



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Expresión de la molécula PD-L1
en líneas celulares tumorales
cultivadas bajo diferentes condiciones
de pH y fuente de carbono**

T E S I S

que para obtener el título de:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

Myriam Elizabeth Prado Prado

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Heriberto Prado García



Ciudad Universitaria, CDMX, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Prado

Prado

Myriam Elizabeth

70 42 02 55

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

309294878

2. Datos del asesor

Dr.

Heriberto

Prado

García

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Sigifredo

Pedraza

Sánchez

4. Datos del sinodal 2

Dra.

Aída Susana

Romero

García

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Heriberto

Prado

García

6. Datos del sinodal 4

Dr.

Ricardo

Lascrain

Ledesma

7. Datos del sinodal 5

Biól.

Claudia Ivette

Rivas

Ortiz

8. Datos del trabajo escrito.

Expresión de la molécula PD-L1 en líneas celulares tumorales cultivadas bajo diferentes condiciones de pH y fuente de carbono.

63 p.

2019

A Elena, mi madre.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente al Dr. Heriberto, a la Dra. Susana y al Dr. Sigifredo por su infinita paciencia con mis tropiezos.

A todas y cada una de las personas que conforman el laboratorio de Cáncer Pulmonar, aún mas a mis compañeros y amigos, Estefany, Pam, Ana, Mario, Alis, Sofi bebé, Dani, Jesús, Mario y Mari porque sin sus rizas no hubiera sobrevivido esta etapa.

A mis amigos de la facultad, Diana, Adri, Davi y Fercho, por que siempre estuvieron respaldando mis olvidos y apoyandome para no rendirme.

A mis amigas del alma, Reyna, Xime y Fercha por siempre tenderme su mano en mis días mas oscuros.

Y a mi madre por supuesto, por confiar en mí, apoyarme y estar a mi lado ♥.

GRACIAS

“En la vida, no hay nada que temer, solo hay cosas que comprender.”

“Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.”

“La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡Que importa! Hay que perseverar y, sobre todo tener confianza... Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y ésta, hay que alcanzarla cueste lo que cueste.”

Marie Curie



Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Cancer Pulmonar del
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER),
"ISMAEL COSÍO VILLEGAS",
México, CDMX.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABLAS	9
ABREVIATURAS	10
INTRODUCCIÓN	12
CÁNCER.....	12
Mortalidad del cáncer	12
Generalidades.....	12
Carcinogénesis	13
Cáncer de pulmón	14
Microambiente tumoral	15
SISTEMA INMUNE.....	18
Respuesta innata.....	18
Respuesta adaptativa	19
Linfocitos B	19
Linfocitos T	19
Activación de linfocitos T	19
Linfocitos T CD4	20
Linfocitos T CD8	20
MECANISMOS DE EVASIÓN A LA MUERTE DE LAS CÉLULAS TUMORALES	21
Inmunoección del cáncer.....	21
ANTECEDENTES.....	23
PD-1	23
PD-L1	23
La vía PD-1/PD-L1	25
El efecto Warburg.....	26
Expresión de la molécula PD-L1 en microambientes ricos en lactato y con un pH acidificado.	26
Importancia clínica.....	27
La molécula PD-L1 como blanco terapéutico contra el cáncer	27
JUSTIFICACION.....	29
HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVOS	30

Objetivo general.....	30
Objetivos particulares.....	30
MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
Líneas celulares y mantenimiento celular	31
Cultivo celular en diferentes condiciones de crecimiento variando el pH entre 6.2 y 7.2 así como la fuente de carbono principal, entre glucosa y lactato.	31
Tinción celular y análisis de citometría de flujo para cuantificar la expresión de PD-L1 en la membrana celular	34
Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para determinar la expresión relativa del mensajero para PD-L1	36
Extracción, aislamiento y cuantificación de RNA.....	38
Tratamiento con DNAsa y retrotranscripción	38
i) Matriz de concentraciones de oligonucleótidos.....	40
ii) Curva de disociación.	40
iii) Rango dinámico de concentración del cDNA.....	42
Determinación de la expresión relativa del RNA mensajero para PD-L1 usando RT-qPCR	43
Análisis de expresión relativa del mRNA para PD-L1 usando el método $\Delta\Delta Ct$	46
RESULTADOS	47
Análisis de la expresión relativa de la molécula PD-L1 en la membrana celular	47
Expresión relativa del RNA mensajero para PD-L1 en las líneas celulares A-427 y SKMES-1.	51
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	57
BIBLIOGRAFÍA	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Carcinogénesis.....	3
Figura 2. Células del microambiente tumoral	6
Figura 3. Respuesta efectora del linfocito t citotóxico hacia las células tumoraes	11
Figura 4. Esquema general de trabajo.....	21
Figura 5. Tinción celular y análisis de la expresión de PD-L1 por citometría de flujo	23
Figura 6. Obtención de mRNA total y retrotranscripción	25
Figura 7. Curva de disociación	30
Figura 8. Curva estándar de HPRT-1 y PD-L1	31
Figura 9. Análisis representativo en donde se muestran las células SK-MES-1 con glucosa pH 6.2 utilizando el programa FlowJo X.....	37
Figura 10. Histograma representativo donde se muestra la comparación de las MFI debidas a la inmunotinción para PD-L1	37
Figura 11. Expresión relativa de la intensidad media de fluorescencia (rMFI) de la molécula PD-L1	40
Figura 12. Expresión relativa del mRNA de PD-L1	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Máster mix de Retrotranscripción.	27
Tabla 2. Secuencias y características de los oligonucleótidos utilizados para la reacción de qPCR.....	28
Tabla 3. Concentraciones utilizadas para la matriz de Oligonucleótidos, tanto para HPRT-1 como para PD-L1	29
Tabla 4. Diluciones seriadas del cDNA utilizadas para evaluar el rango dinámico	31
Tabla 5. Coctel para cada reacción de qPCR.....	33
Tabla 6. Programa usado en el termociclador para la amplificación y cuantificación de los genes de interés.....	33

ABREVIATURAS

ATP	Adenosín trifosfato
APC	Células presentadoras de antígeno profesionales
BSA	Albúmina de suero bovino
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
cDNA	DNA complementario
Ct	Ciclo umbral en qPCR
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DNAsa	Desoxirribonucleasa
dNTPs	Desoxiribonucleótidos
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminatetraacético
Fas	CD95
Fas-L	CD95 Ligando
FSC	Forward Scatter Channel, canal de dispersión frontal, valora el tamaño celular
Glu	Medio adicionado con Glucosa
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
HIF-1α	Factor inducido por hypoxia 1 α
HPRT-1	Hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa 1
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina o anticuerpo.
IL	Interleucina
JAK2	Janus cinasa 2
Lac	Medio adicionado con lactato
LDHA	lactato deshidrogenasa A
LPS	Lipopolisacaridos
MAPK	Via de las proteínas-cinasas activadas por mitógenos
MFI	Intensidad Media de Fluorescencia
mRNA	Ácido ribonucléico mensajero
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad

NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Hidruro
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras κ de las células B activadas
NK	Células <i>natural killer</i>
NTC	Control sin templado de DNA
PBS	Amortiguador salino de fosfatos/Solución Salina Amortiguada por Fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD-1	(CD279). Receptor de muerte programada 1
PD-L1	(CD274 o B7-H1). Ligando de muerte programada 1
PD-L2	(CD273 o B7-DC). Ligando de muerte programada 2
PE	Ficoeritrina
PKA	Proteína cinasa A
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasas
rMFI	Intensidad media de fluorescencia relativa
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
RT	Retrotranscripción
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
SSC	En citometría, detector de Dispersión Lateral, mide la granularidad celular.
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
TCR	Receptor de la célula T
Tm	Temperatura de fusión de los oligonucleótidos
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α

INTRODUCCIÓN

CÁNCER

Mortalidad del cáncer

El cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial; en 2018 se calcula que provocó 9.6 millones de defunciones, y se identifican cinco tipos de cáncer responsables del mayor número de fallecimientos: cáncer pulmonar (1,8 millones de muertes), cáncer colorectal (881 000 muertes), cáncer gástrico (783 000 muertes) cáncer hepático (782 000 muertes), y cáncer de mama (627 000 muertes). El cáncer de pulmón es responsable de casi una de cada cinco muertes por cáncer en todo el mundo en hombres (22%). En mujeres, el cáncer de pulmón es la segunda causa de muertes por cáncer (13.8%) (IARC, 2018).

En México durante 2018, de las muertes ocasionadas por tumores, destacan, el cáncer de mama (6 884 muertes), el cáncer de próstata (6 915 muertes) y el cáncer de pulmón (6 733) (GCO, 2018).

Generalidades

El cáncer es una enfermedad que afecta a los organismos multicelulares. Las células que conforman a estos organismos multicelulares mantienen una relación muy estrecha para llevar a cabo su metabolismo de forma coordinada y para mantener el control del metabolismo existen muchos mecanismos de regulación que al verse afectados pueden generar problemas en la función celular.

Desde el punto de vista biológico, el cáncer se caracteriza por un desequilibrio entre la proliferación y muerte celular, dando como resultado poblaciones celulares que evaden la muerte celular y que pueden invadir y destruir los tejidos que las rodean, así como hacer metástasis y colonizar tejidos distantes al sitio de origen. Esta enfermedad en la mayoría de los casos resulta en un deterioro progresivo del individuo y su muerte (Granados & Gómez, 1999).

El cáncer es una enfermedad genética causada por mutaciones en oncogenes, genes supresores de tumores y genes de estabilidad. (Romero-García *et al.*, 2011).

Normalmente las células del cuerpo que envejecen mueren y, si en algún momento estas llegan a tener algún daño que altere su funcionamiento, se activan mecanismos para eliminarlas. En cambio, las células tumorales logran sobrevivir y continuar su proliferación hasta llegar a formar tumores.

Las células tumorales adquieren características que las diferencian de las células sanas. Estas células tumorales mantienen activa la señalización que permite su proliferación, evaden los mecanismos supresores del crecimiento, evaden la eliminación por el sistema inmune, tienen inmortalidad replicativa, promueven la inflamación, activan mecanismos de invasión y metástasis, e inducen la angiogénesis en los sitios donde se encuentran; también presentan inestabilidad genómica y mutaciones, resistencia a la muerte celular y desregulación de la energía celular. (Hanahan & Weinberg, 2011). Los factores que provocan dichos cambios son de naturaleza diversa y su efecto rara vez puede estudiarse de forma individual, pues el cáncer es consecuencia de la interacción de múltiples factores.

Carcinogénesis

El proceso de carcinogénesis se puede dividir en:

- 1) **Iniciación:** Ocurre un cambio genético que es permanente y heredable, estos cambios pueden dar lugar a tumores benignos o malignos (Figura 1, A).
- 2) **Promoción:** Se refiere al crecimiento del tejido, y es un proceso reversible en el que se acumulan otras alteraciones genéticas (Figura 1, B).
- 3) **Progresión:** Es la etapa en la que las células genéticamente alteradas perpetúan su crecimiento y proliferación invadiendo los tejidos y llegan a hacer metástasis hacia otras partes del organismo (Figura 1, C) (Granados & Gómez, 1999).

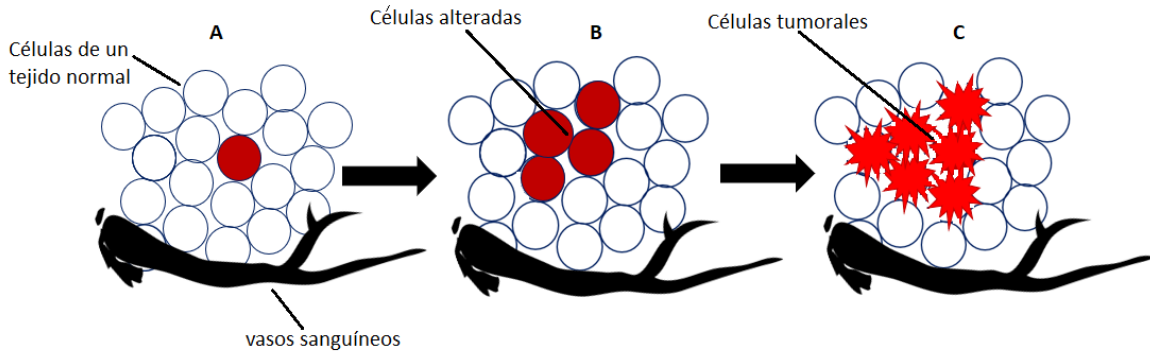


Figura 1. Carcinogénesis. La carcinogénesis se inicia cuando, en un tejido normal, una célula sufre una modificación irreversible (A, iniciación). Después, la célula sufre otras alteraciones genéticas que promueven su proliferación y la acumulación de daños (B, promoción). Por último, la población de células alteradas durante la promoción progresa hacia un fenotipo maligno (C, Progresión). Durante esta secuencia, las células tumorales adquieren una serie de características comunes en los diferentes tipos de cáncer.

Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón se desarrolla tanto de células pulmonares como bronquiales. Existen dos tipos importantes de acuerdo con su origen y comportamiento, estos son el cáncer pulmonar de células no pequeñas y el cáncer pulmonar de células pequeñas.

El cáncer pulmonar de células no pequeñas se subdivide principalmente en carcinoma epidermoide o escamoso, adenocarcinoma y carcinoma de células grandes, mientras que el cáncer pulmonar de células pequeñas agrupa tipos combinados de cáncer.

El carcinoma epidermoide o de células escamosas suele localizarse en los bronquios. Causa obstrucción, colapso del tejido pulmonar y neumonía. Tiende a hacer metástasis en ganglios linfáticos hiliares y mediastínicos. Empieza en las células escamosas (células de la piel, el revestimiento de los órganos huecos, y en el revestimiento de los aparatos respiratorio y digestivo) y está conformado por células delgadas y planas (Granados & Gómez, 1999).

El adenocarcinoma se localiza con frecuencia en la periferia del pulmón. Se origina en las glándulas mucosas, el epitelio de bronquios o bronquiolos (Granados & Gómez, 1999).

El adenocarcinoma representa el 50% de los casos y a menudo es asintomático ya que su ubicación es periférica, su crecimiento es lento, pero puede hacer metástasis temprana (Ginsberg *et al.*, 2007).

En la mayoría de los casos, el carcinoma de células grandes tiene una localización periférica y puede ser voluminoso (20-30% de los casos) ya que forma una especie de cavidad rellena de aire o líquido. La metástasis del carcinoma de células grandes suele ser tardía (Granados & Gómez, 1999).

El carcinoma de células pequeñas ocurre como masa central en el 80% de los casos, hace metástasis muy rápidamente y está estrechamente relacionado con el hábito de fumar (Granados & Gómez, 1999).

Microambiente tumoral

Los tumores contienen múltiples tipos de células con diferentes tipos de interacciones entre sí (Figura 2) (Hanahan & Weinberg, 2011). Además, el microambiente tumoral está conformado por vasculatura y matriz extracelular (Quail & Joyce, 2013), así como una red de moléculas de señalización como citocinas, quimiocinas y exosomas (Quail & Joyce, 2013). Dadas las múltiples interacciones entre las células presentes en el microambiente tumoral, el entendimiento de éste ya no puede restringirse a enumerar las características de las células tumorales, sino que se deben estudiar las interacciones celulares que están presentes en el microambiente tumoral (Hanahan & Weinberg, 2011).

