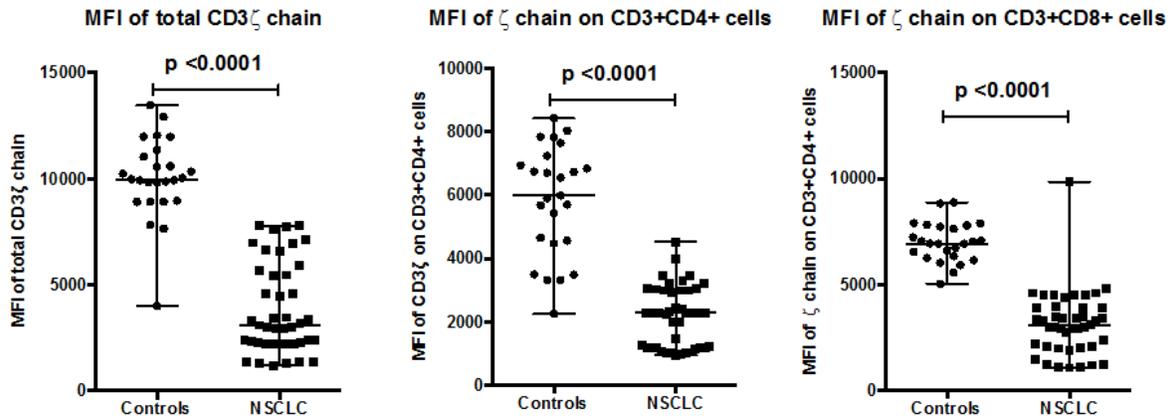


Figura 5.- Análisis de la intensidad media de fluorescencia sobre células mononucleares de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma y sujetos control, indico una disminución significativa de la expresión del marcador $CD3\zeta$ en las poblaciones de linfocitos T $CD3+CD3\zeta^+$ ($p < 0.0001$), $CD3+CD3\zeta^+CD4^+$ ($p < 0.0001$) y $CD3+CD3\zeta^+CD8^+$ ($p < 0.0001$)

5.5. Sobrevida en pacientes con alta frecuencia de células supresoras de origen mieloide.

El análisis sobre la frecuencia de MDSCs en el grupo de pacientes refleja que aquellos con MDSCs^{hi} muestran una sobrevida global al primer año de 15.11%, mientras que los pacientes con MDSCs^{low} sobreviven en un 21%. Se observa un patrón que favorece a los pacientes con MDSCs^{low}. Datos no mostrados indican que altos niveles de MDSCs en los pacientes se reflejan una peor respuesta al tratamiento, según el factor de riesgo relativo de 0.94 en pacientes con altas frecuencias de MDSCs y enfermedad estable (Figura 6).

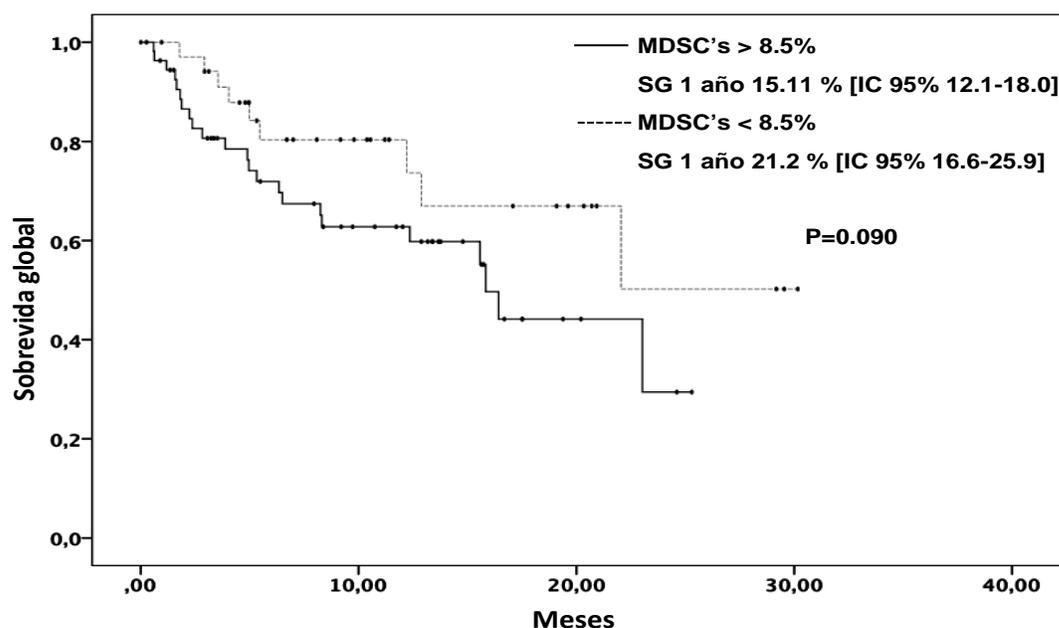


Figura 6.- Sobrevida global a 1 año en pacientes con CPNM en relación con la frecuencia de MDSCs

Sobrevida en pacientes con baja expresión de CD3 ζ en poblaciones linfocitarias.

El análisis sobre la IMF de CD3 ζ en el grupo de pacientes muestra que aquellos con poblaciones CD4⁺CD3 ζ ^{+hi} y CD8⁺CD3 ζ ^{+hi} presentan sobrevida significativamente mayor que aquellos con CD3 ζ ^{+low} (Figura 7).

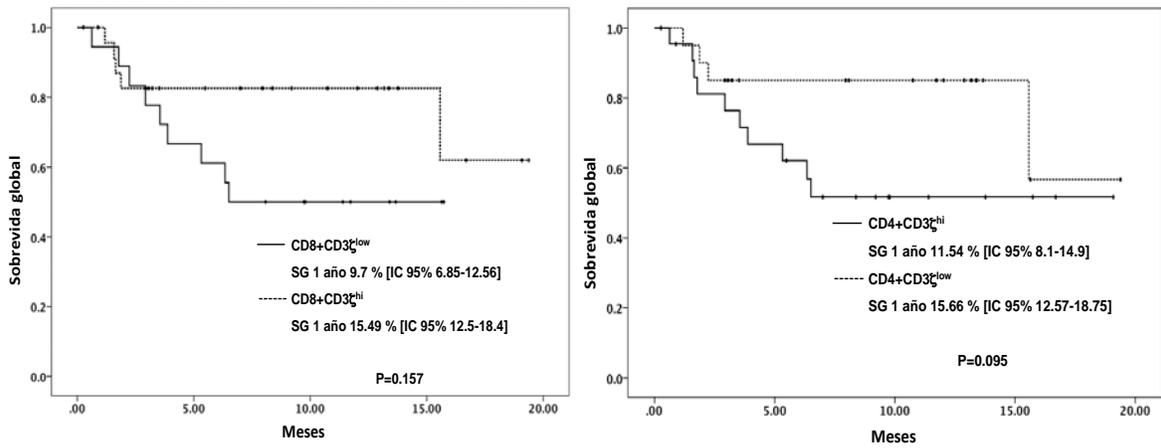


Figura 7. Sobrevivida global a 1 año en pacientes con expresión alta y baja de la cadena CD3 ζ en linfocitos citotóxicos y colaboradores.

5.6. Cuantificación de las citocinas IL-10, IL-6, IL-17A, IL-1 β e INF- γ

La cuantificación de las citocinas mostró un incremento significativo en los niveles de interleucina 10 ($p < 0.0027$), IL-6 ($p < 0.0001$), IL-17 ($p < 0.0001$), IL-1 β (ns) en muestras de pacientes con adenocarcinoma pulmonar con respecto a los sujetos control, en comparación con la citocina INF- γ ($p < 0.0001$) que mostró una disminución significativa (Figura 8).

