

Nº 18
251



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO DE LAS CELULAS INMUNOCOMPETENTES
COMO BLANCO DE LA ACCION SUPRESORA
DEL ADENOCARCINOMA PULMONAR

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
JESUS ALEJANDRO HERNANDEZ GARCIA



1 9 9 3

FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

INDICE

I.	Introducción	1
	a. Carcinogénesis	2
	a2. Factores químicos	3
	a1. Factores físicos	4
	a3. Factores biológicos	4
	b. Antígenos tumorales	7
	b1. Antígenos específicos de tumor	7
	b2. Antígenos asociados a tumor	8
	b3. Antígenos oncofetales	10
	c. Inmunidad y cáncer	10
	c1. Teoría de la inmunovigilancia	11
	c2. Fase inductora de la respuesta inmune	14
	c2.1. Presentación antigénica	14
	c2.1.1. Vía endógena	15
	c2.1.2. Vía exógena	16
	c2.2. Linfocitos T	17
	c2.2.1. Activación	19
	c3. Fase efectora	24
	c4. Mecanismos de evasión	31
II.	Antecedentes	37
III.	Objetivos	47
IV.	Material y métodos	48
V.	Resultados	56
VI.	Discusión	68
VII.	Bibliografía	75

INTRODUCCION

En general, podemos considerar que el término cáncer es sinónimo de crecimiento de una clona de células que no obedece los controles de proliferación, diferenciación y mantenimiento de la integridad que rigen en todos los tejidos normales del organismo (1).

Se sabe que el proceso de transformación maligna que sufren estas células es el resultado de un fenómeno de etapas múltiples, conocido como carcinogénesis, que se caracteriza por la presencia de daños genéticos y epigenéticos en células susceptibles, las cuales adquieren la capacidad de crecimiento selectivo y de expansión clonal como resultado de una activación constante por señales positivas que promueven la duplicación celular (oncogenes), y/o por la pérdida del control que ejercen ciertos genes (antioncogenes) a los diversos estímulos que favorecen su proliferación (2).

Los protooncogenes son genes dominantes que codifican para moléculas de importancia en el desarrollo celular normal, como son factores de crecimiento (c-sis), receptores para dichos factores (c-erbB), moléculas citoplásmicas transductoras de señales como las tirosin cinasas (familia ras) y factores nucleares promotores de la transcripción (c-fos, c-myc, p53, c-jun); cuando la expresión de estos genes se modifica en forma

cuali y/o cuantitativa entonces se manifiestan como oncogenes, cuyas proteínas estimulan la proliferación celular, generando en la célula transformada una independencia en su respuesta a estímulos externos y por lo tanto una desregulación del crecimiento (3).

En contraste, los genes supresores o antioncogenes y sus productos funcionan, en general, como componentes de un sistema de señales intracelulares, las cuales regulan el efecto activador de los diversos estímulos que favorecen el crecimiento en las células normales. Los productos de estos genes regulan principalmente el crecimiento celular a través de moléculas protéicas como las tirosín fosfatasas, inducen la diferenciación terminal y la muerte celular programada, así como también se encargan de mantener la estabilidad genómica y modular los procesos de envejecimiento celular. Cuando ambos alelos son inactivados por mecanismos mutacionales, alteraciones en su transcripción o por una pérdida inmediata del producto debido a una digestión proteolítica anormalmente aumentada, se observa la pérdida del control de los mecanismos de crecimiento y diferenciación, ya que predomina entonces el efecto de los protooncogenes y en consecuencia la célula ingresa a un estado de continua división (4).

Carcinogénesis.

Existen diversos factores capaces de iniciar el proceso carcinogénico y dependiendo de su naturaleza, se dividen en factores físicos, químicos y biológicos.

Factores Químicos.

Uno de los estudios pioneros sobre el origen del cáncer fué debido Sir Percival Pott, quien en 1775 identificó al hollín como la causa concreta del cáncer de escroto en los deshollinadores, hecho que estableció la primera asociación entre un agente causal y el desarrollo de una neoplasia. Actualmente se conoce una gran variedad de sustancias que se asocian con la generación de cierto tipo de tumores y que tienen como característica común el causar algunas alteraciones a nivel genético; dentro de este grupo de moléculas se encuentran las que son capaces de causar lesiones a nivel de DNA directa o indirectamente; estas últimas requieren de activación metabólica, mediada por el sistema enzimático del citocromo P-450, lo que da lugar a la aparición de compuestos electrófilos sumamente reactivos, capaces de inducir un efecto mutagénico a través de la formación de aductos en el DNA, lo que produce mutaciones puntuales, deleciones o rearrreglos en el material genético (5), en esta categoría se incluyen compuestos del tipo de los hidrocarburos policíclicos aromáticos, aminas aromáticas, N-nitrosaminas y micotoxinas, entre otros. Por otro lado, existe

una amplia gama de sustancias que pueden actuar directamente sobre el DNA causando anomalías cromosómicas o formación de micronúcleos, como es el caso de la β -propiolactona, etilenimina, bis(clorometiléter) y metacloretamina (gas mostaza), entre otros (6).