Las células tumorales modifican su metabolismo y su microambiente, además, requieren altas demandas de ATP, oxígeno, carbono, NADPH y NADH debido a su intensa replicación celular. A su vez, las células tumorales pueden reprogramar su metabolismo en función de los cambios microambientales, como la acidosis, la fuente de carbono y la disponibilidad de oxígeno. Las células tumorales incrementan la glucólisis y la glutaminólisis para satisfacer sus demandas de ATP y NADPH. (Romero-García *et al.*, 2011).

La glucosa es el sustrato metabólico principal de la mayoría de las células de los mamíferos. En el citoplasma de las células, la glucólisis transforma una mol de glucosa en dos moles de piruvato y con esto, genera dos moles de ATP y NADH por cada mol de glucosa. El piruvato generado en la glucólisis es utilizado en el ciclo del ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs), lo que produce una gran cantidad de moléculas de ATP. Cuando las células tienen un aporte limitado de oxígeno o un impedimento genético que impide la oxidación del piruvato, éste es reducido a lactato en el citoplasma por la enzima lactato deshidrogenasa. El exceso de lactato producido se exporta fuera de la célula y contribuye a la acidificación del entorno celular (Ortega *et al.*, 2009).

La glucólisis es energéticamente menos eficiente que otras vías como la fosforilación oxidativa o el ciclo de Krebs; sin embargo, cumple con funciones fundamentales para la célula ya que suministra metabolitos importantes para la composición de nuevas células, así como la energía necesaria para su ensamblaje. Por lo tanto, una mayor multiplicación celular hace necesaria una mayor actividad glucolítica que a su vez requerirá una mayor captación de glucosa (Ortega *et al.*, 2009).

Cuando las células tumorales aumentan su actividad glucolítica también aumentan la producción de ácido láctico, lo que genera un ambiente tóxico para las células adyacentes. Este ambiente no es del todo tóxico para las células tumorales, ya que han desarrollado mecanismos que les permiten tolerarlo (Romero-García *et al.*, 2011).

Además del exceso de ácido láctico, la hipoxia es otro factor que se asocia con la acidosis en el medio extracelular (Romero-García *et al.*, 2011), ya que las células endoteliales vasculares producen nuevos vasos sanguíneos para suministrar oxígeno y eliminar desechos metabólicos, pero son vasos sanguíneos incompletos y con una función mínima (Hanahan & Folkman, 1996). También es posible que el microambiente tumoral se acidifique en condiciones de normoxia, debido al efecto Warburg (Romero-García *et al.*, 2011).

Después de una mortalidad celular sustancial inicial, la acidosis (6.0-6.6 (Xie *et al.* 2014; Barar & Omid 2013; Gottfried *et al.*, 2006) selecciona fenotipos tumorales resistentes. También promueve la degradación de la matriz extracelular y el aumento de la invasividad de las células tumorales (Moellering *et al.*, 2008).

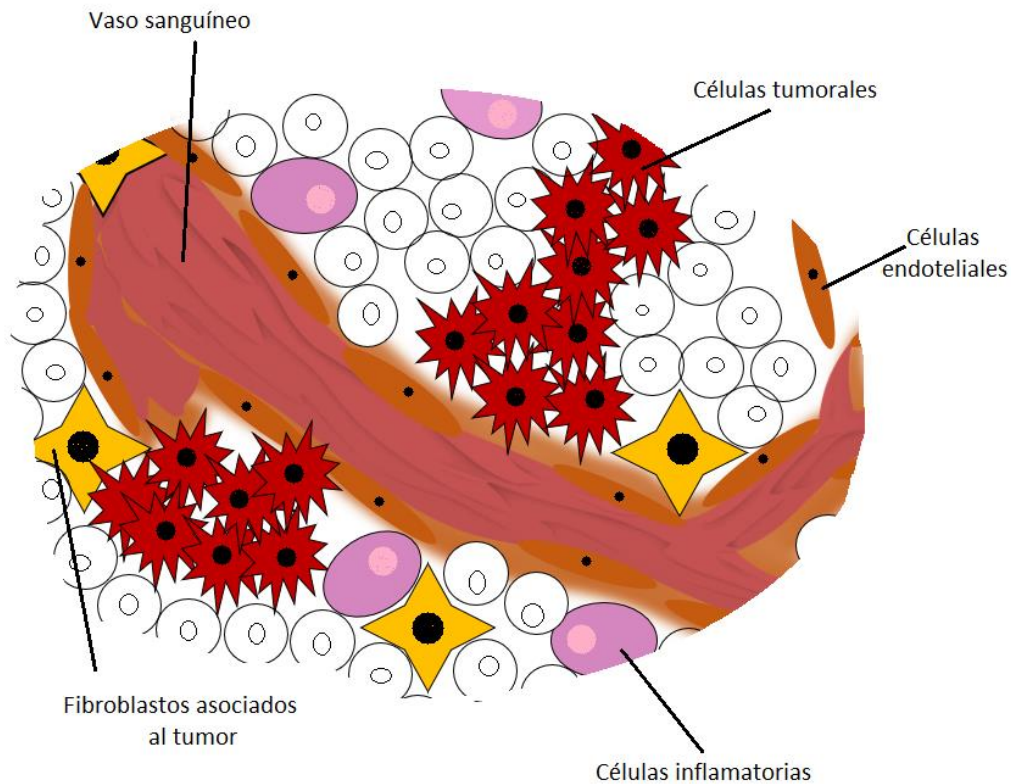


Figura 2. Células del microambiente tumoral. Un conjunto de distintos tipos de células constituye la mayoría de los tumores sólidos. Tanto el parénquima como el estroma de tumores contienen distintos tipos de células y subtipos que, colectivamente, permiten el crecimiento y la progresión del tumor.

SISTEMA INMUNE

El cuerpo humano está constantemente amenazado por factores externos que pueden afectar su homeostasis, tales como virus, bacterias, hongos, parásitos, sustancias tóxicas, agentes mutagénicos e incluso el daño físico como tal. Así mismo, mediante la proliferación celular, surgen mutaciones en el genoma que pueden llevar al desarrollo de células tumorales, esto puede o no ser provocado e intensificado por agentes externos como la radiación. Para afrontar el daño, el cuerpo cuenta con un sistema encargado de su vigilancia y protección, éste es el sistema inmune.

Respuesta innata

La respuesta inmune puede ser innata o adaptativa, estos sistemas no operan independientemente el uno del otro, sino que actúan cooperativamente produciendo una respuesta sumamente eficaz. La inmunidad innata responde casi inmediatamente a las señales de las células dañadas y a los microorganismos que infectan al ser humano. Los receptores de las células de la respuesta innata son poco específicos y reconocen estructuras moleculares comunes en los microorganismos, además, no discriminan entre unos y otros (Abbas *et al.*, 2018). Por otra parte, se dice que la inmunidad innata no tiene mecanismos de memoria y su magnitud es más o menos la misma durante la vida de los animales o del ser humano que cuentan con estos mecanismos de defensas, que son los más primitivos, evolutivamente hablando.

Entre los componentes de la inmunidad innata existen barreras mecánicas como la piel, las membranas mucosas, la acidez del contenido estomacal y el sudor. También está compuesta por diversas células como las fagocíticas (monocitos, neutrófilos sanguíneos y macrófagos tisulares) así como de algunas moléculas solubles y las moléculas del complemento (Goldsby *et al.*, 2007).

Respuesta adaptativa

Con la presencia de un antígeno persistente en el organismo, alrededor de cinco o seis días después de la primera exposición, se genera la inmunidad adaptativa. Los linfocitos son las células encargadas de llevar a cabo la respuesta inmune adaptativa, esto mediante la expresión de un gran número de receptores capaces de reconocer una gran cantidad de antígenos, estas células logran reconocer lo propio de lo extraño y generan memoria para una respuesta más eficaz en caso de haber una segunda exposición al antígeno. Existen dos poblaciones principales de linfocitos, los linfocitos B y T (Abbas *et al.*, 2018; Goldsby *et al.*, 2007).

Linfocitos B

Los linfocitos B maduran en la médula ósea y al salir de ahí, cada célula ya cuenta con un anticuerpo en específico sobre su membrana. Cuando un linfocito B encuentra un antígeno con el que es compatible, comienza a dividirse con rapidez y se diferencia como linfocito B de memoria o linfocito B efector (células plasmáticas). Las células plasmáticas se encargan de producir anticuerpos solubles, estos anticuerpos son los principales encargados de la inmunidad humoral (Goldsby *et al.*, 2007).

Linfocitos T

Los linfocitos T también se generan en la médula ósea, pero estas migran al timo para terminar su maduración. Los linfocitos T expresan en su membrana una molécula de unión al antígeno única (TCR). Existen dos subpoblaciones de linfocitos T llamados linfocitos T colaboradores (T_H) y linfocitos T citotóxicos (T_C) y las podemos identificar por la presencia de las proteínas de membrana CD4 en los linfocitos T_H y CD8 en los linfocitos T_C (Goldsby *et al.*, 2007).

Activación de linfocitos T

La activación de los linfocitos T comienza con un pequeño grupo de células *naive* las cuales son específicas para un antígeno. Estas células están encargadas de eliminar dicho antígeno una vez que pasan a su etapa efectora. También, es en esta etapa cuando se multiplican y generan una gran cantidad de células de memoria con la misma especificidad, las cuales reaccionarán rápidamente en caso de que

este antígeno vuelva a presentarse en el cuerpo. Los linfocitos T son altamente específicos con el antígeno que reconocen (Abbas *et al.*, 2018).

Para que los linfocitos T reconozcan el antígeno extraño y puedan pasar a su fase efectora, es necesario que el antígeno se presente en forma de péptido, esto requiere de una APC, que se encarga de reconocer al antígeno y procesarlo para obtener una forma peptídica, una vez que el antígeno está en su forma peptídica los linfocitos T lo reconocen mediante la presentación antigénica a través de la interacción de su TCR con la molécula del MHC de las APC (Goldsby *et al.*, 2007).

Linfocitos T CD4

Los linfocitos T CD4 reconocen péptidos (18-25 a.a.) que se unen a moléculas MHC de clase II en la superficie de las células presentadoras de antígeno profesionales (p. ej. macrófagos, linfocitos B, células dendríticas). Las moléculas de MHC-II presentan moléculas derivadas de patógenos extracelulares y antígenos solubles (Arnaiz-Villena *et al.*, 1995). Los linfocitos T CD4 ayudan a otras células del sistema inmune a responder contra las fuentes de infección (Parham & Janeway, 2006).

Una vez que el linfocito T CD4 reconoce el complejo antígeno/molécula del MHC-II se activa y comienza a secretar diversas citocinas con la función de activar a las células B, los linfocitos T CD8, macrófagos, entre otras (Goldsby *et al.*, 2007).

Linfocitos T CD8

Los linfocitos T CD8 (citotóxicos) reconocen fragmentos peptídicos (8-11 a.a.) unidos a moléculas MHC-I. Las moléculas MHC-I presentan péptidos derivados de proteínas endógenas (Arnaiz-Villena *et al.*, 1995).

Los linfocitos T CD8 tienen como función destruir las células que han sido infectadas por un virus o algún otro patógeno intracelular, células tumorales y las células de un injerto de tejido extraño. Esta respuesta previene la multiplicación del patógeno y la infección de células sanas (Parham & Janeway, 2006).

Una vez que ha ocurrido la presentación antigénica, los linfocitos T CD8 patrullan el cuerpo e identifican el péptido en cuestión sobre la membrana de la célula infectada

o tumoral a través de su molécula del MHC-I. Al encontrar una de estas células y reconocerla como tal, el linfocito T CD8 puede eliminarla de diferentes maneras:

- Por una lesión en la membrana mediada por microtúbulos poliméricos de perforina los cuales atraviesan la membrana y ocasionan muerte lítica.
- Por la inducción de apoptosis mediante granzimas que logran ingresar a la célula a través de los microtúbulos de perforina.
- Por la interacción de las moléculas Fas (en la membrana de la célula blanco) con Fas-L (en la membrana del linfocito T citotóxico activado). Esta interacción inicia una cascada de señalización que induce la apoptosis (muerte celular programada) de la célula blanco.

Una vez que las células mueren, el linfocito T CD8 continúa su recorrido a través del cuerpo hasta encontrar otra célula a la cual destruir (Figura 3) (Goldsby *et al.*, 2007).

MECANISMOS DE EVASIÓN A LA MUERTE DE LAS CÉLULAS TUMORALES

Inmunoedición del cáncer

Dentro de un mismo tumor existen diferentes variantes de células tumorales, estas pueden ser poco o muy inmunogénicas (esto es, que inducen una respuesta inmune) y el sistema inmune se encarga de eliminar las más inmunogénicas, de manera que las variantes menos inmunogénicas son las que logran dar progresión al tumor. A esto se le ha llamado inmunoedición del cáncer (Dunn *et al.*, 2006).

En 2004 se reportó que las células tumorales que expresan altos niveles de PD-L1 eran significativamente más resistentes para evadir a los linfocitos T citotóxicos (Blank *et al.*, 2004), y fue hasta 2008 que se confirmó el papel de PD-L1 como participe en la resistencia de las células tumorales frente a los estímulos pro-apoptóticos y se propuso que PD-L1 transmitía señales protectoras a las células tumorales ya que eran resistentes a la citotoxicidad de los linfocitos T aun cuando estos no expresaban PD-1 (Azuma *et al.*, 2008).

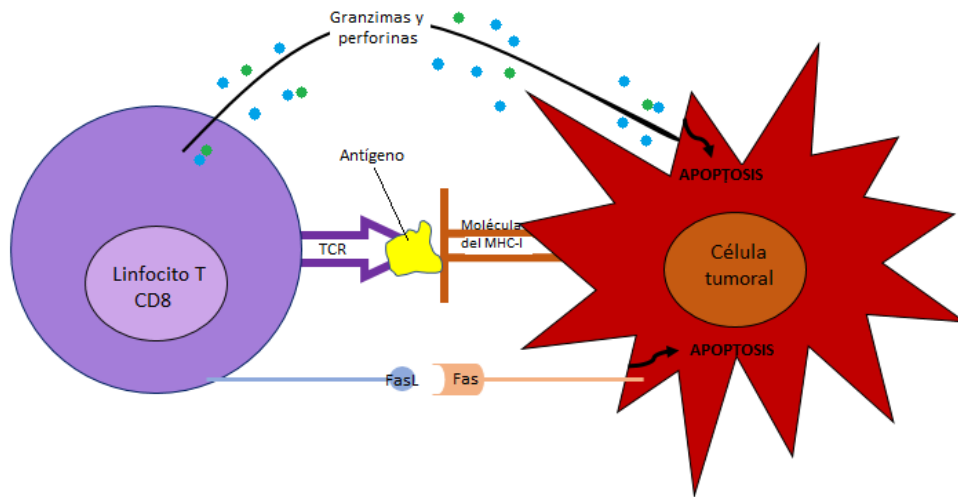


Figura 3. Respuesta efectora del linfocito t citotóxico hacia las células tumorales. En el sitio del tumor, el linfocito T CD8 identifica el antígeno tumoral sobre la membrana de la célula tumoral a través de su molécula MHC-I para eliminarla a través de la interacción de Fas/FasL, o con la secreción de perforina y granzimas.