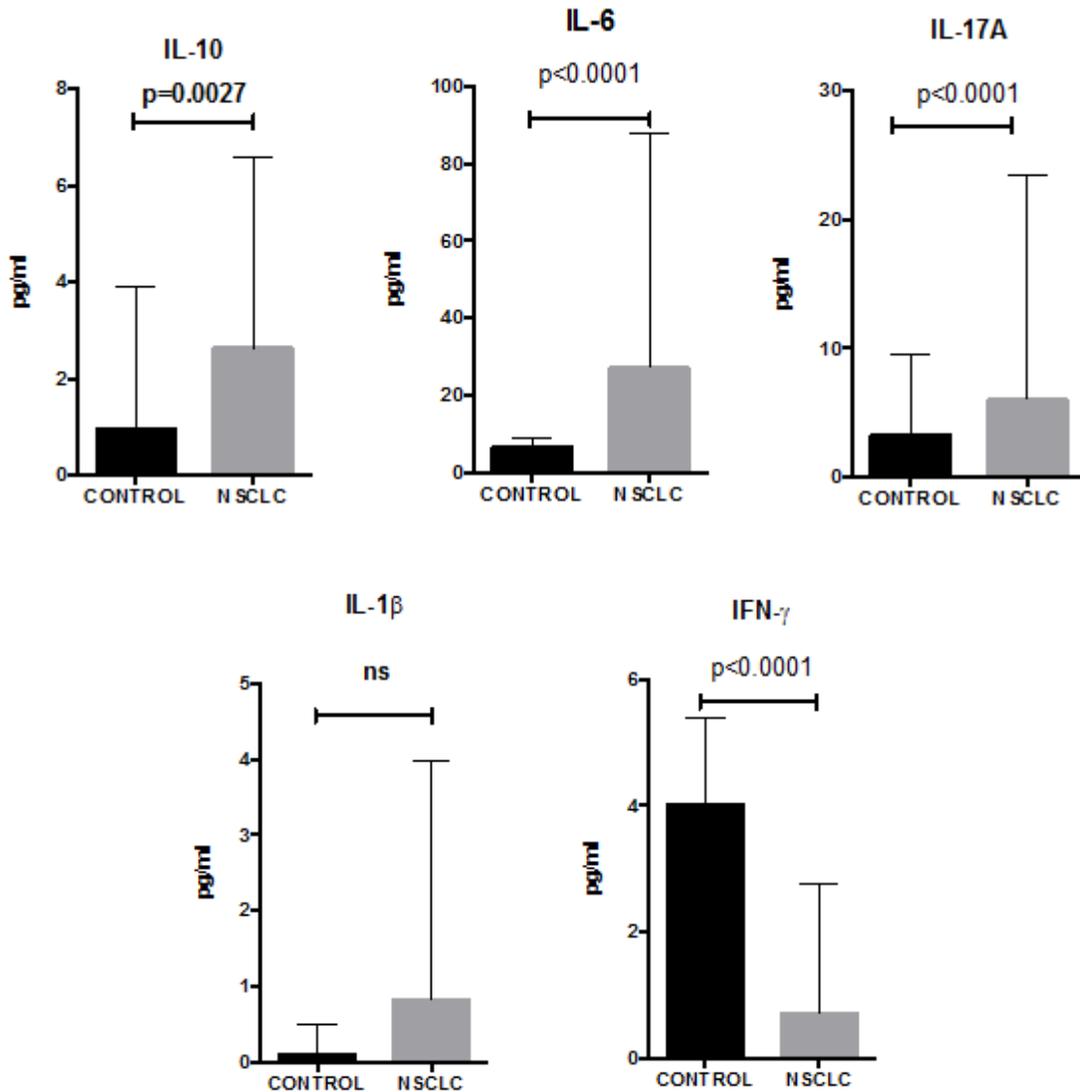


Figura 8.- Cuantificación de las citocinas en muestras de pacientes con adenocarcinoma pulmonar mostro un incremento significativo en los niveles de interleucina 10 ($p < 0.0027$), IL-6 ($p < 0.0001$), IL-17 ($p < 0.0001$), IL-1 β (ns) con respecto a los sujetos control, en comparación con la citocina INF- γ ($p < 0.0001$) que mostró una disminución significativa.

5.7. Cuantificación de TGF- β por ELISA.

La cuantificación del TGF- β ($p < 0.0001$) por ELISA mostró un incremento significativo en muestras de pacientes con adenocarcinoma pulmonar comparada con los sujetos control (Figura 9).

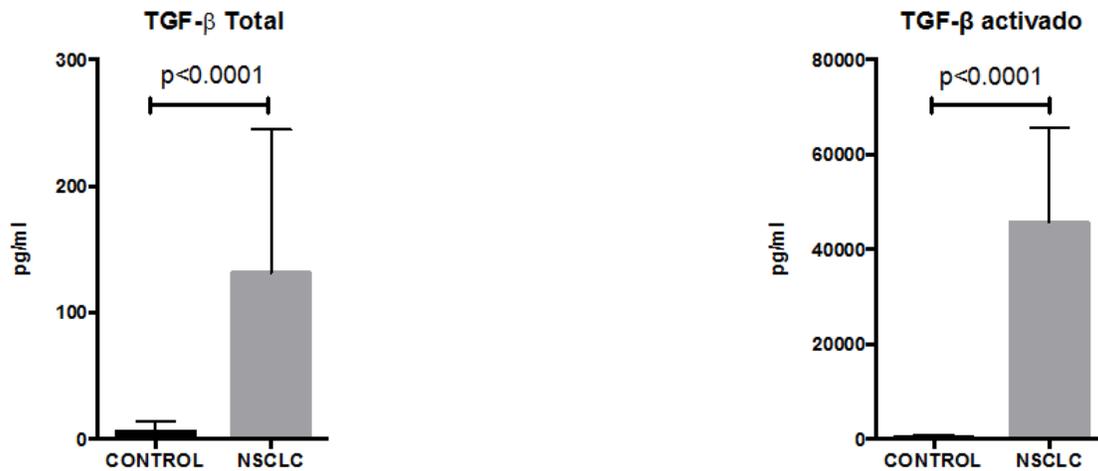


Figura 9.- Cuantificación del TGF- β ($p < 0.0001$) en muestras de pacientes con adenocarcinoma pulmonar mostró un incremento significativo con respecto a los sujetos control.

VI. DISCUSION

Las Células Supresoras de Origen Mieloide han sido observadas y asociadas al cáncer desde la década de los 80s, ya que los efectos causados por su exacerbada activación y expansión, así como su inminente empleo como biomarcadores, las convierten en constante objeto de estudio (91).

Anteriormente llamadas células mieloides inmaduras, células mieloides supresoras, entre otras, en 2007 se designa el nombre de Células Supresoras de Origen Mieloide (MDSCs), las cuales han demostrado ser una población que actúa en un estado indiferenciado y tiene la capacidad de suprimir la respuesta inmune mediante mecanismos que siguen siendo descritos en la actualidad.

Algunos aspectos biológicos propios de las células supresoras de origen mieloides, como la plasticidad de su diferenciación, los elementos genéticos y epigenéticos que determinan su actividad, la medida en que cada fracción de MDSCs ejerce su efecto, la especificidad con que lo ejerce, su participación en la carcinogénesis y sus funciones en órganos específicos, entre otros, siguen siendo investigados por diversos grupos en todo el mundo. Sin embargo sus niveles incrementados en sangre periférica y su relación con el avance de la enfermedad (14) han propiciado que estas subpoblaciones sean empleadas como biomarcador de sobrevida, pronóstico, respuesta al tratamiento, carga tumoral entre otros (52).

Los principales efectos inmunosupresores que ejercen las MDSCs sobre las poblaciones inmunes maduras han sido atribuidos a los efectos producidos por la sobreexpresión de las enzimas arginasa-1 y Oxido Nitrico Sintasa. Así, en la actualidad se han identificado diversos mecanismos con los que cuentan estas células para ejercer su efecto inmunosupresor dentro de los que destacan: el agotamiento de aminoácidos esenciales para el funcionamiento del sistema inmune, la generación de estrés oxidativo y el daño a diversas moléculas esenciales para el funcionamiento de las células T, promoviendo principalmente la falta de expansión, proliferación, reclutamiento y circulación a ganglios linfáticos, induciendo apoptosis, anergia y senescencia. Se ha demostrado también que inducen la expansión de linfocitos T reguladores y que su diferenciación en el tumor da origen a poblaciones mieloides supresoras con efectos más potentes (10).

Respecto al cáncer pulmonar se ha descrito que poblaciones con fenotipo supresor están

presentes de manera incrementada en sitios del tumor y en sangre periférica de portadores de tumores en el cáncer de pulmón de células no pequeñas (90). Si bien no se han llevado a cabo estudios que correlacionen con precisión las diferencias que existen entre la enfermedad y el avance del estadio en el cáncer pulmonar no microcítico, observaciones en otros tipos de cáncer (14), pueden sugerir que los niveles de MDSCs se incrementan conforme avanza la enfermedad (98, 153)

En humanos, se ha detectado un incremento en el número de las MDSC de hasta 10 veces en sangre de pacientes con diferentes tipos de cáncer (33-36). En estadios avanzados de cáncer renal se observó la acumulación de estas células en sangre periférica, mientras que la remoción quirúrgica del tumor reduce marcadamente el número de estas células inmaduras (38). Además, en pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de mama y en cáncer pulmonar de células no pequeñas se observó un número inusualmente alto de células mieloides de fenotipo granulocítico CD11b⁺ CD14⁻ CD15⁺ CD33⁺ en circulación. Estas células activadas fueron capaces de inhibir la producción de citocinas por parte de los linfocitos T (90, 13). Así mismo, estos niveles elevados de MDSC se asociaron con niveles disminuidos de células T CD8⁺ favoreciendo aún más el efecto pro-tumoral.