ANTECEDENTES

PD-1

El receptor de muerte programada PD-1 o CD279 se considera una molécula coestimuladora inhibitoria, es codificada por el gen *Pdcd1* en el cromosoma 2 en humano y consta de 288 residuos de a.a. También es miembro de la superfamilia de las Inmunoglobulinas y es expresado por los linfocitos T y B activados, timocitos, monocitos, células NK y ciertas células dendríticas. Se han descrito dos ligandos para PD-1, PD-L1 y PD-L2 (Vargas-Rojas *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2019).

PD-L1

El ligando de muerte programada fue el primer ligando de PD-1 descubierto (Dong *et al.*, 1999), también es conocido como B7-H1 o CD274, y es una glicoproteína transmembranal de tipo I con dominio extracelular tipo IgC e IgV, se encuentra en el cromosoma 9 del humano, es codificado por el gen *Cd274* y consta de 290 residuos de a.a. (Vargas-Rojas *et al.*, 2008).

Una gran variedad de tejidos sanos expresa la molécula PD-L1, y se ha encontrado una alta expresión en placenta, corazón, pulmón e hígado, una baja expresión en bazo, ganglios linfáticos y timo. (Vargas-Rojas *et al.*, 2008). PD-L1 también se expresa en endotelio vascular, fibroblastos reticulares, células hepáticas no parenquimatosas células madre mesenquimáticas, astrocitos, células neuronales y queratinocitos (Keir *et al.*, 2008).

Se ha encontrado una expresión anormalmente alta de PD-L1 en células tumorales (Qin T., *et al.* 2015), y se ha llegado a considerar que esta molécula es un importante regulador negativo de la respuesta inmune antitumoral (Dong *et al.*, 1999). Se ha reportado que PD-L1 se sobreexpresa en algunos tipos de cáncer como glioblastoma, melanoma, y cáncer de pulmón, ovario, colon, cabeza, cuello y mama (Dong *et al.*, 2002; Strome S.E. & Chen L., 2004; Winterle, S., *et al.*, 2003; además de en diversas líneas celulares tumorales (Dong *et al.* 2002).

Por otra parte, se ha asociado la sobreexpresión de PD-L1 con un mal pronóstico en pacientes con cáncer (Dong H. *et al.*, 2002; Escors D., *et al.*, 2018). Por ejemplo, en un estudio hecho en pacientes con carcinoma de células renales, los pacientes, cuyos tumores mostraron una mayor expresión de PD-L1, fueron más propensos a morir (Thompson R.H., *et al.* 2004). Por otro lado, se ha visto, que el bloqueo de la vía PD-1/PD-L1 con anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 potencia la respuesta antitumoral en modelos de cáncer murino (Strome *et al.* 2003).

Cabe mencionar, que no se ha encontrado relación entre el mRNA para PD-L1 y un mejor o peor pronóstico para los pacientes con cáncer (Goltz *et al.*, 2017), además de que distintas rutas de señalización pueden regular la expresión de la molécula PD-L1, por lo que los mecanismos exactos pueden variar considerablemente. (Chen *et al.*, 2016).

Además, se encontró una nueva variable de empalme de PD-L1 en células mononucleares de sangre periférica activadas, y al comparar las isoformas se encontraron distintos patrones de localización entre ambas, y el patrón de expresión de la variante de empalme fue distinta en diferentes individuos y en distintos estadios celulares. El empalme alternativo puede ser un regulador transcripcional que modula la expresión de PD-L1 (He *et al.* 2005).

Factores que estimulan la expresión de PD-L1

Se ha demostrado en modelos murinos que la expresión de PD-L1 en células tumorales aumenta en presencia de anticuerpos como anti-IgM, anti-CD40 o anti CD3, y a estímulos tales como LPS, IFN- γ , IL-12 y el GM-CSF (Vargas-Rojas *et al.*, 2008). En cáncer de pulmón, el IFN- γ induce la expresión de PD-L1, lo que conlleva a un escape inmune por parte de las células tumorales (Zhang *et al.* 2017).

Además, varios reguladores de PD-L1 se han asociado también con el cáncer, por ejemplo: JAK2 (Ikeda *et al.*, 2016; Clave *et al.*, 2018), PTEN, MAPK, PI3K, HIF-1a, STAT3 (Marzec *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2016), TNF- α , NF- κ B (Gowrishankar *et al.*, 2015), e IFN- γ .

La vía PD-1/PD-L1

La vía PD-1/PD-L1 mantiene el equilibrio entre la tolerancia y la autoinmunidad, si su expresión es deficiente o excesiva, se pueden desencadenar efectos adversos para el cuerpo (Zamani *et al.*, 2016). La expresión de PD-L1 en células tumorales juega un papel importante en la evasión a la muerte ya que inhibe la función de los linfocitos T (Blank & Mackensen, 2007; Prado-García *et al.*, 2009). Después de la unión de PD-L1 con su receptor PD-1, se reduce la secreción de citocinas por parte de los linfocitos T (Jiang *et al.*, 2019), así como la producción de granzima-B (Prado-García, *et al.* 2017), y se ha demostrado que en tumores activados in vitro aumenta la apoptosis de los linfocitos T que responden al tumor (Dong *et al.* 2002).

La expresión de PD-L1 aumenta en cultivos con niveles bajos de oxígeno en linfocitos T, células dendríticas y macrófagos murinos. Así como en líneas celulares de cáncer de próstata, mama y células de cáncer colorrectal humano (Barsoum *et al.*, 2014). También se ha visto que la hipoxia es un factor en el microambiente tumoral que interviene en la regulación de PD-L1 en carcinoma renal de células claras (Ruf *et al.*, 2016).

Se ha sugerido que PD-L1 contribuye a la progresión del tumor mediante la modulación del metabolismo de la glucosa, ya que las células tumorales consumen una gran cantidad de la glucosa del microambiente tumoral inhibiendo a los linfocitos T dependientes de glucólisis aeróbica para ejercer su toxicidad. Al bloquear la vía PD-1/PD-L1, los niveles de glucosa son restaurados en el microambiente tumoral, lo que sugiere que el metabolismo glucolítico está regulado por esta vía en células tumorales (Chang *et al.*, 2015; Palmer, 2015)

De hecho, al bloquear la molécula PD-L1 mediante anticuerpos, Palmer *et al.* observaron que se redujo la traducción de mRNA para enzimas glucolíticas y los mismos resultados se obtuvieron al silenciar PD-L1; sin embargo, a pesar de esta reducción, no se observó inhibición alguna en la tasa de crecimiento del tumor al menos en este modelo de sarcoma murino (Palmer *et al.* 2015). La reducción de las enzimas glucolíticas también se comprobó en melanoma murino y en líneas

celulares de cáncer de ovario, estas pruebas se realizaron en ausencia de linfocitos T, por lo que se puede asumir que no es necesaria la presencia de PD-1 para activar las vías de señalización de PD-L1 (Clark *et al.* (2016).

El efecto Warburg

En 1927, Otto Warburg reportó que las células tumorales aumentan su glucólisis, y generan una gran producción de lactato a partir de piruvato, incluso en condiciones de normoxia (Warburg *et al.* 1927).

El lactato, juega un papel importante en el microambiente tumoral, como resultado del efecto Warburg, las células tumorales secretan una gran cantidad de lactato, lo que a su vez reduce el pH hasta valores de 6.0-6.5 (Xie *et al.* 2014). También, se ha reportado que, en el microambiente tumoral, pueden encontrarse concentraciones de lactato de hasta 40 mM (Walenta *et al.* 2000).

La glucosa no es la única fuente de carbono de las células tumorales. Se ha reportado que una disminución en la disponibilidad de oxígeno o glucosa induce a las células a buscar otra alternativa como el lactato como fuente de energía, esto se ha relacionado con la progresión del tumor (Curry *et al.* 2013).

Expresión de la molécula PD-L1 en microambientes ricos en lactato y con un pH acidificado.

Se ha reportado que PD-L1 se sobreexpresa en células de cáncer de pulmón, y sobre todo en microambientes que han sido enriquecidos con lactato (Feng *et al.* 2017).

La falta de glucosa en el microambiente ocasiona que el metabolismo de glucosa se reduzca y el lactato se acumule, creando un ambiente óptimo para la interacción PD-L1/PD-1, ayudando a las células tumorales a escapar a las terapias contra el cáncer (Robainas *et al.* 2017), y posiblemente contra la acción del sistema inmune (Koukourakis *et al.*, 2005; Marchiq & Pouyssegur, 2016).

En la glucólisis aeróbica, el piruvato se convierte en ácido láctico, mediante la ALDHA. La acumulación de ácido láctico en las células tumorales promueve el transporte de éste al medio extracelular, provocando que el pH disminuya alrededor de 6.6 en el microambiente (Barar & Omid 2013; Gottfried *et al.*, 2006). Se ha sugerido que el

ácido láctico exportado desde el citoplasma celular de las células tumorales es importante para el mantenimiento del tumor (Sonveaux *et al.*, 2012).

Los linfocitos T activados, al igual que las células tumorales, utilizan la glucólisis aeróbica como principal fuente de energía, y también contribuyen secretando ácido láctico al microentorno (Chang *et al.* 2013). El pH más ácido y una mayor concentración de ácido láctico causada por las células tumorales, inhiben la secreción de ácido láctico de los linfocitos T y causan que se asfixien, lo que ocasiona que reduzcan su proliferación y disminuyan la producción de citocinas hasta en un 95% (Fisher *et al.*, 2013).

Importancia clínica

La molécula PD-L1 como blanco terapéutico contra el cáncer

La inmunoterapia ha sido considerada como uno de los tratamientos más prometedores contra el cáncer. En 2012 la doctora Suzanne Topalian, utilizó anticuerpos para bloquear la vía PD-L1/PD-1 y encontró que mostraba eficacia contra la progresión del tumor en varios tipos de cáncer (Topalian *et al.*, 2012). La inmunoterapia con anticuerpos anti-PDL-1 y anti-PD-1 bloquea la molécula PD-L1 y el receptor de la molécula PD-L1 en las células tumorales y de esta forma se restablece la actividad antitumoral del linfocito T CD8. Al bloquear el ligando PD-L1 con un anticuerpo anti-PD-L1 monoclonal se ha visto una disminución de la masa tumoral en pacientes con cáncer de pulmón de células no-pequeñas, melanoma, cáncer de células renales y cáncer de ovario (Brahmer *et al.*, 2012).

Entre los mecanismos propuestos para explicar cómo funciona la inmunoterapia que bloquea PD-L1, se ha reportado que en un cocultivo de la línea celular SK-MES-1 con linfocitos T CD8, al bloquear la molécula PD-L1 con anticuerpo antiPD-L1 el porcentaje linfocitos T CD8 que producían granzima-B, molécula importante para la erradicación tumoral, aumentaron significativamente (Prado-García, 2017).

Según el sitio oficial de la administración de drogas y comida de los Estados Unidos (la FDA, por sus siglas en inglés), se han aprobado algunos inhibidores de PD-L1 como; Atezolizumab (Tecentriq) (2016), Avelumab (Bavencion) (2017), y

Durvalumab (Imfinzi) (2017) (Wang *et al.*, 2018). Estos medicamentos han sido de ayuda para el tratamiento de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (Wang *et al.*, 2016), carcinoma de células renales, cáncer de vejiga y cáncer de mama (Hu *et al.*, 2017), melanoma (Luke *et al.*, 2017) y linfoma de Hodgkin (Allen & Gordon, 2016). Sin embargo, la inmunoterapia dirigida a bloquear la interacción PD-L1/PD-1 no ha tenido los efectos esperados, especialmente en tumores sólidos, esto podría deberse a diferencias entre los pacientes y la heterogeneidad tumoral que existe dentro de un mismo paciente, dado que la expresión de PD-L1 varía en diferentes tipos de tumores y entre los pacientes (Jiang *et al.*, 2019). Además, las complejas interacciones entre los múltiples constituyentes del microambiente tumoral seguramente contribuyen a la modulación de la expresión de PD-L1. Conocer dichas interacciones sería de ayuda para mejorar las terapias contra el cáncer ya existentes. (Bai *et al.* 2017).

Por lo anterior, se infiere que entender los mecanismos de regulación de PD-L1 en las células tumorales, es de gran importancia para desarrollar mejores tratamientos que ayuden a controlar, o bien, erradicar el cáncer.

La molécula PD-L1 tiene una gran importancia en el microambiente tumoral, tanto para las células del sistema inmune, como para las células tumorales. Las interacciones entre las células tumorales y la molécula PD-L1 están ampliamente estudiadas; sin embargo, es necesario conocer a fondo todas las interacciones entre la molécula PD-L1 en las células tumorales con el microambiente tumoral para así poder desarrollar terapias dirigidas más eficientes para erradicar el tumor.

JUSTIFICACION

La molécula PD-L1 tiene una gran importancia en el microambiente tumoral, tanto para las células del sistema inmune, como para las células tumorales. Las interacciones entre las células tumorales y la molécula PD-L1 están ampliamente estudiadas, sin embargo, es necesario conocer a fondo todas las interacciones entre la molécula PD-L1 en las células tumorales con el microambiente tumoral para así poder desarrollar terapias dirigidas más eficientes para erradicar el tumor.

HIPÓTESIS

Al cultivar las líneas celulares tumorales en un medio con pH ácido (pH 6.2) y lactato incrementará la expresión de PD-L1.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar si un pH ácido (6.2) y lactato como fuente principal de carbono aumentan la expresión de PD-L1 en las líneas celulares A-427, A-549, MCF-7 y SK-MES-1.

Objetivos particulares

- Analizar la expresión de la molécula PD-L1 en la membrana celular de las líneas celulares A-427, A-549, MCF-7 y SK-MES-1 al modificar el pH a 7.2 o 6.2, y, la fuente de carbono por la de glucosa o lactato en el medio de cultivo.
- Analizar la expresión del mRNA para PD-L1 de las líneas celulares que respondieron con un incremento en la expresión de PD-L1 en su membrana al modificar el pH a 7.2 o 6.2 y la fuente de carbono por la de glucosa o lactato en el medio de cultivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Líneas celulares y mantenimiento celular

Se utilizaron cuatro líneas celulares tumorales con crecimiento adherente en monocapa: A-427, A-549 y SK-MES-1 de carcinoma de pulmón, y MCF-7 proveniente de adenocarcinoma de mama, todas adquiridas de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA).

Las líneas celulares se mantuvieron en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis Mo, EUA) suplementado con suero fetal bovino al 10% (HyClone, Utah, EUA) y antibióticos (100 µg/mL estreptomycin y 100 U/mL de penicilina) y se cultivaron en una atmosfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C.

Ya que estas líneas celulares son adherentes, para el pase de caja se utilizó una solución de tripsina (0.05%), verseno (0.5%) en solución salina de fosfatos sin calcio ni magnesio (Invitro, D.F. México) y las células se desprendieron de la superficie de cultivo mediante agitación mecánica.

Cultivo celular en diferentes condiciones de crecimiento variando el pH entre 6.2 y 7.2 así como la fuente de carbono principal, entre glucosa y lactato.