El presente estudio demostró un incremento en la frecuencia de la población con fenotipo supresor CD66b⁺CD11b⁺CD15⁺CD14⁻HLADR⁻ en las PBMCs de pacientes con adenocarcinoma pulmonar en estadio avanzado de la enfermedad. Estas poblaciones celulares de tipo granulocítico tienen efectos relevantes durante el desarrollo de diversos tipos de tumores y participan en la angiogenesis tumoral y la metástasis. Esto es debido a su capacidad de infiltrar continuamente el tumor y al efecto de supresión antígeno-específica que pueden ejercer sobre los linfocitos T vírgenes y/o diferencialmente inmaduros, cuando éstas vuelven al torrente sanguíneo y a los órganos linfáticos (11). Además, esta subpoblación se asocia fuertemente a potentes efectos inmunosupresores en paciente con cáncer renal (89), lo que sugiere que en cáncer pulmonar también pueden llevar a cabo su papel inmunosupresor y colaborar con otras poblaciones supresoras que faciliten el escape del tumor de la eliminación por el sistema inmune.

Así mismo, su participación puede afectar la respuesta de las poblaciones inmunes efectoras. En ese sentido, en las poblaciones linfocitarias presentes en los pacientes con adenocarcinoma pulmonar, la disminución en la frecuencia de las subpoblaciones circulantes CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺, pueden sugerir una supresión en la proliferación y funcionalidad de dichas subpoblaciones. Los linfocitos T también pueden

estar sujetos a un estado de anergia y falta de reclutamiento al sitio del tumor. Estos defectos en la actividad de los linfocitos han sido observados con anterioridad en cáncer pulmonar, demostrando que subpoblaciones especializadas en la destrucción de células cancerosas, no llevan a cabo sus funciones (90). Se ha observado en distintos tipos de cáncer que niveles adecuados de linfocitos T citotóxicos infiltrados en el tumor, se asocia con pronósticos buenos de sobrevida, respuesta al tratamiento y retraso en la remisión de la enfermedad (90).

Adicionalmente, la disminución en la expresión de la cadena ζ del receptor CD3 en la población de linfocitos T totales y en las subpoblaciones citotóxicas y colaboradoras que se observó en el presente estudio confirma que la ausencia de dicha cadena puede afectar el reconocimiento de células tumorales (73). Además, esta cadena se expresa bajo condiciones apropiadas de proliferación y su ausencia es un indicativo de anergia celular. Al disminuir los niveles de expresión de dicha cadena, las células T quedan potencialmente inactivadas para la destrucción del tumor, por lo cual la disminución en la expresión de la cadena ζ es un factor asociado con menor sobrevida y mal pronóstico en pacientes con diferentes tipos de cáncer como es el caso del carcinomas de cabeza y cuello, ovario, oral y melanoma (117), sugiriendo que la pérdida de dicha cadena conduce a un deterioro de la inmunidad.

Por otro lado, las MDSCs constituyen una población que actúa en un estado indiferenciado y tiene la capacidad de suprimir la respuesta inmune mediante diversos mecanismos. Esta respuesta inmune en el microambiente tumoral es un factor determinante en la progresión y agresividad del tumor. Aparentemente, varios factores derivados del tumor producidos por diferentes tipos de células tumorales, favorecen la expansión del subconjunto de las MDSCs (10). Diversos reportes han demostrado que la expansión, migración y activación de las MDSCs involucran diversos mediadores de la inflamación crónica como los factores de crecimiento (GM-CSF, G-CSF, M-CSF, VEGF y TGF- β) y diversas interleucinas como IL-6, IL-10, IL-12 e IL-13, INF- γ y TNF- α . Con respecto a la Interleucina-6 observamos un incremento significativo en pacientes con adenocarcinoma pulmonar comparada con sujetos control, estos niveles elevados de IL-6 se correlacionaron con una alta frecuencia de MDSCs (137). La sobreexpresión de IL-6 favorece la generación, migración y la actividad de MDSCs a través de STAT3. Además, se ha encontrado que IL-6 desempeña un importante papel en diversos mecanismos como en la migración celular, el desarrollo de tumores malignos (157), proliferación, apoptosis, (158) así como en la progresión, (159) diferenciación y angiogénesis de las

células tumorales (160) Por ejemplo IL-6 favorece el crecimiento tumoral inhibiendo la apoptosis de las células cancerosas e induce la angiogénesis tumoral que contribuye a la proliferación de las células de cáncer colorrectal y de otros tipos de cáncer, especialmente en etapas avanzadas (161). También se ha demostrado que mejora la migración de las células endoteliales (162), un paso clave en la angiogénesis y difusión de los tumores sólidos. Así mismo, se ha demostrado en estudios clínicos que un incremento en la concentración de IL-6 en suero de pacientes con diferentes tipos de cáncer por ejemplo mieloma múltiple (MM) (163-165), cáncer de endometrio (166), cáncer de pulmón de células no pequeñas, (167) carcinoma de células renales (168), cáncer cervico-uterino (169) cáncer de mama (170, 171) y el carcinoma de ovario (172, 173), se asocia con etapas avanzadas, un pobre resultado clínico (174-176) y una corta supervivencia. También, esta concentración sérica de IL-6 en pacientes con cáncer, está asociado con la progresión, grado histológico, invasión de la pared intestinal (177-179), así como del tamaño del tumor y los cortos períodos de supervivencia en el cáncer colorrectal.

Por otro lado, los linfocitos de sangre periférica en NSCLC producen altas cantidades de IL-10 pero bajas cantidades de IFN- γ . Esto es de gran importancia ya que la IL-10 parece mediar la resistencia de las células tumorales a la muerte mediada por los linfocitos T citotóxicos (137). Además, esta expresión de IL-10 se asocia con un mal pronóstico en pacientes con NSCLC y nuestros resultados demuestran un incremento significativo en muestras de pacientes con adenocarcinoma pulmonar con respecto a los sujetos sanos.

La IL-10 es considerada como una citocina anti-inflamatoria e inmunosupresora que favorece el escape inmune porque inhibe la actividad antitumoral de los macrófagos infiltrantes de tumor, así como la citotoxicidad de las células T tumor-específicas y bloquea la presentación de antígenos asociados al tumor por las células presentadoras de antígeno (180, 181). También se ha demostrado que la IL-10 secretada por las células inmunes se asocia con la progresión de neoplasias por ejemplo en linfomas de células B, linfomas no Hodgkin de células T, mieloma, así como del cáncer de mama, pulmón, gástrico, colorrectal y carcinoma de próstata (180). Se han observado también niveles elevados de IL-10 en sangre periférica y en el tejido tumoral de pacientes con cáncer de pulmón en estadio avanzado (182).

Las MDSC además de suprimir directamente a las células T también dañan la inmunidad innata por la interacción con los macrófagos, regulando negativamente la producción de IL-12 (69). Los macrófagos inducen en las MDSC la producción de citocinas tipo 2 mediante la producción de IL-10. Además se sabe que los niveles elevados de esta

citocina interfiere con la maduración de las células dendríticas (DCs) ya que las MDSCs secretan altos niveles de IL-10 que pueden bloquear indirectamente la función de las DCs (69). Esta interacción entre las MDSCs y los macrófagos, polariza macrófagos de tipo M1 hacia un fenotipo M2, estableciendo un microambiente que probablemente interfiere con la inmunidad de las células T CD4 y CD8. Como resultado, las MDSCs a través de su interacción con los macrófagos, suprimen tanto la inmunidad antitumoral adaptativa e innata, y facilitan el crecimiento del tumor (69).

Sin embargo, aunque la contribución de IL-10 para evadir la respuesta inmune por las células malignas ha sido ampliamente estudiado, el papel de la IL-10 en la tumorigénesis sigue siendo controvertida. Se ha demostrado que IL-10 juega un papel tanto oncogénico como oncosupresor en los cánceres humanos asociados a virus (181, 183).

Por ejemplo, IL-10 puede inhibir la activación de NF- κ B y obstaculizar la angiogénesis dentro del microambiente del tumor. La IL-10 también puede activar a STAT3 el cual juega un papel clave en la proliferación celular y la supervivencia y por lo tanto ayuda a promover el desarrollo de tumores, (181-184). Así, el papel de IL-10 en el desarrollo del cáncer, ya sea anti-tumoral, previniendo la inflamación y la angiogénesis tumoral, o pro-tumoral, estimulando la supervivencia celular y la supresión de las células T efectoras, puede depender de las condiciones de la carcinogénesis inicial, así como de la presencia de otras células, como de las células T reguladoras (185).

En nuestros resultados, el IFN- γ se encontró disminuido en muestras de pacientes con adenocarcinoma pulmonar comparada con sujetos control. El IFN- γ es una citocina que ejerce potentes efectos anti-tumorales en cáncer de pulmón y metástasis, aumentando la actividad de las células NK. Induce la activación de los macrófagos y la presentación de antígeno. Activa a las células T CD8 + y favorece la activación y diferenciación de células T CD4 + Th1 cooperadoras. Por otro lado, varios estudios han demostrado que las MDSC inhiben la citotoxicidad de las células NK contra las células tumorales, bloqueando la producción de IFN- γ que se requiere para el contacto célula-célula. Esta supresión es mediada por el bloqueo en la expresión de NKG2D, un receptor de las células NK que se requiere para su activación (186). Sin embargo, el papel de MDSC en regular la función de las células NK no está bien establecido.

Además, la actividad funcional de las MDSC se manifiesta a través de su capacidad de inhibir la producción de interferón gamma producida por linfocitos T CD8⁺ en respuesta a péptidos provenientes de antígenos tumorales presentados en la superficie de las MDSC (16). Este efecto depende de la expresión de MHC-I por las MDSC y no es mediado por

factores solubles sino que requiere del contacto célula-célula. Por otro lado, varios estudios han informado que la activación de arginasa 1 está asociada con la producción de H₂O₂ por las MDSCs, que presentan los epitopes restringidos de clase I directamente a las células T CD8+ e inhiben la liberación de IFN- γ a través de la producción de H₂O₂ dependiente del contacto (187). Así mismo la interleucina-10 también puede inhibir la liberación de IFN- γ que es el principal factor que estimula la diferenciación de las células T virgen, para promover la evasión inmune (188).

Con respecto a la Interleucina 17A, estudios actuales sugieren que favorece el desarrollo de tumores promoviendo un microambiente tumoral en pacientes con NSCLC y recientemente se ha identificado como un indicador importante de baja supervivencia en estos pacientes y nuestros resultados demuestran un incremento significativo en pacientes con adenocarcinoma pulmonar con respecto a sujetos control.

Recientemente, se ha demostrado que de acuerdo con esta función pro-tumoral de IL-17A en NSCLC, esta citocina también atrae a los macrófagos a través de la señalización de IL-17RA/RC lo que sugiere que estimula la expansión de los macrófagos en el microambiente local de los pulmones (189). Además, la expresión de IL-17 puede estar regulada por el factor de transcripción STAT3, activando un proto-oncogen por la señalización de IL-6 que promueve la supervivencia de las células tumorales, proliferación y angiogénesis (145)

Así mismo, se ha demostrado que la IL-6 induce la estimulación de las células tumorales mediante la inducción de la producción de la IL-17A lo que sugiere que esta citocina puede expandir las capacidades proliferativas de las células tumorales en el cáncer de pulmón a través del eje IL-6/STAT3 creando así un circuito de retroalimentación IL-6/IL-17 que impulsa la proliferación de células tumorales (137). Así mismo las células tumorales en pacientes con NSCLC reclutan TAM al sitio del tumor a través de la secreción de IL-17 (137).

Por otro lado, la evidencia sugiere que la supresión mediada por MDSC en el sitio del tumores diferente a lo que ocurre en la periferia. Por ello, las MDSCs migran activamente al sitio del tumor, en donde sobre-regulan la expresión de factores inmunosupresores y se diferencian rápidamente a macrófagos asociados a tumor (TAMs) (11).

Además los TAMs producen varias citocinas inmunosupresoras como la interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-10 y factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) que inhiben a las células inmunes anti-tumorales como las células Th1 y CD8+ en los tejidos cancerígenos, facilitando aún más la progresión del cáncer. Nuestros resultados demuestran un

incremento significativo de IL-1 β en pacientes con adenocarcinoma pulmonar con respecto a los sujetos sanos. En ese sentido, la producción de IL-1 β en el sitio del tumor está implicada en la generación de MDSC en la médula ósea (190, 191) y en su migración hacia las lesiones tumorales (192). Por otra parte, la IL-1 β puede inducir la expresión de COX-2 (193) que, junto con PGE2 es capaz de impedir la maduración y función de las células presentadoras de antígeno en el sitio del tumor, favoreciendo de este modo una acumulación de MDSCs y TAM que promueven la progresión tumoral (194, 195). Además, se ha reportado que la IL-1 β estimula la producción de IL-10 por MDSC y está asociada con niveles elevados de IL-5 e IL-13 (191), que inducen un fenotipo Th2 que atrae a las MDSCs al sitio del tumor. También se ha reportado que IL-1 β sobre-regula los niveles de TNF- α en el microambiente tumoral, induciendo la producción de células mieloide y/o tumorales (137).

Por último, se sabe que las células tumorales expresan algunas citocinas tipo Th2 como IL-5 y citocinas inmunosupresoras como TGF- β e IL-10 mientras que poco o ningún nivel de citocinas tipo Th1 como IL-2 e INF- γ . En ese sentido, en nuestros resultados se observó un incremento significativo de TGF- β en muestras de pacientes con adenocarcinoma comparado con sujetos sanos, esta citocina inmunosupresora derivada del tumor que regula la acumulación de MDSC, promueve la polarización hacia neutrófilos supresores (196) y juega un papel indispensable, pero complejo, en la carcinogénesis y en la progresión de los tumores (29, 30). Es un importante inmunosupresor tanto de la respuesta inmune innata como adaptativa. En la respuesta inmune innata, el TGF- β promueve la polarización de macrófagos asociados a tumores a un fenotipo M2 pro-tumoral, que promueve a su vez la producción de TGF- β intensificando la inmunosupresión (185). También inhibe la actividad citotóxica de las células NK que expresan el receptor NKG2D de activación, lo que resulta en una pobre respuesta antitumoral. Además, el TGF- β disminuye la migración e incrementa la apoptosis de las células dendríticas (DCs), disminuyendo la presentación de antígenos. En la respuesta inmune adaptativa, el TGF- β promueve la diferenciación de las células T CD4 + en células Th2, que promueve una respuesta inmune antitumoral menos eficiente. Sin embargo, el efecto final del TGF- β en las células inmunes depende en gran medida del microambiente y de la presencia de otras citocinas y factores (185). Por ejemplo, el TGF- β suprime la producción del IFN- γ por las células Th1 y T CD8 + así mismo, también promueve la generación de Foxp3 + T reguladoras y la diferenciación de las células Th17,

que probablemente en conjunto favorecen el crecimiento y la progresión del cáncer. Pero por otro lado es también un potente inhibidor de la activación de los macrófagos y disminuye la producción de citocinas inflamatorias como IL-6, TNF e IL-1 β , que pueden impedir el desarrollo del cáncer asociado con la inflamación.

VII. CONCLUSIONES

La subpoblación supresora de origen mieloide con fenotipo CD66b⁺ CD11b⁺ CD15⁺ CD14⁻ HLADR⁻ se encontró incrementada en aproximadamente 10 veces su frecuencia en pacientes con adenocarcinoma pulmonar libres de tratamiento.

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

La expresión porcentual de la cadena ζ en las subpoblaciones CD3⁺CD3 ζ ⁺, CD3⁺CD4⁺CD3 ζ ⁺ y CD3⁺CD8⁺CD3 ζ ⁺ no mostró diferencias significativas, sin embargo, la intensidad media de fluorescencia analizada en las mismas subpoblaciones, mostró una disminución significativa en sujetos con adenocarcinoma comparados con sujetos control. La disminución en la intensidad media de fluorescencia puede indicar una disminución en la densidad de la expresión de la cadena ζ del receptor CD3, lo que sugiere una potencial inactivación de las señales de proliferación al interior de los linfocitos T y un inadecuado reconocimiento antigénico de células tumorales.

Por otro lado, se encontró un incremento significativo en los niveles de interleucina 10, IL-6, IL-17A, IL-1 β y TGF- β en muestras de pacientes con adenocarcinoma pulmonar con respecto a los sujetos control, en comparación con la citocina INF- γ que mostro una disminución significativa.