Se utilizó medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis Mo, EUA) con glucosa y libre de glucosa suplementados con suero fetal bovino al 10% (HyClone, Utah, EUA) y antibióticos (100 µg/mL estreptomycin y 100 U/mL de penicilina). Al medio RPMI-1640 libre de glucosa se le adicionó lactato para tener una concentración de 20 mM. Se ajustó el pH de ambos medios a pH 7.2 y pH 6.2, de esta forma se obtuvieron los siguientes cuatro medios de cultivo:

- Glucosa 10 mM a un pH de 7.2 (glucosa 7.2) (medio control).
- Lactato 20 mM a un pH de 7.2 (lactato 7.2).
- Glucosa 10 mM a un pH de 6.2 (glucosa 6.2).
- Lactato 20 mM a un pH de 6.2 (lactato 6.2).

Utilizamos los medios de cultivo a un pH de 7.2 ya que este es el pH ideal para el mantenimiento de las líneas celulares, y un pH de 6.2, el cual fue utilizado en el estudio anterior realizado por Prado-Garcia *et al.* 2020.

Utilizamos lactato 20 mM ya que esta concentración se puede encontrar en el microambiente tumoral. El medio con glucosa 10 mM, es el ideal para realizar el mantenimiento de las líneas celulares.

Las células se sembraron a una concentración inicial de 5×10^4 células/mL en placas de 6 pozos Multidish Nunclon (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) y se incubaron durante 48 horas para analizar la expresión de la molécula PD-L1 en la membrana celular o durante 24 ó 48 horas para analizar el RNA mensajero para PD-L1. Todos los cultivos se incubaron en una atmosfera húmeda con 5% de dióxido de carbono (CO_2) a una temperatura de 37°C . Además, se incluyó el control positivo de $\text{IFN-}\gamma$, en un pozo adicional se incubaron células en medio control (glucosa pH 7.2) con 2 ng/mL de $\text{IFN-}\gamma$ (PeproTech, EUA), debido a que la estimulación con $\text{IFN-}\gamma$ incrementa la expresión de PD-L1 en células tumorales (Pérez-Hernández, 2010; Mojic, 2018) (Figura 4).

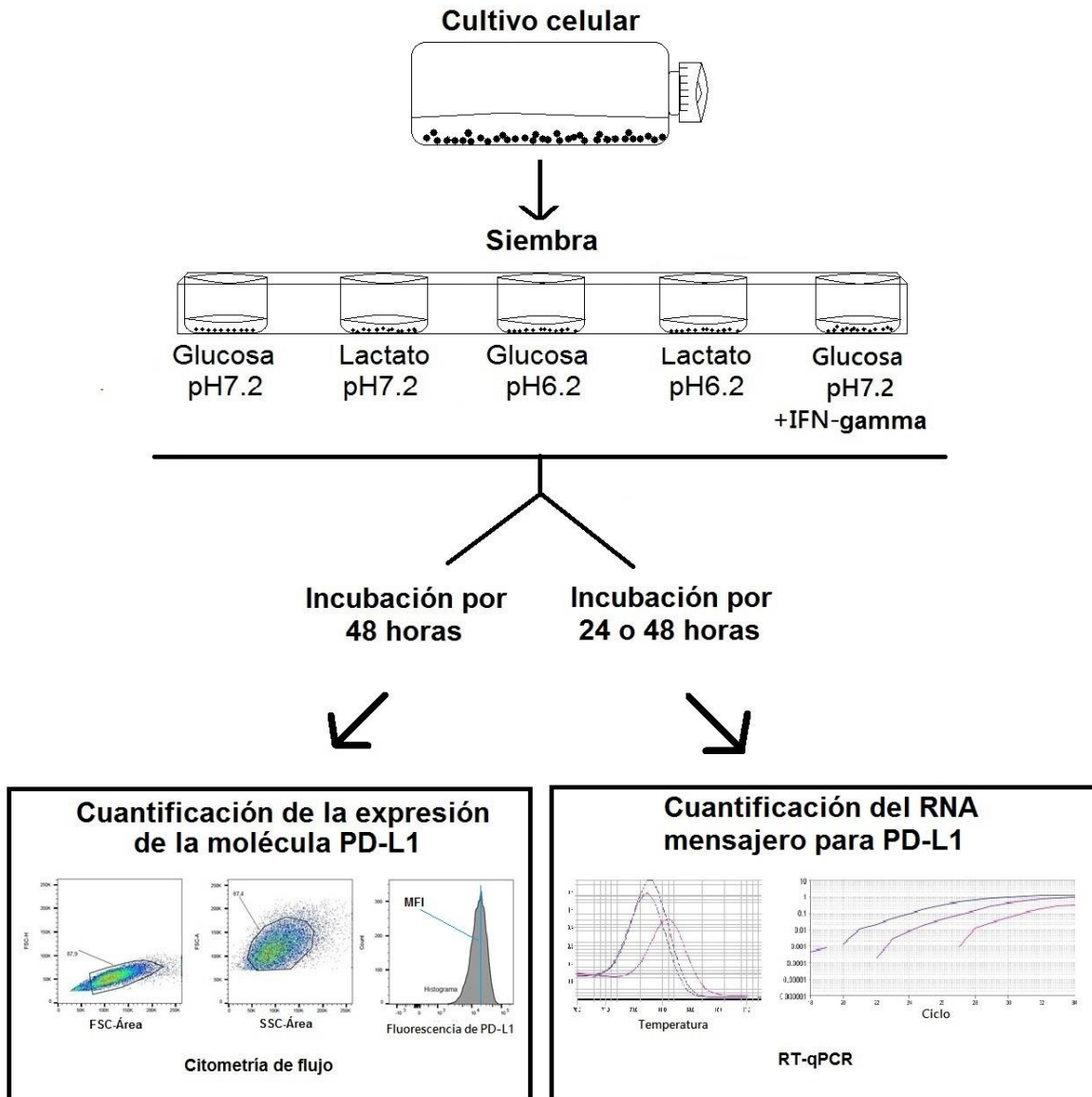


Figura 4. Esquema general de trabajo

Tinción celular y análisis de citometría de flujo para cuantificar la expresión de PD-L1 en la membrana celular

El cultivo se realizó por triplicado para cada condición. Transcurridas 48 horas de cultivo se cosecharon las células mediante tripsinización con la solución de tripsina-verseno, tras lo cual la acción de la tripsina se inactivó con medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% (El Ca^{2+} del suero fetal bobino inhibe la tripsina). Las células se colectaron en tubos de citometría y se lavaron con 1mL de PBS/BSA 1% con azida de sodio 0.1%.

Para el análisis en el citómetro de flujo, se ajustó el número celular a 5×10^4 para medir la expresión de la molécula PD-L1 en la superficie celular. Se utilizaron 2 μL por tubo de una dilución 5:1 de anticuerpo monoclonal antiPD-L1 marcado con ficoeritrina (PE) (clona 29E.2^a3, Biolegend).

Las células se lavaron con 1 mL de PBS/BSA 1% adicionado con azida de sodio 0.1% y a continuación se fijaron en 200 μL de paraformaldehído 1% p/v para su análisis en el citómetro de flujo BD FACS Canto II TM (BD Biosciences) (Figura 5). Se utilizó un tubo con células cultivadas en glucosa pH 7.2 sin anticuerpo antiPD-L1 como control negativo de citometría, para evaluar la fluorescencia basal de las células.

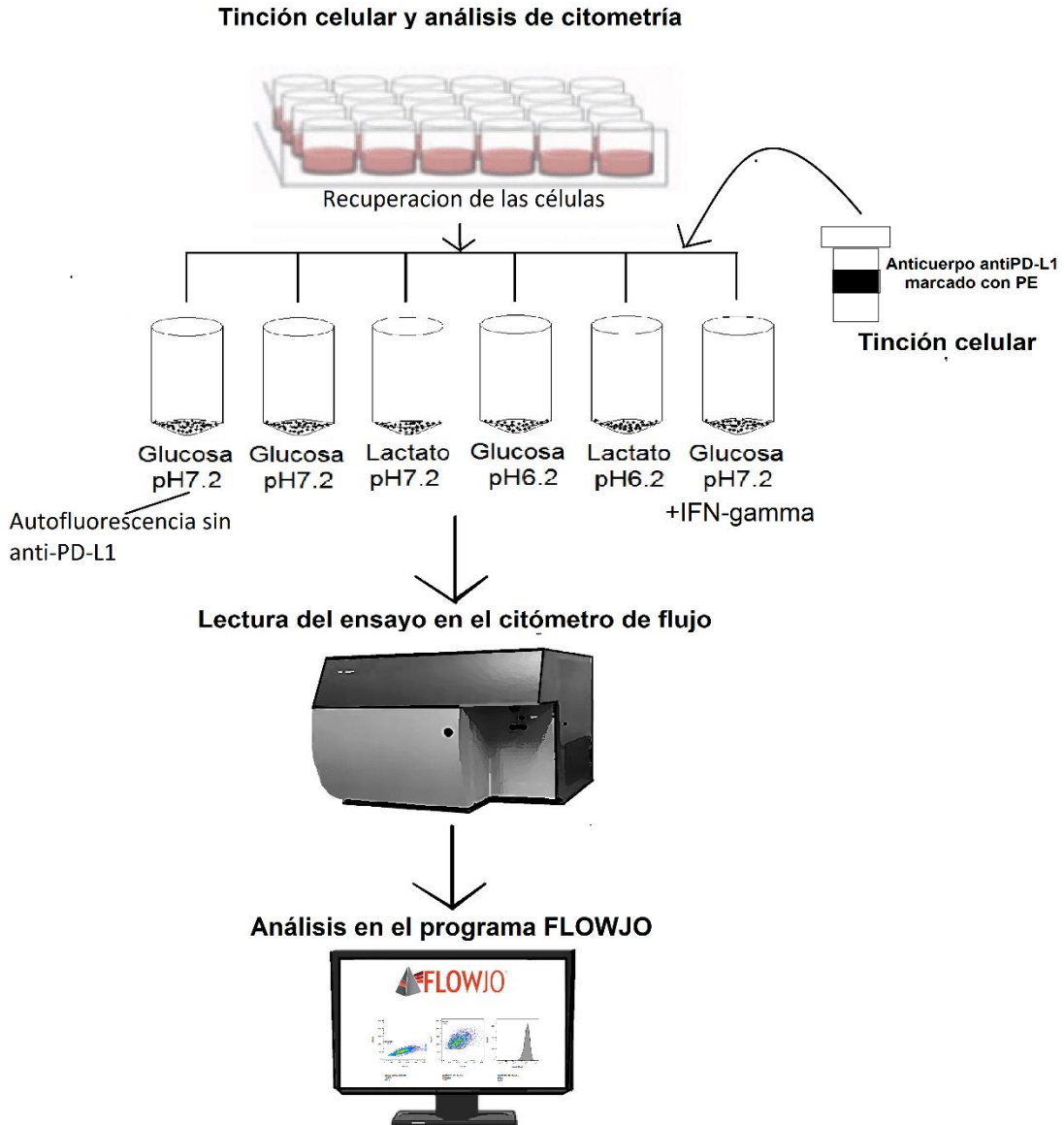


Figura 5. Tinción celular y análisis de la expresión de PD-L1 por citometría de flujo.

Para el análisis citométrico se utilizó el programa FlowJo® X (Becton Dickinson, Ashland, Oregon, EUA), el cual es un programa que permite la producción de tablas, gráficos y estadísticas al facilitar el análisis de las células conforme a sus atributos y de acuerdo con los anticuerpos con los que se han marcado.

Se realizó una prueba t de student a las intensidades medias de fluorescencia relativas (IMFr) para determinar si las diferencias con respecto a la condición con glucosa y pH 7.2 son significativas.

Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para determinar la expresión relativa del mensajero para PD-L1

Después de observar que las líneas celulares SK-MES-1 y A-427 presentaron incremento en la membrana de la molécula PD-L1, se realizó una RT-qPCR para observar la expresión relativa del mensajero para PD-L1 con respecto al medio control (glucosa pH 7.2). Dado que las líneas celulares A-549 y MCF-7 no expresaron diferencias en la expresión de PD-L1 en su membrana con respecto al medio control, a estas no se les realizaron las pruebas de RT-qPCR.

Para las RT-qPCR, los cultivos se realizaron por duplicado, y después de transcurridas las 24 o 48 horas de cultivo, se retiró el sobrenadante de los pozos y se añadió 1 mL de a TRIzol Reagent (Invitrogen, CA, EUA). Las células se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos, al tiempo que agitaron mecánicamente para facilitar la lisis celular; posteriormente, se recuperó todo el lisado celular en microtubos cónicos (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) (Figura 6).

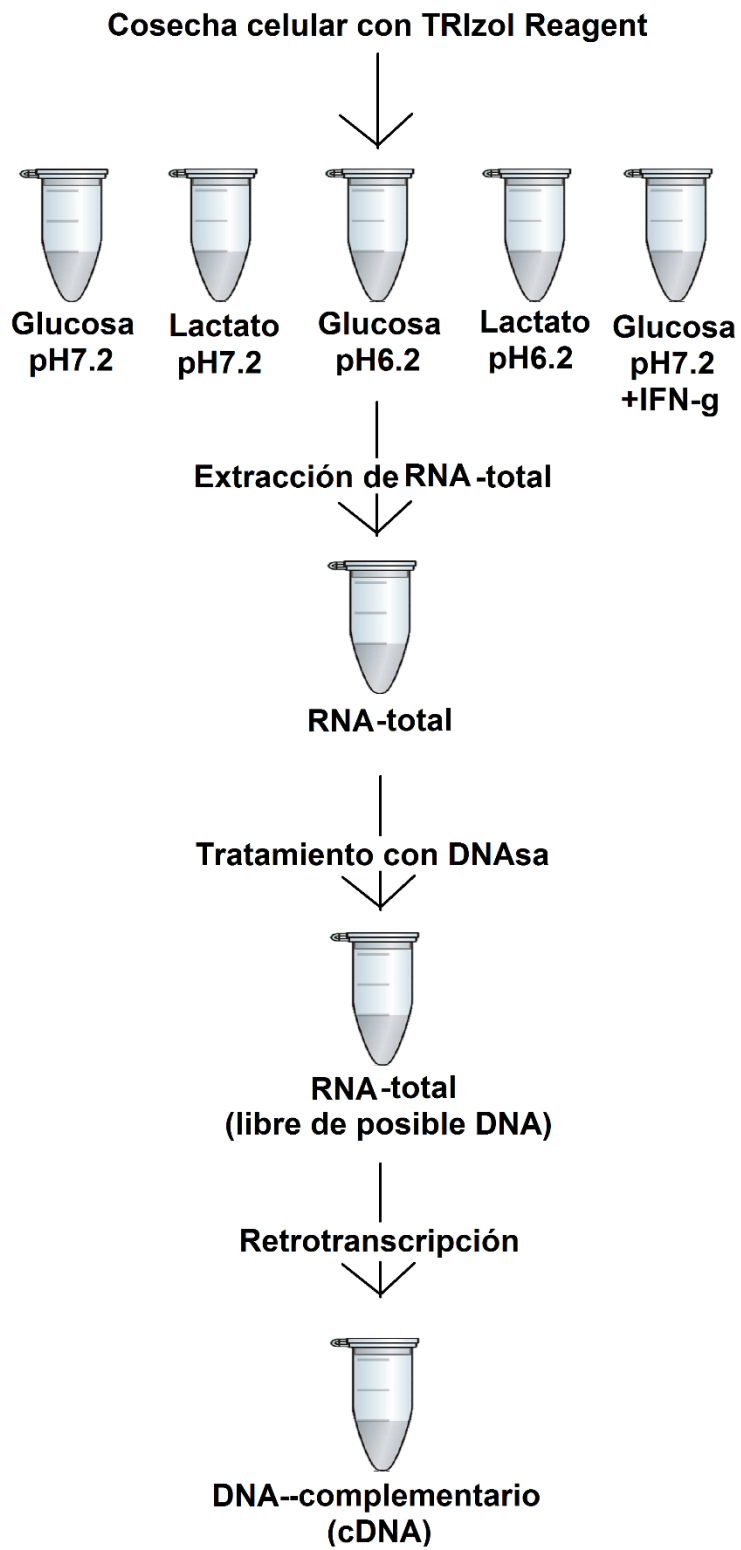


Figura 6. Obtención de mRNA total y retrotranscripción

Extracción, aislamiento y cuantificación de RNA

Para la extracción de RNA total, se añadieron 200 μ L de cloroformo por cada mililitro de TRIzol Reagent utilizado y se mezcló suavemente, a continuación, se centrifugó por 15 minutos a 12 000 r.p.m. a 4°C con lo que se obtuvieron tres fases.

Se recuperó la fase acuosa en otro tubo tipo eppendorf, al cual se le añadieron 500 μ L de isopropanol por cada mililitro de TRIzol Reagent para precipitar el RNA total y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó durante 10 minutos a 12000 r.p.m. a 4°C. y se obtuvo un botón de RNA total que se lavó con 500 μ L de etanol al 75% (v/v). Después de eliminar el sobrenadante se dejó secar el botón a temperatura ambiente dentro de la campana de flujo laminar y a continuación se disolvió el RNA total en 15 μ L de H₂O libre de RNAsas.

Para calcular la pureza y medir la concentración del RNA obtenido, se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) para determinar la absorbancia a las longitudes de onda de 260 y 280 nm.

Tratamiento con DNAsa y retrotranscripción

Antes de la retrotranscripción se realizó un tratamiento con DNAsa, para eliminar alguna posible contaminación con DNA genómico. Para 20 μ g de RNA-total se utilizaron 2 μ L de Buffer para DNAsa 10X más MgCl₂ (Thermo Scientific Waltham, Massachusetts, EUA), 2.5 μ L de DNAsa I-RNAsa-free (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) y se añadió H₂O c.b.p. 20 μ L. La mezcla se incubó en el termociclador a 37°C por 30 minutos, tras lo cual se añadieron 2.5 μ L de EDTA a 50 mM (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) para inactivar la DNAsa y se incubó una vez más a 65°C por 10 minutos.

Para la retrotranscripción del cDNA a partir del RNA total, se agregó 1 μ L de Oligo (dT) (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) y se incubó a 70°C por 10 minutos. Después de la incubación se agregaron 10.7 μ L de mix de RT (Tabla 1). Se incubó a 20°C 10 minutos y a continuación a 37°C por 60 minutos en el termociclador.

Para calcular la pureza y medir la concentración del cDNA obtenido, se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) para determinar la absorbancia a las longitudes de onda de 260 y 280 nm.

Tabla 1 Máster mix de Retrotranscripción.

Reactivo	Cantidad
First Strand Buffer 5x	6.7 µL
DTT 0.1 mM	2 µL
dNTPs 25 mM	1 µL
Inhibidor de RNAsa	0.3 µL
Enzima RT	1 µL
Vol. Total	10.7 µL

Validación del ensayo de qPCR

Las qPCR se realizaron en el termociclador ABI Prism 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se utilizaron placas de 96 pozos (Applied biosystems), y el marcador SYBR Green (SYBR® Select Master Mix Applied Biosystems) y los oligonucleótidos específicos para PD-L1 y HPRT-1, diseñados por la Dra. Susana Romero García y sintetizados en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (Tabla 2).

Como gen endógeno se utilizó HPRT-1 de acuerdo con la determinación realizada en la tesis de licenciatura de Aldo Osorio Ochoa (Osorio, 2016).

Tabla 2. Secuencias y características de los oligonucleótidos utilizados para la reacción de qPCR

	HPRT-1	PD-L1
Secuencia sentido (5'→3')	TGC TCG AGA TGT GAT GAA GG	TTG GTT GTG GAT CCA GTC AC
Secuencia antisentido (5'→3')	GAT GTA ATC CAG CAG GTC AG	TCA GGA CTT GAT GGT CAC TG
Temperatura de Fusión TM	60.00-64.75 °C	60.00-64.75 °C

i) Matriz de concentraciones de oligonucleótidos.

Se realizó una matriz de concentraciones para los oligonucleótidos HPRT-1 y PD-L1 (Tabla 3), para encontrar la concentración de oligonucleótidos con la que se obtiene la mejor señal del producto del qPCR.

Las concentraciones determinadas fueron 200 nM para los oligonucleótidos sentido y antisentido, tanto para PD-L1 como para HPRT-1.

Tabla 3. Concentraciones utilizadas para la matriz de Oligonucleótidos, tanto para HPRT-1 como para PD-L1.

Oligonucleótidos	Sentido	
Antisentido	200 nM / 200 nM	300 nM / 200 nM
	200 nM / 300 nM	300 nM / 300 nM

ii) Curva de disociación.

Para corroborar la especificidad de los oligonucleótidos, se incluyó una curva de disociación en el programa de PCR en tiempo real para cada par de oligonucleótidos: HPRT-1 y PD-L1 (Figura 7). La curva de disociación consiste en aumentar gradualmente la temperatura hasta los 95°C, con la finalidad de desnaturalizar la doble cadena de los productos obtenidos durante el PCR, posteriormente, se bajó gradualmente la temperatura hasta 60°C lo que renaturaliza las cadenas de DNA con la finalidad de ver cuantos picos de disociación hubo en esa reacción (Figura 7). Para cada par de oligonucleótidos específicos para un gen se observó un pico de disociación, asegurando la especificidad de la reacción.

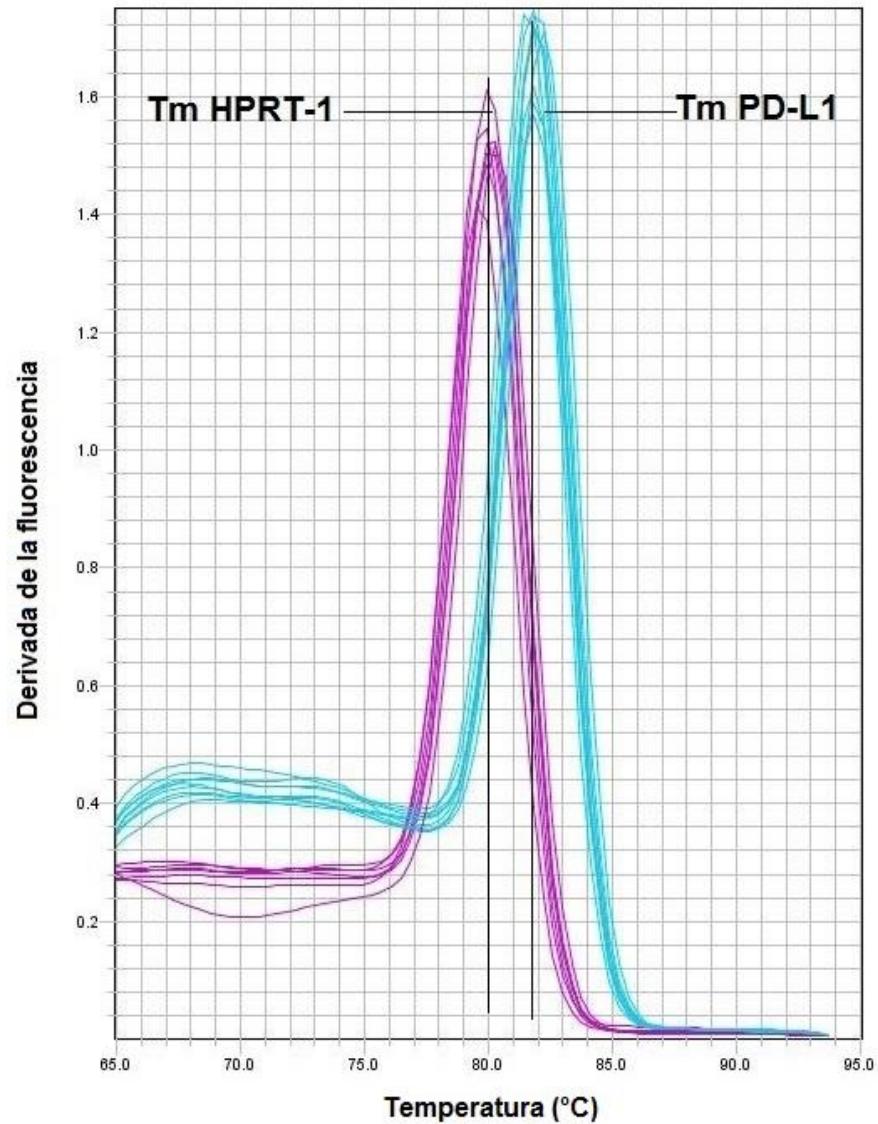


Figura 7. Curva de disociación. Cada línea del mismo color representa una concentración diferente de oligonucleótidos (ver tabla 3), con lo que comprobamos que, sin importar la concentración, los oligonucleótidos son específicos y la doble hebra de DNA amplificada se disocia a la misma temperatura. Se muestra también la Tm de los oligonucleótidos para PD-L1 y HPRT.

iii) Rango dinámico de concentración del cDNA.

Para determinar el rango dinámico se elige la concentración en la que el gen endógeno (HPRT-1) y el gen problema (PD-L1) amplifican a la misma velocidad en la reacción de qPCR. Se realizó una curva estándar para determinar el rango dinámico de la reacción (Figura 8).

El rango dinámico se definió utilizando distintas diluciones seriadas de cDNA y la concentración de oligonucleótidos previamente establecida (Tabla 5).

Para definir el rango dinámico, se realizó una curva estándar graficando la diferencia de Ct (ciclo umbral) de PD-L1 menos el Ct de HPRT1 en función del logaritmo de la concentración utilizada. La pendiente de la recta obtenida no debe ser mayor a 0.1, lo que indica que las velocidades de amplificación son similares (Figura 8). La concentración del cDNA utilizada para los ensayos fue 64 ng/ μ L.

Tabla 4. Diluciones seriadas del cDNA utilizadas para evaluar el rango dinámico. El rango dinámico se determinó entre 25 ng/ μ L y 160 ng/ μ L.

Muestra	Dilución	Concentración
1	1:10	160 ng/ μ L
2	1:2.5	64 ng/ μ L
3	1:2.5	25 ng/ μ L

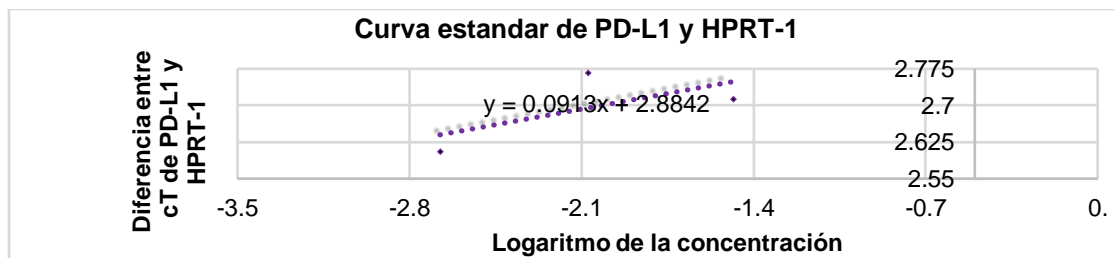


Figura 8. Curva estándar de HPRT-1 y PD-L1.

Determinación de la expresión relativa del RNA mensajero para PD-L1 usando RT-qPCR

De acuerdo con los resultados obtenidos en la validación del ensayo, se determinó que la concentración óptima para ambos oligonucleótidos (antisentido y sentido) es 200 nM, tanto para PD-L1 como para HPRT-1.

La curva de disociación para cada par de *primers* (PD-L1 y HPRT-1) indicó que son específicos para cada gen (Figura 6).

De acuerdo con la curva estándar, la concentración óptima de cDNA es 64 ng/μL. La pendiente de la ecuación de la curva estándar fue menor a 0.1 con lo que nos aseguramos de que HPRT-1 es un buen gen endógeno para esta reacción.

Una vez validados los ensayos de eficiencia y el rango dinámico se llevó a cabo la cuantificación relativa del mensajero de PD-L1, por medio de la técnica de PCR en tiempo real.

Después de incubar las líneas celulares en las 5 condiciones (glucosa, pH 7.2, glucosa, pH 6.2, lactato, pH 7.2, lactato, pH 6.2 y glucosa, pH 7.2 con Interferón), se aisló el RNA y se hizo la retrotranscripción. Posteriormente se utilizaron 64 ng/μL de cDNA para cada reacción de PCR en tiempo real.

Para correr cada ensayo, se etiquetaron 11 tubos para cada gen que corresponden a 5 tubos para la repetición "1", 5 tubos para la repetición "2" y un tubo para NTC.

Para llevar a cabo el ensayo, se realizaron 2 cocteles: uno para HPRT-1, y otro para PD-L1 (tabla 5). Este coctel corresponde a 10 reacciones (incluye 3 réplicas experimentales por muestra) más 1 reacción de NTC (incluye dos réplicas experimentales).

Cada reacción contenía 34 μL del coctel y 8 μL de la dilución del templado o cDNA (64 ng/μL), obteniendo un volumen de 42 μL (volumen suficiente para cargar cada reacción por triplicado en la placa). A cada tubo de NTC se le agregaron 23 μL del coctel y 5.5 μL agua libre de RNAsa obteniendo un volumen final de 28.5 μL (volumen suficiente para cargar cada reacción por duplicado en la placa).

En una placa de 96 pozos se cargaron triplicados de 13 μL por reacción y en el caso de los NTC, se cargaron duplicados de 13 μL por reacción.

El programa usado para la amplificación y cuantificación en el termociclador se muestra en la tabla 6.

Tabla 5. Coctel para cada reacción de qPCR.

Reactivos		Cantidad
SYBR Select Master Mix		6.5 μ L
Oligonucleótidos específicos	Para (PD-L1)	0.5 μ L (sentido y antisentido)
	Para (HPRT-1)	0.5 μ L (sentido y antisentido)
Agua libre de RNAsas		3 μ L
Vol. Final		13 μ L

Tabla 6. Programa usado en el termociclador para la amplificación y cuantificación de los genes de interés.

Ciclos	Tiempo	Temperatura
1	5 minuto	94°C
25	1 minuto	94°C
	1 minuto	60°C
	1 minuto	72°C
1	10 minutos	72°C
FIN	Infinito	4°C

Una vez finalizada la reacción de qPCR, el termociclador proporciona el ciclo umbral (Ct) de cada reacción. El ciclo umbral nos indica el momento en el que la amplificación supera al ruido o límite de detección del equipo. Un Ct pequeño indica que la muestra contenía una mayor cantidad de mensajero de un gen, que otra muestra con un Ct mayor.

Para el análisis de los datos de la reacción de qPCR se utilizó el método $\Delta\Delta\text{Ct}$. El método $\Delta\Delta\text{Ct}$ consiste en la normalización de los datos (Ct) con respecto a un gen endógeno (HPRT-1). Un gen endógeno constitutivo es aquel que está presente en todos los tipos celulares y mantiene su expresión constante en las células sin importar el estrés al que sean sometidas, lo que ayuda a eliminar los errores con respecto a la cantidad de cDNA entre las diferentes muestras.