VIII. LITERATURA CITADA

1. Loeb Lawrence and Harris Curtis C., . *Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective*. Cancer Res. 2008;68:6863-6872
2. Wood Steven L., Pernemalm Maria., et al., *The role of the tumor microenvironment in lung cancer-metastasis and its relationship to potential therapeutic targets*. Cancer Treatment Reviews, 2014 May;40(4):558-66.
3. Cerecedo-Zapata C, Limón D, Gonzaga R, et al. *Oncología clínica, genómica y epigenómica en cáncer broncogénico: Parte I*. Rev Inst Nal Enf Resp Mex, 2009; 22(43): 217-229.
4. Goldstraw, P., et al., *The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revisión of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours*. Journal of thoracic oncology: oficial publication of the International Association for the Study of Lung Cancer, 2007. 2 (8): p. 706-14
5. Hecht SS. *Tobacco carcinogens, their biomarker and tobacco-induced cancer*. Nat Rev Cancer, 2003; 10:733-44
6. Swauger JE, Steichen TJ, Murphy PA, Kinsler S. *An analysis of the mainstream smoke chemistry of sample of the U.S. cigarette market acquired between 1995 and 2000*. Regul Toxicol Pharmacol, 2002 35;142-56
7. Hanahan, D. and Weinberg R.A., *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. 144(5): p. 646-74.
8. Mougiakakos, D., et al., *Regulatory T cells in cancer*. Adv Cancer Res, 2010. 107: p. 57-117.
9. Kusmartsev, S. and D.I. Gabrilovich, *STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion*. J Immunol, 2005. 174(8): p. 4880-91.
10. Gabrilovich, D.I., S. Ostrand-Rosenberg, and V. Bronte, *Coordinated regulation of myeloid cells by tumours*. Nat Rev Immunol, 2012. 12(4): p. 253-68.
11. Gabrilovich, D.I. and S. Nagaraj, *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*. Nat Rev Immunol, 2009. 9(3): p. 162-74.
12. Gabrilovich DI, Velders M, Sotomayor E, Kast WM. *Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells*. J Immunol, 2001; 166: 5398-406.
13. Almand, B., et al., *Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer*. Journal of immunology, 2001. 166(1): p. 678-89.
14. Diaz-Montero, C.M., et al., *Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy*. Cancer immunology, immunotherapy : CII, 2009. 58(1): p. 49-59.
15. Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V., et al., *Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer*. Nat. Med, 2007; 13:828–835.
16. Brito C, Naviliat M., et al., *Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death*. J. Immunol, 1999; 162:3356– 3366.
17. Nagaraj S, Schrum AG., et al., *Mechanism of T cell tolerance induced by myeloid-derived suppressor cells*. J. Immunol, 2010; 184:3106–3116.
18. Ngozi R. Monu and Alan B. Frey. *Myeloid-Derived Suppressor Cells and anti-tumor T cells: a complex relationship*. Immunol Invest. 2012 ; 41(0): 595–613.
19. Von Bernstoff W, Voss M, Freichel S., et al., *Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients*. Clin Cancer Res 7: S925-S932, 2001.
20. Whiteside TL. *Signaling defects in T lymphocytes of patients with malignancy*. Cancer Immunol Immunother, 1999;48:346–52.
21. Lidia Ciszak, Agata Kosmaczewska., et al., *Impaired zchain expression and IFN-g production in peripheral blood T and NK cells of patients with advanced lung cáncer*. Oncology reports 21: 173-184, 2009
22. Vesely Matthew D, Kershaw Michael H., et al., *Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer*. Annu Rev Immunol. 2011;29:235-71
23. Swann JB1, Smyth MJ. Smyth. *Immune surveillance of tumors*. J Clin Invest, 2007 May;117(5):1137-46.

24. Croce, C.M., *Oncogenes and cancer*. N Engl J Med, 2008. 358(5): p. 502-11.
25. Herbst, R.S., J.V. Heymach, and S.M. Lippman, *Lung cancer*. N Engl J Med, 2008. 359(13): p. 1367- 80.
26. Bindea, G., et al., *Natural immunity to cancer in humans*. Curr Opin Immunol, 2010. 22(2): p. 215- 22.
27. Ferrone, C. and G. Dranoff., *Dual roles for immunity in gastrointestinal cancers*. J Clin Oncol, 2010. 28(26): p. 4045-51.
28. Nelson, B.H., *The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes*. Immunol Rev, 2008. 222: p. 101-16.
29. Pages, F., et al., *Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored*. Oncogene, 2010. 29(8): p. 1093-102.
30. Yang, L., Y. Pang, and H.L. Moses, *TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression*. Trends Immunol, 2010. 31(6): p. 220-7.
31. Shields, J.D., et al., *Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21*. Science, 2010. 328(5979): p. 749-52.
32. Mougialakos, D., et al., *Regulatory T cells in cancer*. Adv Cancer Res, 2010. 107: p. 57-117.
33. Finn, O.J., *Cancer immunology*. N Engl J Med, 2008. 358(25): p. 2704-15.
34. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. International journal of cancer., 2010. 127((12)): p. 2893-917.
35. Travis WD, B.E., Müller-Hermelink HK, Harris and CC., (Eds.): *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. IARC Press:Lyon 2004.
36. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2012. 62(1): p. 10-29.
37. Oscar Arrieta, Enrique Guzmán-de Alba, Luis Felipe Alba-López., et al., *Consenso nacional de diagnóstico y tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas*. Revista de Investigación Clínica Vol. 65, Supl. 1 Marzo, 2013 pp s5-s84
38. Beelen R, Hoek G, van den Brandt PA, Goldbohm RA, Fischer P, Schouten LJ, et al. *Long-term exposure to traffic-related air pollution and lung cancer risk*. Epidemiology 2008; 19(5): 702-10.
39. Khuder, S.A., *Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis*. Lung Cancer, 2001. 31(2-3): p. 139-48.
40. Carrión Valero F, H.H.J., *El tabaquismo pasivo en adultos*. Arch Bronconeumol, 2002. 38: p. 137- 46.
41. Sun S, S.J., Gazdar AF, *Lung cancer in never smokers: a different disease*. Nat Rev Cancer, 2007. 7: p. 778-790.
42. Alberg, A.J. and J.M. Samet, *Epidemiology of lung cancer*. Chest, 2003. 123(1 Suppl): p. 21S-49S.
43. Maggiore, C., et al., *Histological classification of lung cancer*. Rays, 2004. 29(4): p. 353-5.
44. Langer CJ, Besse B, Gualberto A, Brambilla E, Soria JC. *The evolving role of histology in the management of advanced non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol 2010;28:5311–20.
45. Travis WD, B.E., Müller-Hermelink HK, Harris CC. , *Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart, ed. E.W.H.O.C.o. Tumours*. Press: Lyon . 2004: IARC.
46. Groome, P.A., et al., *The IASLC Lung Cancer Staging Project: validation of the proposals for revision of the T, N, and M descriptors and consequent stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours*. J Thorac Oncol, 2007. 2(8): p. 694-705.
47. Rusch, V.W., et al., *The IASLC lung cancer staging project: a proposal for a new international lymph node map in the forthcoming seventh edition of the TNM classification for lung cancer*. J Thorac Oncol, 2009. 4(5): p. 568-77.
48. Pages, F., et al., *Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer*. N Engl J Med, 2005. 353(25): p. 2654-66.
49. Zhang, L., et al., *Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer*. N Engl J Med, 2003. 348(3): p. 203-13.
50. Kowanzet, M., et al., *Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung metastasis through mobilization of Ly6G+Ly6C+ granulocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(50): p. 21248-55.
51. Pinzon-Charry, A., T. Maxwell, and J.A. Lopez, *Dendritic cell dysfunction in cancer: a*