Una vez normalizados los datos, se comparan con la condición control (glucosa pH 7.2), para así, obtener la diferencia en los niveles de expresión del transcrito de PD-L1 en las diferentes condiciones de tratamiento relativo a la expresión del PD-L1 en la condición control (glucosa pH 7.2).

Análisis de expresión relativa del mRNA para PD-L1 usando el método $\Delta\Delta Ct$

Para comparar los niveles de expresión del mRNA para PD-L1 se utilizó el método Delta Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$). Este método se utiliza para medir la magnitud de los cambios de expresión de genes en células debido a una condición problema y una condición control. En el método $\Delta\Delta Ct$ primero se normalizan los datos del ciclo umbral (Ct) del gen de interés (PD-L1) con respecto a los del gen endógeno (HPRT-1) obteniendo el ΔCt ;

$$\Delta Ct = (Ct_{\text{problema}} - Ct_{\text{gen_endógeno}}) \quad | \quad \Delta Ct = (Ct_{\text{PD-L1}} - Ct_{\text{HPRT-1}})$$

y después, se compara el ΔCt de las células en una condición problema respecto al ΔCt de las células en una condición control (glucosa pH 7.2);

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{\text{problema}} - \Delta Ct_{\text{control}}) \quad | \quad \Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{\text{problema}} - \Delta Ct_{\text{glucosa_pH7.2}}).$$

Estos datos fueron analizados a través del método comparativo utilizando la siguiente ecuación (Romero-García, 2014);

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Se utilizó la prueba T de Student para determinar si las diferencias de expresión relativa de PDL1 de las células tumorales cultivadas en diferentes condiciones de crecimiento con respecto a la condición con glucosa y pH 7.2 fueron significativas.

RESULTADOS

Análisis de la expresión relativa de la molécula PD-L1 en la membrana celular

Para analizar la expresión de la molécula PD-L1 en las líneas celulares, los datos se analizaron en un gráfico de dispersión (FSC-Altura contra FSA-Área) para discriminar los restos y agregados celulares (Figura 9-a); posteriormente, de la población seleccionada se hizo en un nuevo gráfico de dispersión, esta vez elaborando la gráfica de FSC-Área contra SSC-Área (Granularidad) para así seleccionar la población más homogénea en cuanto a tamaño y granularidad (Figura 9-b).

A continuación, se realizó un histograma para evaluar la intensidad media de fluorescencia (MFI, por sus siglas en inglés) de la señal correspondiente a la molécula PD-L1 marcada con anticuerpo antiPD-L1 (Figura 9-c). La intensidad media de fluorescencia está directamente relacionada con el nivel de expresión de la molécula PD-L1 en la membrana celular. De esta forma, se pudieron comparar las medias de fluorescencia que expresaron las células tratadas en los diferentes medios de cultivo con las células cultivadas en un medio control (glucosa y pH 7.2) (Figura 10). Como control positivo se utilizaron células a las que se les añadió IFN- γ ya que se ha visto que incrementa considerablemente la expresión de PD-L1 en células tumorales (Pérez-Hernández, 2010; Mojic, 2018).

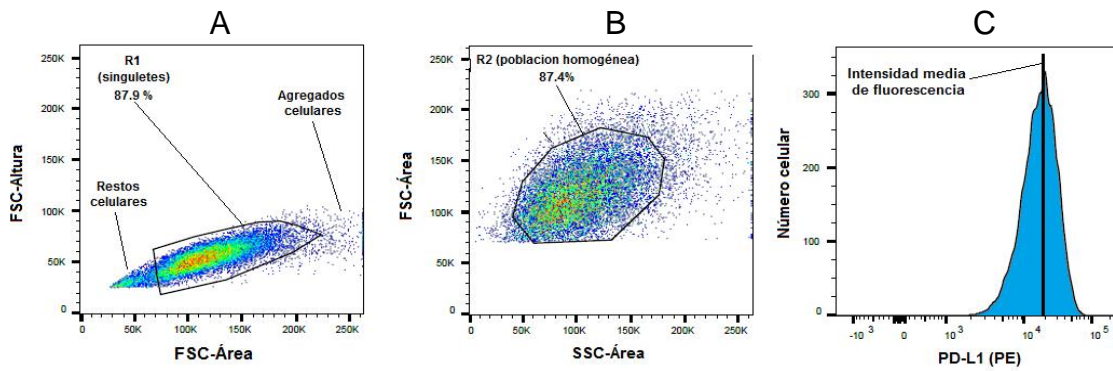


Figura 9. Análisis representativo por citometría de flujo de una línea celular tumoral. Se muestran las células SK-MES-1 con glucosa pH 6.2 utilizando el programa FlowJo X. En primer recuadro, la región R1 corresponde a la población de células individuales (singuletes) después de discriminar los agregados y restos celulares. Los números señalados en cada región corresponden al porcentaje de células totales que pertenecen a esta región. En el segundo recuadro, la región R2 corresponde a la población más homogénea en cuanto a tamaño y granularidad. En el último recuadro, se muestra el histograma de la región R2 y se marca la intensidad media de fluorescencia (MFI) para la molécula de membrana PD-L1.

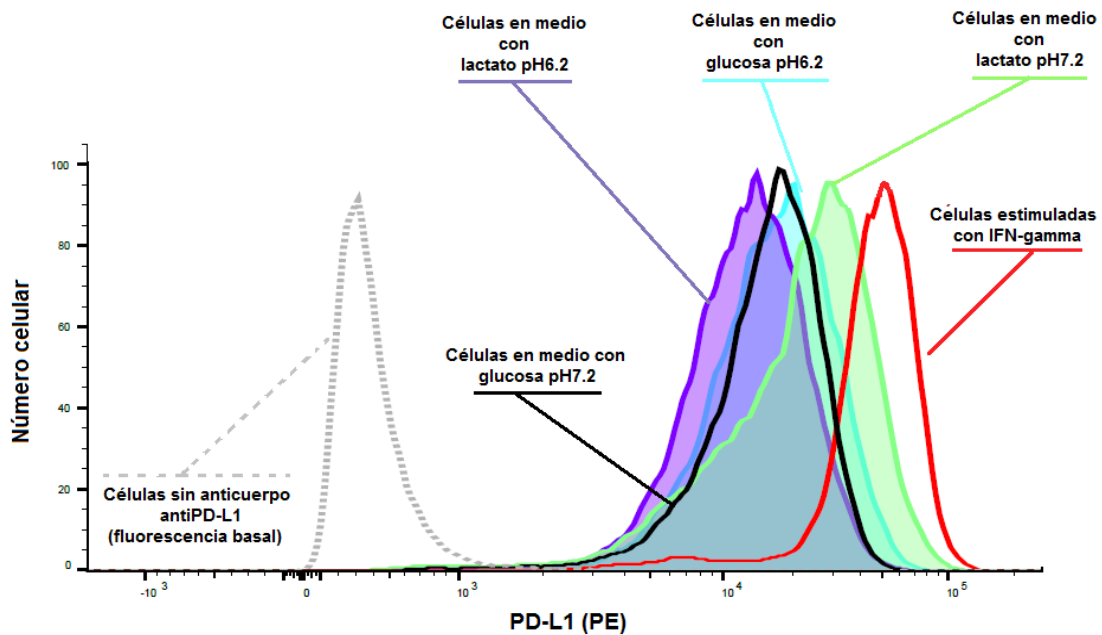


Figura 10. Histograma representativo donde se muestra la comparación de las MFI debidas a la inmunofluorescencia para PD-L1 en la línea celular SK-MES-1 a las 48 horas de cultivo en las diferentes condiciones.

Para comparar la expresión de la molécula PD-L1 en las líneas celulares cultivadas en las diferentes condiciones, los datos se normalizaron con respecto a la MFI de la condición con glucosa pH 7.2 (control):

$$\text{Intensidad media de fluorescencia relativa (rMFI)} = \frac{\text{media de fluorescencia PD-L1}_{\text{problema}}}{\text{media de fluorescencia PD-L1}_{\text{control}}}$$

La línea celular A-427 presentó un incremento significativo en la expresión de la molécula PD-L1 en todas las condiciones de cultivo al compararla con las células cultivadas en el medio de cultivo adicionado con glucosa pH 7.2 (Figura 11). En la condición adicionada con lactato y pH 7.2, la expresión de PD-L1 aumentó significativamente, en la condición adicionada con glucosa pH 6.2 la expresión de PD-L1 membranar aumento aún más y en el medio de cultivo adicionado con lactato pH 6.2 se observó la mayor expresión membranar de PD-L1.

En la línea celular SK-MES-1 no se observó un incremento significativo en la expresión membranar de PD-L1, al cultivarla en los diferentes medios de cultivo. Las células estimuladas con IFN- γ (control positivo) incrementaron significativamente ($p < 0.05$) la expresión de la molécula PD-L1 con respecto a la condición adicionada con glucosa pH 7.2.

En la línea celular MCF-7 (adenocarcinoma de mama) no se observó incremento en la expresión de la molécula PD-L1 (Figura 11).

En la línea celular A-549 no se incrementó la expresión de la molécula PD-L1 en la membrana con respecto a la condición adicionada con glucosa pH 7.2 en ninguna de las condiciones de cultivo a las que fueron expuestas; sin embargo, el control positivo (IFN- γ), mostró un incremento significativo.

Dado que las líneas celulares A-549 y MCF-7 no mostraron diferencias significativas en su expresión membranar de la molécula PD-L1 no se les realizó el análisis para comparar su expresión del mRNA para PD-L1 en las diferentes condiciones.

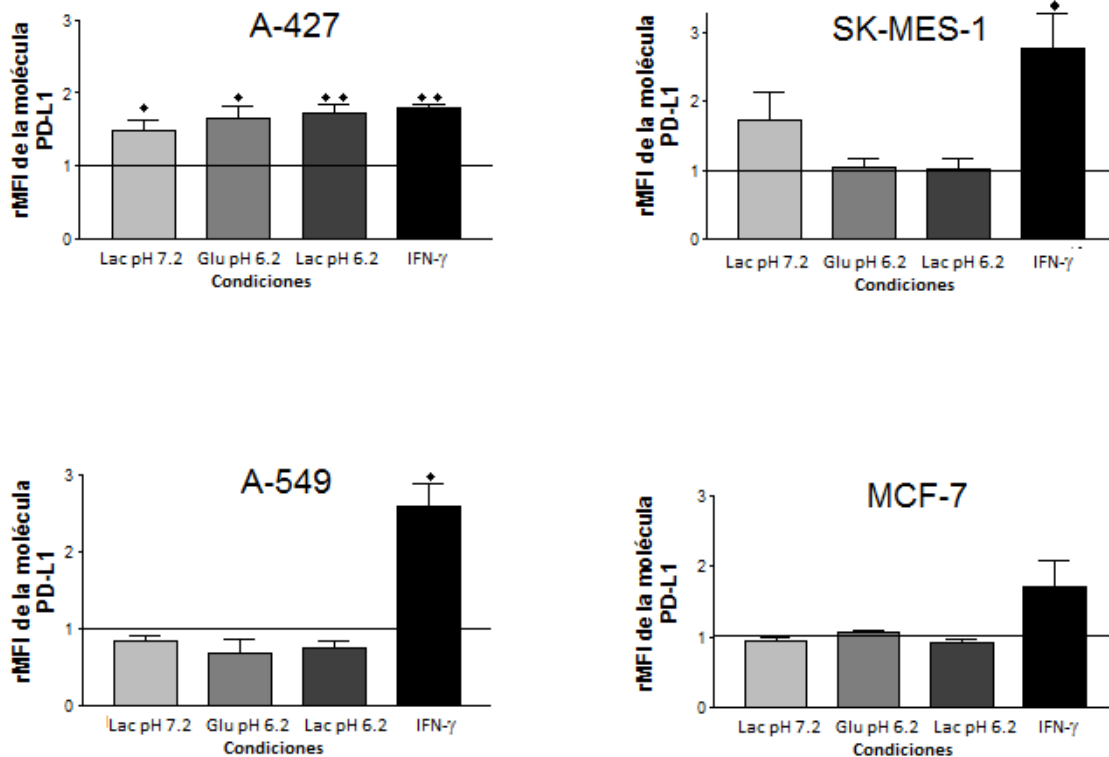


Figura 11. Expresión relativa de la intensidad media de fluorescencia (rMFI, medida por citometría de flujo) de la molécula PD-L1, expresada en la membrana celular de las líneas A-427, SK-MES-1, A-549 y MCF-7 cultivadas en un medio con lactato y un pH de 7.2 (Lac pH 7.2), medio con glucosa y un pH de 6.2 (Glu pH 6.2) y un medio con lactato con un pH de 6.2 (Lac pH 6.2) durante 48h. Se incluyó un pozo con células cultivadas en un medio adicionado con glucosa y un pH de 7.2 estimuladas con IFN- γ como control positivo (IFN- γ) y los datos se normalizaron con respecto a la MFI de las células cultivadas en un medio adicionado con glucosa pH 7.2. Diferencias significativas de ♦ p < 0.05 y ♦♦ p < 0.01. Los experimentos se repitieron 3 veces.

Expresión relativa del RNA mensajero para PD-L1 en las líneas celulares A-427 y SKMES-1.

En la línea celular A-427 incubada durante 24 horas, se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) en el mRNA para PD-L1 en las células cultivadas en la condición con lactato pH 7.2, al compararlas con las células cultivadas en medio control con glucosa pH 7.2 (Figura 12).

En la condición con glucosa pH 6.2 el mRNA para PD-L1 disminuyó significativamente ($p < 0.01$), mientras que para la condición con lactato pH 6.2 no se observaron diferencias significativas. Se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) en el mRNA para PD-L1 en las células estimuladas con IFN- γ (Figura 12).

A las 48 horas de cultivo, el mRNA para PD-L1 en las células A-427 se incrementó en la condición con lactato pH 6.2; sin embargo, este incremento no fue significativo. Por otro lado, en la condición con lactato pH 7.2 el mRNA para PD-L1 disminuyó significativamente ($p < 0.05$). En las condiciones con glucosa pH 6.2 no se observó diferencia del mRNA para PD-L1 al compararlo con su expresión en la condición control (glucosa pH 7.2) (Figura 12).

En la línea celular SK-MES-1 cultivada durante 24 horas, se observó un incremento significativo en todas las condiciones de cultivo. La condición con lactato pH 7.2 con una $p < 0.001$, la condición con glucosa pH 6.2 con una $p < 0.05$ y la condición con lactato pH 7.2 con una $p < 0.01$, así como en la condición estimulada con IFN- γ con una $p < 0.01$ (Figura 12).

En la línea celular SK-MES-1 cultivada durante 48 horas, hubo un incremento significativo en la condición con lactato pH 7.2 ($p < 0.01$) y en la condición con lactato pH 6.2 ($p < 0.01$) en comparación con el medio control (glucosa pH 7.2).

En la condición con glucosa pH 6.2 no se observaron diferencias significativas en la expresión del mRNA para PD-L1 al compararla con la condición control. Se observó un leve incremento en la condición estimulada con IFN- γ respecto a la condición glucosa pH 7.2; sin embargo, este incremento no fue significativo (Figura 12).