- mechanism for immunosuppression.* Immunol Cell Biol, 2005. 83(5): p. 451-61.
52. Suzuki, K., et al., *Prognostic immune markers in non-small cell lung cancer.* Clin Cancer Res, 2011. 17(16): p. 5247-56.
53. Kataki, A., et al., *Tumor infiltrating lymphocytes and macrophages have a potential dual role in lung cancer by supporting both host-defense and tumor progression.* J Lab Clin Med, 2002. 140(5): p. 320-8.
54. Mori, M., et al., *Infiltration of CD8+ T cells in non-small cell lung cancer is associated with dedifferentiation of cancer cells, but not with prognosis.* Tohoku J Exp Med, 2000. 191(2): p. 113-118.
55. Trojan, A., et al., *Immune activation status of CD8+ T cells infiltrating non-small cell lung cancer.* Lung Cancer, 2004. 44(2): p. 143-7.
56. Shortman, K. and W.R. Heath, *The CD8+ dendritic cell subset.* Immunol Rev, 2010. 234(1): p. 18-31.
57. Swiecki, M. and M. Colonna, *Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance.* Immunol Rev, 2010. 234(1): p. 142-62.
58. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation.* Nat Rev Immunol, 2008. 8(12): p. 958-69.
59. Mantovani, A., et al., *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes.* Trends Immunol, 2002. 23(11): p. 549-55.
60. Coussens, L.M. and J.W. Pollard, *Leukocytes in mammary development and cancer.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. 3(3).
61. Qian, B.Z. and J.W. Pollard, *Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis.* Cell, 2010. 141(1): p. 39-51.
62. Murdoch, C., et al., *The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis.* Nat Rev Cancer, 2008. 8(8): p. 618-31.
63. Gabrilovich, D., *Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects.* Nat Rev Immunol, 2004. 4(12): p. 941-52.
64. Perrot, I., et al., *Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage.* J Immunol, 2007. 178(5): p. 2763-9.
65. Pinzon-Charry, A., et al., *Numerical and functional defects of blood dendritic cells in early- and late-stage breast cancer.* Br J Cancer, 2007. 97(9): p. 1251-9.
66. Bellone, G., et al., *Cooperative induction of a tolerogenic dendritic cell phenotype by cytokines secreted by pancreatic carcinoma cells.* J Immunol, 2006. 177(5): p. 3448-60.
67. Norian, L.A., et al., *Tumor-infiltrating regulatory dendritic cells inhibit CD8+ T cell function via L-arginine metabolism.* Cancer Res, 2009. 69(7): p. 3086-94.
68. Watkins, S.K., et al., *FOXO3 programs tumor-associated DCs to become tolerogenic in human and murine prostate cancer.* J Clin Invest, 2011. 121(4): p. 1361-72.
69. Pratima Sinha, Virginia K. Clements, et al., *Cross-Talk between Myeloid-Derived Suppressor Cells and Macrophages Subverts Tumor Immunity toward a Type 2 Response.* J Immunol 2007; 179:977-983
70. Mantovani, A. and A. Sica, *Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity.* Curr Opin Immunol, 2010. 22(2): p. 231-7.
71. Steidl, C., et al., *Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma.* N Engl J Med, 2010. 362(10): p. 875-85
72. Qian, B., et al., *A distinct macrophage population mediates metastatic breast cancer cell extravasation, establishment and growth.* PLoS One, 2009. 4(8): p. e6562.
73. Rodriguez, P.C., et al., *Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses.* Cancer Res, 2004. 64(16): p. 5839-49.
74. Movahedi, K., et al., *Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes.* Cancer Res, 2010. 70(14): p. 5728-39.
75. Pages, F., et al., *Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored.* Oncogene, 2010. 29(8): p. 1093-102.
76. Nozawa, H., C. Chiu, and D. Hanahan, *Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(33): p. 12493-8.

77. Houghton, A.M., et al., Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. *Nat Med*, 2010. 16(2): p. 219-23.
78. Fridlender, Z.G., et al., Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*, 2009. 16(3): p. 183-94.
79. Sica, A. and V. Bronte, Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest*, 2007. 117(5): p. 1155-66.
80. Marigo, I., et al., Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBPbeta transcription factor. *Immunity*, 2010. 32(6): p. 790-802.
81. Gallina, G., et al., Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *J Clin Invest*, 2006. 116(10): p. 2777-90.
82. Nefedova, Y., et al., Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. *J Immunol*, 2004. 172(1): p. 464-74.
83. Poschke, I., et al., Immature immunosuppressive CD14+HLA-DR-/low cells in melanoma patients are Stat3hi and overexpress CD80, CD83, and DC-sign. *Cancer Res*, 2010. 70(11): p. 4335-45.
84. Wang, T., et al., Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med*, 2004. 10(1): p. 48-54.
85. Yu, H., D. Pardoll, and R. Jove, STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer*, 2009. 9(11): p. 798-809.
86. Cheng, P., et al., Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J Exp Med*, 2008. 205(10): p. 2235-49.
87. Movahedi, K., et al., Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood*, 2008. 111(8): p. 4233-44.
88. Kusmartsev, S. and D.I. Gabrilovich, STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion. *J Immunol*, 2005. 174(8): p. 4880-91.
89. Rodriguez, P.C., et al., Arginase I producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer Res*. 2009. 69: p. 1553-1560.
90. Liu, C.Y., et al., Population alterations of L-arginase- and inducible nitric oxide synthase-expressed CD11b+/CD14(-)/CD15+/CD33+ myeloid-derived suppressor cells and CD8+ T lymphocytes in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010. 136(1): p. 35-45.
91. Young, M.R., M. Newby, and H.T. Wepsic, Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. *Cancer Res*, 1987. 47(1): p. 100-5.
92. Gabrilovich, D.I., et al., The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res*, 2007. 67(1): p. 425; author reply 426.
93. Huang, B., et al., Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res*, 2006. 66(2): p. 1123-31.
94. Brandau, S., et al., Myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of cancer patients contain a subset of immature neutrophils with impaired migratory properties. *J Leukoc Biol*, 2011. 89(2): p. 311-7.
95. Youn, J.I., et al., Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol*, 2008. 181(8): p. 5791-802.
96. Yazan S Khaled, Basil J Ammori and Eyad Elkord, Myeloid-derived suppressor cells in cancer: recent progress and prospects *Immunology and Cell Biology* (2013), 1–10
97. Kusmartsev, S., et al., Reversal of myeloid cell-mediated immunosuppression in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(24): p. 8270-8.
98. Vuk-Pavlovic, S., et al., Immunosuppressive CD14+HLA-DRlow/- monocytes in prostate cancer. *Prostate*, 2010. 70(4): p. 443-55.
99. Wu, G. and S.M. Morris, Jr., Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J*, 1998. 336 (Pt 1): p. 1-17.
100. Bronte, V. and P. Zanovello, Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol*, 2005. 5(8): p. 641-54.
101. Bronte, V., et al., L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. *Trends Immunol*, 2003. 24(6): p. 302-6.
102. Watanabe, S., et al., *Tumor-induced CD11b+Gr-1+ myeloid cells suppress T cell sensitization*