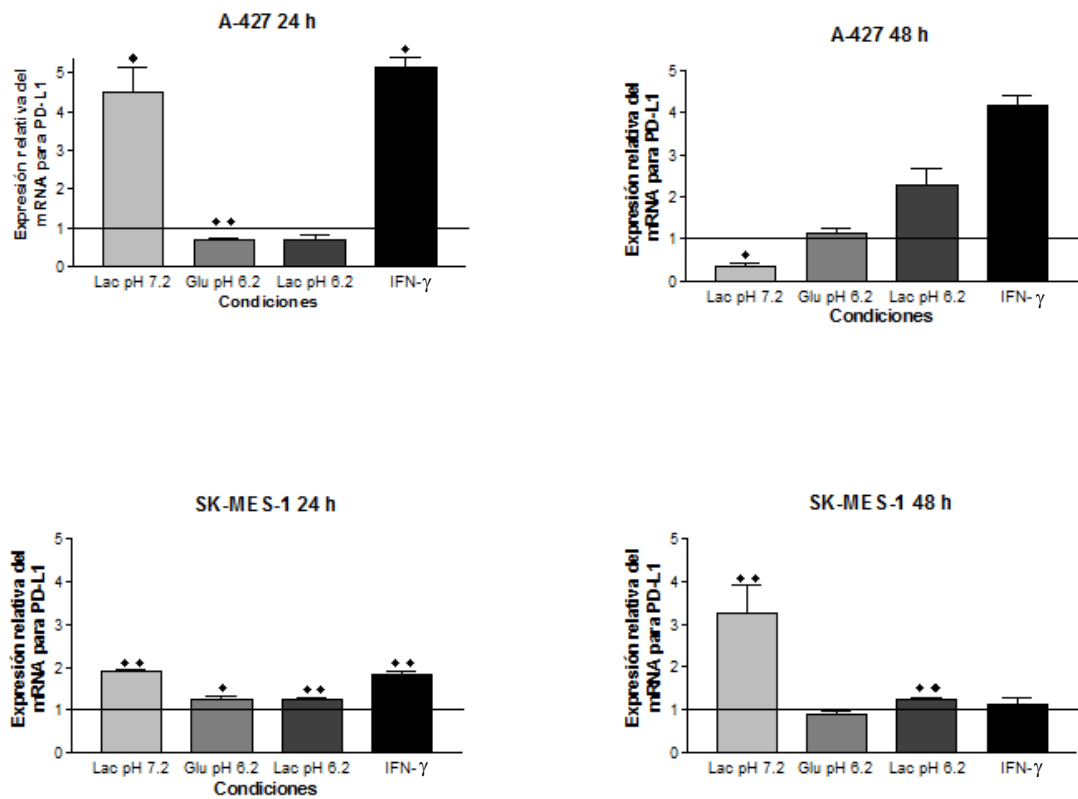


Figura 12. Expresión relativa del mRNA de PD-L1 en las líneas celulares A-427 y SK-MES-1 cultivadas durante 24 o 48 h en medio con glucosa y pH 6.2 (Glu pH 6.2), con lactato y sin glucosa a pH 7.2 (Lac pH 7.2) o pH 6.2 (Lac pH 6.2) respecto a la expresión de PD-L1 en las líneas celulares A-427 y SK-MES-1 cultivadas en medio con glucosa y pH 7.2 (Glu pH 7.2), que adquiere el valor de 1. También se incluyó, como control positivo, la expresión relativa de PD-L1 en las líneas celulares A-427 y SK-MES-1 cultivadas en medio con Glu pH 7.2, estimuladas con IFN-g. ♦ $p < 0.05$ y ♦♦ $p < 0.01$. diferencia significativa respecto a la condición control (Glu pH 7.2).

DISCUSIÓN

La molécula PD-L1 se sobreexpresa en algunos tipos de cáncer (Dong *et al.*, 2002; Strome & Chen, 2004; Wintterle *et al.*, 2003) y en diversas líneas celulares tumorales (Dong *et al.* 2002). Se ha asociado la sobreexpresión de PD-L1 en células tumorales con un mal pronóstico en pacientes con cáncer (Dong *et al.*, 2002; Escors, *et al.*, 2018), y se ha comprobado que después de la unión de PD-L1 con su receptor PD-1, se reduce la secreción de citocinas por parte de los linfocitos T (Jiang *et al.*, 2019), así como la producción de granzima-B (Prado-Garcia *et al.* 2017), contribuyendo con la evasión de los tumores a la acción de los linfocitos T citotóxicos.

Por otro lado, se ha sugerido que el lactato secretado por las células tumorales es importante para regular positivamente la agresividad del tumor (al menos en condiciones de hipoxia) ya que interviene en la activación de la vía del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1), que es un importante regulador del transporte de oxígeno, del aumento de la vascularización, del metabolismo anaerobio y de la proliferación celular (Sonveaux *et al.*, 2012). Además, como resultado del efecto Warburg, las células tumorales secretan una gran cantidad de lactato, lo que a su vez reduce el pH hasta valores de 6.0-6.5 (Xie *et al.*, 2014). El pH acidificado selecciona los fenotipos resistentes y también promueve la degradación de la matriz extracelular y el aumento de la invasividad de las células tumorales (Moellering *et al.*, 2008).

Utilizamos glucosa 10 mM ya que esta es la concentración en que habitualmente se realiza el mantenimiento de las líneas celulares y lactato 20 mM tomando en cuenta que, en el microambiente de los tumores sólidos, las concentraciones de lactato van de 3 hasta 40 mM y pueden llegar hasta un pH alrededor de 6.0 (Dai *et al.* 2013; Romero-Gacia *et al.* 2019; Prado-Garcia *et al.*, 2020). Utilizamos los medios de cultivo a un pH de 7.2 ya que este es el pH ideal para el mantenimiento de las líneas celulares, y un pH de 6.2, el cual también fue utilizado en un estudio anterior realizado por Prado-Garcia *et al.* 2020.

Además, Prado-Garcia *et al.* 2020 Observaron que en un cultivo con una concentración inicial de lactato 2mM y glucosa 10 mM, tras 48 horas de cultivo, el

medio de cultivo de las líneas celulares A-427 y A-549, tenía una concentración de lactato de 20 mM, y al pasar otras 48 horas, las células de este cultivo comenzaron a utilizar el lactato como fuente de carbono (Prado-Garcia et al. 2020).

Por lo anterior, analizamos la expresión de PD-L1 a nivel de proteína y mRNA en líneas tumorales cultivadas *in vitro* con lactato y pH ácido. Como control positivo de inducción de PD-L1 se incluyeron líneas celulares tratadas con IFN- γ , ya que el IFN- γ es uno de los factores que incrementan de manera importante la expresión de PD-L1 en la membrana y el mRNA para PD-L1 (Pérez-Hernández, 2010; Mojic *et al.*, 2018), y observamos que dicha citocina incrementó la expresión de PD-L1 entre 2 y 5 veces en todas las líneas celulares tanto a las 24 como a las 48 horas de cultivo. Cabe mencionar que a la fecha sólo hay un reporte previo que estudia la modulación de la expresión de PD-L1 por lactato en dos líneas celulares de cáncer pulmonar (Feng *et al.*, 2017). En nuestro estudio, las líneas celulares que usamos proliferaron en los medios de cultivo suplementados con lactato a pH 6.2 y 7.2, lo que concuerda con un reporte previo, en el que se demuestra que el lactato puede ser utilizado como fuente de carbono (Romero-García & Prado-Garcia et al., 2019).

En las líneas celulares A-427 y SK-MES-1 la condición con lactato incrementó la expresión membranal de la molécula PD-L1 en pH 7.2. Cabe destacar que estas dos líneas pertenecen a derrames pleurales de cáncer de pulmón, los cuales se presentan en etapas tardías del cáncer (Giard *et al.*, 1973; Memorial Sloan Kettering Cancer Center, 2020). Por otro lado, las líneas celulares A-549 y MCF-7 que provienen de tumores primarios y se consideran modelos de la enfermedad en etapas tempranas (Foster *et al.*, 1998; JoEllen, 2013; Cejalvo *et al.*, 2017 (Figura 11). Estos resultados contrastan con los observados por Feng *et al.* en 2017, quienes observaron que la expresión de PD-L1 tanto a nivel de la proteína como en su mRNA es dependiente de la concentración de lactato (10, 20 y 30 mM) en las líneas celulares de cáncer de pulmón A-549 y H1299 (H1299 derivada de un sitio metastásico). Los autores atribuyen el efecto del lactato a un mecanismo por el cual, el lactato inhibe la producción de cAMP y la actividad de la vía PKA a través de su receptor GPR81, lo

que induce la regulación positiva de PD-L1 dependiente del coactivador transcripcional TAZ (Feng *et al.*, 2017).

Las células A-427 tratadas en los medios de cultivo con lactato pH 7.2, glucosa pH 6.2 y lactato pH 6.2 durante 48 horas, presentaron un incremento en la expresión de PD-L1 a nivel de membrana; sin embargo, dicho efecto no lo observamos a nivel de mRNA, lo que podría deberse a una menor actividad en la transcripción provocada por la acidosis en los medios con un de pH 6.2; las células posiblemente están activando otras vías metabólicas para su supervivencia (Romero-Garcia *et al.*, 2019). Un fenómeno similar podría ocurrir en las células SK-MES-1, en las que la expresión de PD-L1 en su membrana no se vio modificada con respecto a la condición control.

Por otro lado, al someterlas a los diferentes medios de cultivo, las líneas celulares A-549 y MCF-7 no mostraron diferencias en su expresión membranal de PD-L1 al compararlas con el medio control con glucosa pH 7.2, esto podría deberse a que estas líneas celulares provienen de tumores primarios. Estas líneas celulares sí incrementaron la expresión de PD-L1 al estimularlas con IFN- γ .

Así, nuestros datos sugieren que no todas las líneas celulares incrementan la expresión de PD-L1 a las 48 horas de estar cultivadas con lactato. Lo anterior puede deberse a diferencias en su origen ya que la línea celular A-549 de cáncer de pulmón y la línea celular MCF-7 de adenocarcinoma de mama provienen de tumores primarios, los cuales son menos agresivos y más susceptibles a ser eliminados, (Cejalvo *et al.*, 2017; Fogh,1986). En cambio, las líneas SK-MES-1 y A-427 provienen de estadios más avanzados y de sitios metastásicos (Fogh,1986). Por lo que suponemos que la molécula PD-L1 tiene una mayor expresión en líneas celulares provenientes de tumores más agresivos, los cuales han logrado modificar en mayor medida su microambiente, a uno más ácido y rico en lactato.

Medimos la expresión de PD-L1 en la membrana celular a las 48 horas, tomando en cuenta que en el estudio de Prado-Garcia *et al.* 2020, a las 8 horas, los medios

de cultivo con lactato pH 7.2 y con lactato pH 6.2 están libres de glucosa (Romero-Garcia 2019), por lo que a las 24 horas aseguramos un consumo de lactato por las células tumorales y a las 48 horas una expresión de PD-L1 en la membrana celular.

Es necesario medir la expresión de PD-L1 en cada línea celular, antes de 24 y después de 48 horas para obtener un panorama más amplio sobre la expresión de esta molécula con respecto al tiempo de exposición de las células al medio y averiguar si existe un mínimo y un máximo en la expresión de PD-L1 con respecto al tiempo. Al respecto, Romero-Garcia *et al.* 2019 reportaron que existe una fase de adaptación al medio de cultivo, la cual es diferente para cada línea celular, por lo que es de esperar que el momento en que PD-L1 se sobreexpresa puede variar de una manera diferente en cada línea celular (Romero-Garcia *et al.* 2019).

Ahora bien, ya que sabemos que el lactato es un factor importante en el microambiente tumoral para la expresión de PD-L1 en células tumorales, será necesario averiguar el efecto del lactato sobre la expresión de PD-L1 en células no tumorales (fibroblastos y CMN). También sería importante evaluar la expresión de PD-L1 en células tumorales en cocultivo con linfocitos T y en presencia de altas concentraciones de lactato, para comprobar si la función efectora de los linfocitos T disminuye aún más que en condiciones donde no hay abundancia de esta fuente de carbono. Además, sería necesario analizar la vía por la cual el lactato interviene en la sobreexpresión de PD-L1, para así poder mejorar los tratamientos dirigidos contra los tumores.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las líneas celulares A-549 y MCF-7 no modifican la expresión de la molécula PD-L1 en la membrana a las 48 horas de cultivo en un medio con lactato o glucosa como fuente principal de carbono y un pH de 7.2 o 6.2.

El lactato en el medio de cultivo celular resultó ser un elemento importante para la sobreexpresión de PD-L1 en las líneas celulares A-427 y SK-MES-1. Por lo que la hipótesis se cumplió para estas dos líneas celulares.

Por lo anterior, planteamos la hipótesis final de que una alta concentración de lactato en el microambiente tumoral es relevante para la evasión al sistema inmune de las células tumorales.

La hipótesis anterior, requiere de la continuación de este trabajo de investigación para medir la expresión de la molécula PD-L1 en la membrana celular a las 24 horas en un cultivo adicionado con lactato o glucosa y un pH de 7.2 o 6.2 y así, poder comparar esta expresión con el mRNA a las 24 horas. Además, se requeriría realizar ensayos a las 8, 72 y 96 horas de cultivo para poder realizar una comparación con respecto al tiempo de la molécula PD-L1 y comprobar si existe una relación entre el tiempo de exposición al microambiente adicionado con lactato o un pH de acidificado y la sobreexpresión de PD-L1. También, sería necesario hacer cultivos en células no tumorales para medir si los medios de cultivo aquí utilizados modifican su expresión PD-L1.

Lo anterior proporcionará un panorama más amplio sobre el comportamiento de la molécula PD-L1 en un microambiente común en los tumores in vivo; es decir con lactato o glucosa como principal fuente de carbono y un pH acidificado o neutro.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas A. K., Lichtman A. H. & Pillai S. (2018). Cellular and molecular Immunology. Ed. Elsevier. 9° edicion. 665 p.
- Allen, P. B. & Gordon, L. I. (2016). PD-1 blockade in Hodgkin's lymphoma: learning new tricks from an old teacher. *Expert Rev. Hematol.* 9 (10), 939–949.
- Arnaiz-Villena A., Regueiro J.R. & López-Larrea C. (1995). *Inmunología* Ed. Madrid: Complutense. 311 p.
- American Type Culture Collection (ATCC). Consultado el 01 de noviembre de 2019 <https://www.atcc.org/en.aspx>
- Barar J. & Omid Y. (2013). Dysregulated pH in tumor microenvironment checkmates cancer therapy. *Bioimp.* 3 (4), 149-162.
- Barsoum I.B., Smallwood C.A., Siemens D.R. & Graham C.H. (2014). A mechanism of hypoxia-mediated escape from adaptive immunity in cancer cells. *Cancer Res.* 74 (3), 665–674.
- Bai J., Gao Z., Li X. & Dong L., *et al.* (2017). Regulation of PD-1/PD-L1 pathway and resistance to PD-1/PD-L1 blockade. *Oncotarget.* 8 (66), 110693-110707.
- Blank C., Brown I., Peterson A.C., Spiotto M., *et al.* (2004). PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+T cells. *Cancer Res.* 64 (3), 1140–1145.
- Brahmer J.R., Tykodi S.S., Chow L. Q. M., Hwu W-J, *et al.* (2012). Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N. Engl. J. Med.* 366 (26), 2455–2465.
- Cejalvo J. M., Martínez de Dueñas E., Galván P., García-Recio S., *et al.* (2017). Intrinsic Subtypes and Gene Expression Profiles in Primary and Metastatic Breast Cancer. *Cancer Res.* 77 (9), 2213-2221.
- Clark C. A., Gupta H. B., Sareddy G., Pandeswara S., *et al.* (2016). Tumor-Intrinsic PD-L1 signals regulate cell growth, pathogenesis, and autophagy in ovarian cancer and melanoma. *Cancer Res.* 76 (23), 6964–6974.
- Clave S., Pijuan L., Casadevall D., Taus A., *et al.* (2018). CD274 (PD-L1) and JAK2 genomic amplifications in pulmonary squamous-cell and adenocarcinoma patients. *Histopat.* 72 (2), 259–269.
- Chang C.H., Curtis J.D., Maggi Jr L.B., *et al.* (2013). Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell.* 153 (6), 1239-1251.
- Chang C. H., Qiu J., O'Sullivan D., Buck M.D., *et al.* (2015). Metabolic competition in the tumor microenvironment is a driver of cancer progression. *Cell.* 162 (6), 1229–1241.
- Chen J., Jiang C. C., Jin L. & Zhang X. D. (2016). Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer. *Ann. Oncol.* 27 (3), 409–416.

- Curry J.M., Tuluc M., Whitaker-Menezes D., Ames J.A., *et al.* (2013). Cancer metabolism, stemness and tumor recurrence: MCT1 and MCT4 are functional biomarkers of metabolic symbiosis in head and neck cancer. *Cell Cycle*. 12 (9), 1371–1384.
- Dai C., Sun F., Zhu C. & Hu X. (2013). Tumor environmental factors glucosa deprivation and lactic acidosis induce mitotic chromosomal instability an implication in aneuploid human tumors. *PLoS One*. 8 (5), e63054.
- Dong H., Strome S.E., Salomao D. R., Tamura H., *et al.* (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* 8 (8), 793–800.
- Dong H., Zhu G., Tamada K. & Chen L. (1999). B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat. Med.* 5 (12), 1365–1369.
- Escors D., Gato-Cañas M., Zuazo M., Arasanz H., García-Granda M. J., Vera R., & Kochan G. (2018). The intracellular signalosome of PD-L1 in cancer cells. *Sign. Transduct. and Target. Therap.* 3 (1), 1–9.
- Feng J., Yang H., Zhang Y., Wei H., *et al.* (2017). Tumor cell derived lactate induces TAZ-dependent upregulation of PD-L1 through GPR81 in human lung cancer cells. *Oncog.* 36 (42), 5829-5839.
- Fogh J. (1986). Human Tumor Lines for Cancer Research. *Cancer Inv.* 4(2), 157-184.
- Foster K.A., Oster C.G., Mayer M.M., Avery M.L. & Audus K.L. (1998). Characterization of the A-549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Exp Cell Res.* 243 (2), 359-366.
- GCO. Global Cancer Observatory. (2018). Consultado el 13 de Junio de 2020. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>
- Giard D.J., Aaronson S.A., Todaro G.J., Arnstein P., Kersey J. H., Dosik H. & Parks W. P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 51 (5), 1417-1423.
- Ginsberg S. M., Grewal K. R. & Heelan T. R. (2007). Lung Cancer. *Radiol Clin. North. Am.* 45 (1), 21-43.
- Goltz D., Gevensleben H., Dietrich J., & Dietrich D. (2016). PD-L1 (CD274) promoter methylation predicts survival in colorectal cancer patients. *Oncoimmunol.* 6 (1), e1257454.
- Goldsby R.A., Kindt T. J., Osborne B.A. & Kubly J. (2007). *Inmunología*. Editorial Mc Graw Hill. 6º edic. México D.F. 697 p.
- Gowrishankar K., Gunatilake D., Gallagher S. J., Tiffen J., Rizos H. & Hersey P. (2015). Inducible but not constitutive expression of PD-L1 in human melanoma cells is dependent on activation of NF-kappaB. *PLoS One*. 10 (4), e0123410.
- Granados G. M. & Gómez H. Á. (1999). *Manual de Oncología. Procedimientos médico quirúrgicos*. Editorial Mc Graw Hill. 4º edic. México D.F. 1364 p.

- Gullino P.M., Grantham F.H. & Courtney A.H. (1967). Glucose consumption by transplanted tumors in vivo. *Cancer Res.* 27 (6), 1031–1040.
- Hanahan D. & Folkman J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 86 (3), 353–364.
- Hanahan D. & Weinberg R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 144 (5), 146-674.
- He X. H., Xu L. H., & Liu Y. (2005). Identification of a novel splice variant of human PD-L1 mRNA encoding an isoform-lacking Igv-like domain. *Acta Pharmacol. Sin.* 26 (4), 462–468.
- Hu Z. I., Ho A. Y., & McArthur H. L. (2017). Combined radiation therapy and immune checkpoint blockade therapy for breast cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 99 (1), 153–164.
- IARC. Latest Global Cancer Data: Cancer Burden Rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. (2018). Consultado el 12 de Junio de 2020. http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2018/pdfs/pr263_E.pdf.
- Ikeda S., Okamoto T., Okano S., Umemoto Y., *et al.* (2016). PD-L1 Is upregulated by simultaneous amplification of the PD-L1 and JAK2 genes in non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* 11 (1), 62–71.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Consultado el 30 de Julio de 2019 <https://www.inegi.org.mx/default.html>
- Jemal A., Vineis P., Bray F., Torre L. & Forman D. (2014). El Atlas del cáncer. American Cancer Society. 2° ed. Atlanta, GA. 136 p. Recuperado el 20 de agosto de 2018. www.cancer.org/canceratlas.
- Jiang B. (2017). Aerobic glycolysis and high level of lactate in cancer metabolism and microenvironment. *Genes Dis.* 4 (1), 25-27.
- Jiang X., Wang J., Deng X., Xiong F., *et al.* (2019). Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape. *Mol. Cancer.* 18 (10), 1-17.
- JoEllen W. (2013). *Animal Models for the Study of Human Disease*. Ed. Academic Press; P. Michael Conn. 1018 p.
- Keir M. E., Butte M. J., Freeman G. J. & Sharpe A. H. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 26 (1), 677–704.
- Koukourakis M. I., Giatromanolaki A., Simopoulos C., Polychronidis A. & Sivridis E. (2005). Lactate dehydrogenase 5 (LDH5) relates to up-regulated hypoxia inducible factor pathway and metastasis in colorectal cancer. *Clin. Exp. Metastasis* 22 (1), 25–30.
- Marchiq I. & Pouyssegur J. (2016). Hypoxia, cancer metabolism and the therapeutic benefit of targeting lactate/H(C) symporters. *J. Mol. Med.* 94 (2), 155–171.
- Memorial Sloan Kettering Cancer Center. (2020). SK-MES-1: Lung Cancer Cell Line. Recuperado el 03 de agosto de 2020.

<https://www.mskcc.org/research-advantage/support/technology/tangible-material/sk-mes-1-lung-cell-line>

- Moellering R.E., Black K.C., Krishnamurty C., Baggett B. K., Stafford P., Rain M., Gatenby R. A., Gillies R. J. (2008). Acid treatment of melanoma cells selects for invasive phenotypes. *Clin. Exp. Metastasis*. 25 (4), 411-425.
- Mojic M., Takeda K. & Hayakawa Y. (2018). The Dark Side of IFN- γ Its Role in Promoting Cancer Immuno-evasion. *Int. J. Mol. Sci.* 19 (89), e89.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017). Cáncer. Nota descriptiva. Recuperado el 08 de junio de 2019: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Ortega A.D., Sánchez-Aragó M., Giner-Sánchez D., Sánchez-Cenizo L., Willers I. & Cuezva. J. M. (2009). Glucose avidity of carcinomas. *Cancer Lett.* 276 (2), 125-135.
- Osorio O. A., (2016). Análisis de la expresión de los ARNm de las moléculas PD-L1 y PD-L2 en líneas celulares de cáncer pulmonar. Tesis de Licenciatura. Escuela de Biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).
- Palmer C. S., Ostrowski M., Balderson B., Christian N. & Crowe S. M. (2015) Glucose metabolism regulates T cell activation, differentiation, and functions. *Front. Immunol.* 6 (1), 1-6.
- Parham P. & Janeway C. A. (2006). *Inmunología*. Ed. Medica Panamericana. 2° ed. Buenos Aires. 545 p.
- Pérez-Hernández E. G. (2010). Efecto del interferón gamma en la expresión de las moléculas PD-L1 y PD-L2 en líneas celulares de carcinoma pulmonar y determinación de la funcionalidad de PD-L1. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
- Prado-Garcia H., Romero-Garcia S., Puerto-Aquino A. & Rumbo-Nava U. (2017). The PD-L1/PD-1 pathway promotes dysfunction, but not “exhaustion”, in tumor-responding T cells from pleural effusions in lung cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* 66 (6), 765-776.
- Prado-Garcia H., Campa-Higareda A. & Romero-Garcia S. (2020). Lactic Acidosis in the Presence of Glucose Diminishes Warburg Effect in Lung Adenocarcinoma Cells. *Font. Oncol.* 10 (807).
- Qin T., Zeng Y.D., Qin G., Xu F., *et al.* (2015). High PD-L1 expression was associated with poor prognosis in 870 Chinese patients with breast cancer. *Oncotarget.* 6 (32), 33972–33981.
- Quail D.F. & Joyce J.A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* 19 (11), 1423–1437.
- Robainas, M., Otano, R., Bueno, S., & Ait-Oudhia, S. (2017). Understanding the role of PD-L1/PD-1 pathway blockade and autophagy in cancer therapy. *Onco Targets Ther.* 10 (1), 1803–1807.

- Romero-Garcia S., Lopez-Gonzalez J. S., Báez-Viveros J. L., Aguilar-Cazares D. & Prado-Garcia H. (2011). Tumor cell metabolism: An integral view. *Cancer Biol. & Ther.* 12 (11), 939–948.
- Romero-Garcia S., Prado García H. & Lopez-Gonzalez J.S. (2014). Transcriptional análisis of hnRNPA0, A1, A2, B1, and A3 in lung cancer cell lines in response to acidosis, hypoxia, and serum deprivation conditions. *Exp. Lung Res.* 40 (1), 12-21.
- Romero-Garcia S., B. Moreno-Altamirano M. M., Prado-Garcia H. & Sánchez-García S. J. (2016). Lactate Contribution to the Tumor Microenvironment: Mechanisms, effects on immune Cells and Therapeutic Relevance. *Front. Immunol.* 7 (52), 1-11.
- Romero-Garcia S. & Prado-Garcia H. (2019). Mitochondrial calcium: Transport and modulation of cellular processes in homeostasis and cancer (Review). *Int. J. Oncol.* 54 (4), 1155-1167
- Romero-Garcia S., Prado García H., Valencia-Camargo A. D. & Alvarez-Pulido A. (2019). Lactic Acidosis Promotes Mitochondrial Biogenesis in Lung Adenocarcinoma Cells, Supporting Proliferation Under Normoxia or Survival Under Hypoxia. *Front. Oncol.* 9 (1053), 1-13.
- Ruf M., Moch H. & Schraml P. (2016). PD-L1 expression is regulated by hypoxia inducible factor in clear cell renal cell carcinoma. *Int. J. Cancer.* 139 (2), 396–403.
- Sauer L.A., Stayman J.W. 3rd. & Dauchy R.T. (1982). Amino acid, glucose, and lactic acid utilization in vivo by rat tumors. *Cancer Res.* 42 (10), 4090–4097.
- Sonveaux P., Copetti T., De Saedeleer C.J., Végran F., *et al.* (2012). Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis. *PLoS One.* 7 (3). e33418
- Soule, HD., Vazquez J., Long A., Albert S., Brennan M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. of the National Cancer Institute.* 51 (5). 1409–1416.
- Street S. E., Cretney E. & Smyth M. J. (2001). Perforin and interferon- γ activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood.* 97, 192–197.
- Strome S.E., Dong H., Tamura H., Voss S.G., *et al.* (2003). B7-H1 blockade Augments adoptive T-Cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 63 (19), 6501–6505.
- Strome S.E. & Chen L. (2004). Costimulation-based immunotherapy for head and neck cancer. *Curr. Treat. Options Oncol.* 5 (1), 27–33.
- Thompson R.H., Gillett M.D., Cheville J.C., Lohse C.M., *et al.* (2004). Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (49), 17174-17179.
- Topalian S.L., Hodi F.S., Brahmer J.R., Gettinger S.N., *et al.* (2012). Activity, and immune correlate of anti-PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.* 366 (26), 2443-2454.

- Vargas-Rojas M. I., Jiménez-Álvarez L., Ramírez G., Torres-García D., Barquera R., Gastelum-Martínez A. A. & Zúñiga J. (2008). PD-1 y sus ligandos como reguladores de la respuesta inmune. *Rev del Inst. Nal. de Enf. Resp.* 21 (4), 272-279.
- Walenta S., Wetterling M., Lehrke M., Schwickert G., Sundfjør K., Rofstad E.K. & Mueller-Klieser W. (2000). High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res.* 60 (4), 916–921.
- Wang, C., Yu, X., & Wang, W. (2016). A meta-analysis of efficacy and safety of antibodies targeting PD-1/PD-L1 in treatment of advanced non small cell lung cancer. *Med.* 95 (52), e5539.
- Wang Y., Wang H., Yao H., Li C., Fang J-Y. & Xu J. (2018). Regulation of PD-L1: emerging routes for targeting tumor immune evasion. *Front. Pharmacol.* 9 (536), 1-13.
- Warburg O., Wind F. & Negelein E. (1927). The metabolism of tumors in the body. *J. Gen Physiol.* 8 (6), 519–530.
- Wintterle, S., Schreiner, B., Mitsdoerffer, M., Schneider, D., Chen, L., Meyermann, R., Weller, M. & Wiendl, H. (2003). Expression of the B7-Related Molecule B7-H1 by Glioma Cells: A Potential Mechanism of Immune Paralysis *Cancer Res.* 63 (21), 7462–7467.
- Wu C, Zhu Y, Jiang J, Zhao J, Zhang XG & Xu N. 2006. Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. *Acta Histochem.* 108 (1), 19-24.
- Xie H., Hanai J., Ren J.G., Kats L. Burgess K., *et al.* (2014). Targeting lactate dehydrogenase – a inhibits tumorigenesis and tumor progression in mouse models of lung cancer and impacts tumor-initiating cells. *Cell Metab.* 19 (5), 795–809.
- Yamazaki T., Akiba H., Iwai H., Matsuda H., Aoki M., Tanno Y. & Shin T. (2002). Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J. Immunol.* 169 (10), 5538-5545.
- Zamani M. R., Aslani S., Salmaninejad A., Javan M. R. & Rezaei N. (2016). PD-1/PD-L1 and autoimmunity: a growing relationship. *Cell Immunol.* 310 (1), 27–41.
- Zhang X., Zeng Y., Qu Q., Zhu J., *et al.* (2017). PD-L1 induced by IFN-gamma from tumor-associated macrophages via the JAK/STAT3 and PI3K/ AKT signaling pathways promoted progression of lung cancer. *Int. J. Clin. Oncol.* 22 (6), 1026–1033.