- in tumor-draining lymph nodes*. J Immunol, 2008. 181(5): p. 3291-300.
103. Mazzoni, A., et al., Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. J Immunol, 2002. 168(2): p. 689-95
 104. Schmielau, J. and O.J. Finn, Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. Cancer Res, 2001. 61(12): p. 4756-60.
 105. Monu, N. and A.B. Frey, Suppression of proximal T cell receptor signaling and lytic function in CD8+ tumor-infiltrating T cells. Cancer Res, 2007. 67(23): p. 11447-54.
 106. Boniface JD, Poschke I, Mao Y, Kiessling R., et al., Tumor-dependent down-regulation of the ζ -chain in T-cells is detectable in early breast cancer and correlates with immune cell function. Int J Cancer 2012 Jul 1;131(1):129-39.
 107. DeFord-Watts LM, Dougall DS, Belkaya S, Johnson BA., et al., The CD3 z Subunit Contains a Phosphoinositide-Binding Motif That Is Required for the Stable Accumulation of TCR-CD3 Complex at the Immunological Synapse. J Immunol. 2011 Jun 15;186(12):6839-47.
 108. Nakagomi H, Petersson M, Magnusson I, Juhlin C, Matsuda M, Mellstedt H, Taupin J-L, Vivier E, Anderson P, Kiessling R. Decreased expression of the signal-transducing ζ chains in tumor-infiltrating T-cells and NK cells of patients with colorectal carcinoma. Cancer Res 1993;53: 5610-12.
 109. Finke JH, Zea AH, Stanley J, Longo DL, Mizoguchi H, Tubbs RR, Wiltrott RH, O'Shea JJ, Kudoh S, Klein E. Loss of T-cell receptor ζ chain and p56lck in T-cells infiltrating human renal cell carcinoma. Cancer Res 1993;53:5613-16.
 110. Zea AH, Curti BD, Longo DL, Alvord WG, Strobl SL, Mizoguchi H, Creekmore SP, O'Shea JJ, Powers GC, Urba WJ, Ochoa AC. Alterations in T cell receptor and signal transduction molecules in melanoma patients. Clin Cancer Res 1995;1:1327-35.
 111. Kono K, Rensing ME, Brandt RMP, Melief CJM, Potkul RK, Andersson B, Petersson M, Kast WM, Kiessling R. Decreased expression of signal-transducing ζ chain in peripheral T cells and natural killer cells in patients with cervical cancer. Clin Cancer Res 1996;2:1825-8.
 112. Lai P, Rabinowich H, Crowley-Nowick PA, Bell MC, Mantovani G, Whiteside TL. Alterations in expression and function of signal-transducing proteins in tumor-associated T and natural killer cells in patients with ovarian carcinoma. Clin Cancer Res 1996;2:161-73.
 113. Kurt RA, Urba WJ, Smith JW, Schoof DD. Peripheral T lymphocytes from women with breast cancer exhibit abnormal protein expression of several signaling molecules. Int J Cancer 1998; 78:16-20.
 114. Kuss I, Saito T, Johnson JT, Whiteside TL. Clinical significance of decreased ζ chain expression in peripheral blood lymphocytes of patients with head and neck cancer. Clin Cancer Res 1999;5:329-34.
 115. Matsuda M, Petersson M, Lenkei R, Taupin J-L, Magnusson I, Mellstedt H, Anderson P, Kiessling R. Alterations in the signal-transducing molecules of T cells and NK cells in colorectal tumor-infiltrating, gut mucosal and peripheral lymphocytes: correlation with the stage of the disease. Int J Cancer 1995;61:765-72.
 116. Reichert TE, Day R, Wagner EM, Whiteside TL. Absent or low expression of the ζ chain in T cells at the tumor site correlates with poor survival in patients with oral carcinoma. Cancer Res 1998;58: 5344-7.
 117. Whiteside TL. Down-regulation of ζ -chain expression in T cells: a biomarker of prognosis in cancer? Cancer Immunol Immunother 2004;53: 865-78.
 118. Frydecka I, Kaczmarek P, Bocko D, Kosmaczewska A, Morilla R, Catovsky D. Expression of signal-transducing ζ chain in peripheral blood T cells and natural killer cells in patients with Hodgkin's disease in different phases of the disease. Leuk Lymphoma 1999;35: 545-54.
 119. Bin Yu and Wei Zhang. Down-regulation of CD3 ζ is a breast cancer biomarker associated with immune suppression. Cell Biol Int. 2011 Feb;35(2):165-9.
 120. Kono K, Salazar-Onfray F, Petersson M, Hansson J, Masucci G, Wasserman K, Nakazawa T, Anderson P, Kiessling R. Hydrogen peroxide secreted by tumor-derived macrophages down-modulates signal-transducing ζ molecules and inhibits tumor-specific T cell-and natural killer cell-mediated cytotoxicity. Eur J Immunol 1996; 26:1308-13.
 121. Otsuji M, Kimura Y, Aoe T, Okamoto Y, Saito T. Oxidative stress by tumor-derived macrophages suppresses the expression of CD3 ζ chain of T cell receptor complex and antigen-

- specific T-cell responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93: 13119–24.
122. Rodriguez PC, Zea AH, DeSalvo J, Culotta KS, Zabaleta J, Quiceno DG, Ochoa JB, Ochoa AC. L- arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 f chain in T lymphocytes. *J Immunol* 2003;171:1232–9.
 123. Rodríguez Paulo C, Ochoa Augusto C. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives *Immunological Reviews* 2008 Vol. 222:180–191
 124. Fligger, J., J. Blum, and T.W. Jungi, Induction of intracellular arginase activity does not diminish the capacity of macrophages to produce nitric oxide in vitro. *Immunobiology*, 1999. 200(2): p. 169-86.
 125. Hanson, E.M., et al., Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol*, 2009. 183(2): p. 937-44.
 126. Molon, B., et al., Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *J Exp Med*, 2011. 208(10): p. 1949-62.
 127. Sakuishi, K., et al., Emerging Tim-3 functions in antimicrobial and tumor immunity. *Trends Immunol*, 2011. 32(8): p. 345-9.
 128. Li, H., et al., Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol*, 2009. 182(1): p. 240-9.
 129. Hoechst, B., et al., Myeloid derived suppressor cells inhibit natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma via the NKp30 receptor. *Hepatology*, 2009. 50(3): p. 799-807.
 130. Elkabets, M., et al., IL-1beta regulates a novel myeloid-derived suppressor cell subset that impairs NK cell development and function. *Eur J Immunol*, 2010. 40(12): p. 3347-57.
 131. Sinha, P., et al., Myeloid-derived suppressor cells express the death receptor Fas and apoptose in response to T cell-expressed FasL. *Blood*, 2011. 117(20): p. 5381-90.
 132. Corzo, C.A., et al., HIF-1alpha regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J Exp Med*, 2010. 207(11): p. 2439-53.
 133. Doedens, A.L., et al., Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha suppresses T- cell function and promotes tumor progression. *Cancer Res*, 2010. 70(19): p. 7465-75.
 134. Nagaraj, S., et al., Antigen-specific CD4(+) T cells regulate function of myeloid-derived suppressor cells in cancer via retrograde MHC class II signaling. *Cancer Res*, 2012. 72(4): p. 928-38.
 135. Haile, L.A., et al., Myeloid-derived suppressor cells in inflammatory bowel disease: a new immunoregulatory pathway. *Gastroenterology*, 2008. 135(3): p. 871-81, 881 e1-5
 136. Kusmartsev, S., S. Nagaraj, and D.I. Gabilovich, Tumor-associated CD8+ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells. *J Immunol*, 2005. 175(7): p. 4583-92.
 137. Alexandra Sevko, Viktor Umansky *Myeloid-Derived Suppressor Cells Interact with Tumors in Terms of Myelopoiesis, Tumorigenesis and Immunosuppression: Thick as Thieves Journal of Cancer* 2013, Vol. 4
 138. Hengesbach, L. & Hoag, K. Physiological concentrations of retinoic acid favor myeloid dendritic cell development over granulocyte development in cultures of bone marrow cells from mice. *J. Nutr.* 134, 2653–2659 (2004).
 139. Kuwata, T. *et al.* Vitamin A deficiency in mice causes a systemic expansion of myeloid cells. *Blood* 95, 3349–3356 (2000).
 140. Walkley, C., Yuan, Y., Chandraratna, R. & McArthur, G. Retinoic acid receptor antagonism *in vivo* expands the numbers of precursor cells during granulopoiesis. *Leukemia* 16, 1763–1772 (2002).
 141. Kusmartsev, S. *et al.* All-trans-retinoic acid eliminates immature myeloid cells from tumor-bearing mice and improves the effect of vaccination. *Cancer Res.* 63, 4441–4449 (2003).
 142. Nefedova, Y. *et al.* Mechanism of all-trans retinoic acid effect on tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 67, 11021–11028 (2007).
 143. Mirza, N. *et al.* All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients. *Cancer Res.* 66, 9299–9307 (2006).
 144. Lathers, D., Clark, J., Achille, N. & Young, M. Phase 1B study to improve immune responses in head and neck cancer patients using escalating doses of 25-hydroxyvitamin D3. *Cancer Immunol. Immunother.* 53, 422–430 (2004).
 145. Pan, P. Y. *et al.* Reversion of immune tolerance in advanced malignancy: modulation of

- myeloid-derived suppressor cell development by blockade of stem-cell factor function. *Blood* 111, 219–228 (2008).
146. Fricke, I. *et al.* Treatment of cancer patients with VEGF-Trap overcomes defects in DC differentiation but is insufficient to improve antigen-specific immune responses. *Clin. Cancer Res.* 13, 4840–4848 (2007).
147. Kusmartsev, S. *et al.* Oxidative stress regulates expression of VEGFR1 in myeloid cells: link to tumor-induced immune suppression in renal cell carcinoma. *J. Immunol.* 181, 346–353 (2008).
148. Melani, C., Sangaletti, S., Barazzetta, F. M., Werb, Z. & Colombo, M. P. Amino-biphosphonate-mediated MMP-9 inhibition breaks the tumor-bone marrow axis responsible for myeloid-derived suppressor cell expansion and macrophage infiltration in tumor stroma. *Cancer Res.* 67, 11438–11446 (2007).
149. Rodriguez, P. C. *et al.* Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *J. Exp. Med.* 202, 931–939 (2005).
150. Sinha, P., Clements, V. K., Fulton, A. M. & Ostrand-Rosenberg, S. Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 67, 4507–4513 (2007).
151. Talmadge, J. E. *et al.* Chemoprevention by cyclooxygenase-2 inhibition reduces immature myeloid suppressor cell expansion. *Int. Immunopharmacol.* 7, 140–151 (2007).
152. Zea, A. H. *et al.* Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res.* 65, 3044–3048 (2005).
153. Serafini, P. *et al.* Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *J. Exp. Med.* 203, 2691–2702 (2006).
154. De Santo, C. *et al.* Nitroaspirin corrects immune dysfunction in tumor-bearing hosts and promotes tumor eradication by cancer vaccination. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102, 4185–4190 (2005).
155. Suzuki, E., Kapoor, V., Jassar, A. S., Kaiser, L. R. & Albelda, S. M. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1⁺/CD11b⁺ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin. Cancer Res.* 11, 6713–6721 (2005).
156. Ko, H. J. *et al.* A combination of chemoimmunotherapies can efficiently break self-tolerance and induce antitumor immunity in a tolerogenic murine tumor model. *Cancer Res.* 67, 7477–7486 (2007).
157. Santer FR, Malinowska K, Culig Z, Cavarretta IT. Interleukin-6 trans-signalling differentially regulates proliferation, migration, adhesion and maspin expression in human prostate cancer cells. *Endocr-relat cancer* 2010;17:241–53.
158. Suchi K, Fujiwara H, Okamura S, Okamura H, Umehara S, Todo M, et al. Overexpression of Interleukin-6 suppresses cisplatin-induced cytotoxicity in esophageal squamous cell carcinoma cells. *Anticancer Res* 2011;31: 67–75.
159. Keller ET, Wanagat J, Ershler WB. Molecular and cellular biology of interleukin-6 and its receptor. *Front Biosci* 1996;1:d340–57.
160. Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 1993;54:1–78.
161. Brozek W, Bises G, Girsch T, Cross HS, Kaiser HE, Peterlik M. Differentiation-dependent expression and mitogenic action of interleukin-6 in human colon carcinoma cells: relevance for tumour progression. *Eur J Cancer* 2005;41:2347–54.
162. Yao JS, Zhai W, Young WL, Yang GY. Interleukin-6 triggers human cerebral endothelial cells proliferation and migration: the role for KDR and MMP-9. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;342:1396–404.
163. Fulciniti M, Hideshima T, Vermot-Desroches C, Pozzi S, Nanjappa P, Shen Z, et al. A high-affinity fully human anti-IL-6 mAb, 1339, for the treatment of multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2009;15:7144–52.
164. Shi Y, Frost PJ, Hoang BQ, Benavides A, Sharma S, Gera JF, et al. IL-6-induced stimulation of c-myc translation in multiple myeloma cells is mediated by myc internal ribosome entry site function and the RNA-binding protein, hnRNP A1. *Cancer Res* 2008;68:10215–22.
165. Lauta VM. Interleukin-6 and the network of several cytokines in multiple myeloma: an overview of clinical and experimental data. *Cytokine* 2001;16:79–86.
166. Bellone S, Watts K, Cane S, Palmieri M, Cannon MJ, Burnett A, et al. High serum levels of interleukin-6

in endometrial carcinoma are associated with uterine serous papillary histology, a highly aggressive and chemotherapy-resistant variant of endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2005;98:92–8.

167. Songur N, Kuru B, Kalkan F, Ozdilekcan C, Cakmak H, Hizel N. Serum interleukin-6 levels correlate with malnutrition and survival in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Tumori* 2004;90:196–200.

168. Altundag O, Altundag K, Gunduz E. Interleukin-6 and C-reactive protein in metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2005;23:1044. author reply-5.

169. Wei LH, Kuo ML, Chen CA, Chou CH, Lai KB, Lee CN, et al. Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene* 2003;22:1517–27.

170. Garcia-Tunon I, Ricote M, Ruiz A, Fraile B, Paniagua R, Royuela M. IL-6, its receptors and its relationship with bcl-2 and bax proteins in infiltrating and in situ human breast carcinoma. *Histopathology* 2005;47:82–9.

171. Salgado R, Junius S, Benoy I, Van Dam P, Vermeulen P, Van Marck E, et al. Circulating interleukin-6 predicts survival in patients with metastatic breast cancer. *Int J Cancer* 2003;103:642–6.

172. Zakrzewska I, Poznanski J. Changes of serum il-6 and CRP after chemotherapy in patients with ovarian carcinoma. *Pol Merkur Lekarski* 2001;11:210–3.

173. Penson RT, Kronish K, Duan Z, Feller AJ, Stark P, Cook SE, et al. Cytokines IL-1beta, IL-2, IL-6, IL-8, MCP-1, GM-CSF and TNFalpha in patients with epithelial ovarian cancer and their relationship to treatment with paclitaxel. *Int J Gynecol Cancer* 2000;10:33–41.

174. Trikha M, Corringham R, Klein B, Rossi JF. Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: a review of the rationale and clinical evidence. *Clin Cancer Res* 2003;9:4653–65.

175. Hong DS, Angelo LS, Kurzrock R. Interleukin-6 and its receptor in cancer: implications for Translational Therapeutics. *Cancer* 2007;110:1911–28.

176. Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR, Ondrey FG, Duffey DC, Smith CW, et al. Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5:1369–79.

177. Kaminska J, Nowacki MP, Kowalska M, Rysinska A, Chwalinski M, Fuksiewicz M, et al. Clinical significance of serum cytokine measurements in untreated colorectal cancer patients: soluble tumor necrosis factor receptor type I—an independent prognostic factor. *Tumour Biol* 2005;26:186–94.

178. Esfandi F, Mohammadzadeh Ghobadloo S, Basati G. Interleukin-6 level in patients with colorectal cancer. *Cancer Lett* 2006;244:76–8.

179. Nikiteas NI, Tzanakis N, Gazouli M, Rallis G, Daniilidis K, Theodoropoulos G, et al. Serum IL-6, TNFalpha and CRP levels in Greek colorectal cancer patients: prognostic implications. *World J Gastroenterol* 2005;11:1639–43.

180. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:683-765

181. Brooks DG, Trifilo MJ, Edelman KH, Teyton L, McGavern DB, Oldstone MB. Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nat Med* 2006; 12:1301-9

182. De Vita F, Orditura M, Galizia G, Romano C, Roscigno A, Lieto E, et al. Serum interleukin-10 levels as a prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer patients. *Chest* 2000; 117:365-73

183. Zheng LM, Ojcius DM, Garaud F, Roth C, Maxwell E, Li Z, et al. Interleukin-10 inhibits tumor metastasis through an NK cell-dependent mechanism. *J Exp Med* 1996; 184:579-84

184. Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of clinical investigation*. 2007; 117(5):1175-83.

185. Zamarron BF, Chen W. Dual Roles of Immune Cells and Their Factors in Cancer Development and Progression. *Int J Biol Sci*. 2011;7(5):651-8.

186. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Linking Inflammation and Cancer. *J Immunol*. 2009 April 15; 182(8): 4499–4506.

187. S. Kusmartsev, Y. Nefedova, D. Yoder, and D. I. Gabrilovich, “Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species,” *Journal of Immunology*, vol. 172, no. 2, pp. 989–999, 2004.

188. A. Sica, A. Saccani, B. Bottazzi et al., "Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF- κ B activation in tumor-associated macrophages," *Journal of Immunology*, vol. 164, no. 2, pp. 762–767, 2000.
189. Neurath Markus F, Finotto Susetta. *The emerging role of T cell cytokines in non-small cell lung cancer* Cytokine & Growth Factor Reviews 2012
190. Elkabets M, Ribeiro VS, Dinarello CA, et al. IL-1 β myeloid-derived suppressor cell subset that impairs NK cell development and function. *Eur J Immunol*. 2010; 40: 3347-57.
191. Bunt SK, Clements VK, Hanson EM, Sinha P, Ostrand-Rosenberg S. Inflammation enhances myeloid-derived suppressor cell cross-talk by signaling through Toll-like receptor 4. *J Leukoc Biol*. 2009; 85: 996-1004.
192. Tu S, Bhagat G, Cui G, et al. Overexpression of interleukin-1 β induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. *Cancer Cell*. 2008; 14: 408-19.
193. Kao AP, Wang KH, Long CY, et al. Interleukin-1 β cyclooxygenase-2 expression and promotes the invasive ability of human mesenchymal stem cells derived from ovarian endometrioma. *Fertil Steril*. 2011; 96: 678-84.e1.
194. Eruslanov E, Daurkin I, Ortiz J, Vieweg J, Kusmartsev S. Pivotal Advance: Tumor-mediated induction of myeloid-derived suppressor cells and M2-polarized macrophages by altering intracellular PGE₂ catabolism in myeloid cells. *J Leukoc Biol*. 2010; 88: 39-48.
195. Sinha P, Clements VK, Fulton AM, Ostrand-Rosenberg S. Prostaglandin E₂ promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res*. 2007; 67: 4507-13.
196. Yang, L., et al., Abrogation of TGF β signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis. *Cancer Cell*, 2008. 13(1): p. 23-35.