Factores Físicos.

A principios del siglo XX se estableció una asociación entre las radiaciones y el cáncer. Entre este grupo de agentes físicos se encuentra la luz ultravioleta (UV), la cual causa la formación de dímeros de timina que por sí mismos no son mutagénicos sino hasta que actúan conjuntamente con fallas en los mecanismos de reparación del DNA. Existen también las radiaciones y partículas ionizantes, que incluyen los rayos X, rayos gamma, electrones, protones, neutrones, iones pesados, partículas α y en función de su alto nivel energético, pueden causar alteraciones directamente en el genoma tales como deleciones, ruptura de una o ambas cadenas y de manera indirecta, a través de la ionización del agua por formación de radicales libres altamente reactivos que causan modificaciones en el DNA (7).

Factores Biológicos.

En relación a los virus como agentes transformantes, fué en 1911, durante el estudio del ciclo biológico de los retrovirus,

que Peyton Rous demostró la existencia de un virus infeccioso capaz de producir sarcoma en pollos; ésto condujo años más tarde a esclarecer la participación de ciertos genes virales, conocidos posteriormente como oncogenes, en el proceso de duplicación celular constante que conduce al fenómeno de transformación maligna. Este tipo de virus de RNA tiene dos posibilidades para activar los protooncogenes, una es cuando llevan a cabo la inserción de su material genético, en forma de DNA en el genoma celular (mutagénesis insercional); y la otra se manifiesta cuando el retrovirus incorpora genes celulares que adquieren un carácter oncogénico (transducción). Entre los retrovirus más conocidos se encuentra el mismo del sarcoma de Rous, el del sarcoma de Harvey y el de Abelson en la leucemia murina. En humanos la capacidad oncogénica de estos virus no esta muy bien establecida, sin embargo se considera que existe una estrecha asociación virus-cáncer, como en el caso del virus de la leucemia de linfocitos T humanos (HTLV I) y el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) en la leucemia de células T y el sarcoma de Kaposi, respectivamente. En contraste, los virus de DNA, que pueden insertarse al azar en el genoma celular, poseen genes que por sí mismos son capaces de inducir transformación cuando sus productos se expresan en las células susceptibles. En esta categoría se incluyen los Papovavirus (papiloma virus humano 16 y 18 y el SV 40), Herpes virus (virus de Epstein Barr), y

Hepadnavirus (virus de la hepatitis B) (8,9).

Podemos considerar que, de manera general, la actividad mutagénica de los agentes iniciadores (físicos, químicos y biológicos) antes mencionados se enmarca en el contexto de un proceso múltiple, que conduce finalmente al desarrollo tumoral y en el cual podemos distinguir claramente las etapas de iniciación, promoción y progresión.

La iniciación es la etapa, que como resultado de la acción del carcinógeno, altera de manera irreversible el material genético de la célula y en consecuencia, ésta modifica su respuesta a diferentes estímulos internos y/o externos (10).

Durante el proceso de malignización se ha demostrado que se requiere además de una fase de promoción, en donde la duplicación de las células iniciadas se ve favorecida por la acción de sustancias denominadas promotoras, las cuales pueden interaccionar directamente con la célula mutada o bien inducir en el microambiente la liberación de moléculas que estimulen su división (11).

Tras la proliferación primaria, se llega a la formación de un tumor que puede ser de naturaleza benigna o maligna. En el primer caso, el tumor no se propaga, no es invasivo y las células constituyentes están bastante diferenciadas. En el caso del tumor maligno, las células se hallan poco diferenciadas, tienen una proliferación continua y adquieren un fenotipo maligno que les

permite invadir el tejido circundante, migrar, establecerse y desarrollarse en sitios alejados del original (metástasis), estas características forman parte de la fase final del crecimiento neoplásico conocida como la progresión del tumor (12).

ANTIGENOS TUMORALES

Se considera que las alteraciones genéticas que sufren las células transformadas durante la generación del cáncer, pueden llevar a la expresión de moléculas nuevas o modificadas en su superficie celular, las cuales son responsables de la inducción de una respuesta inmunológica en el huésped, por lo que se les conoce como antígenos (Ags) tumorales. Entre los más estudiados se encuentran los Ags específicos de tumor (TSAs), Ags asociados a tumor (TAAs) y los Ags oncofetales (13).

Ags Específicos de Tumor.

Algunos tipos de cánceres pueden expresar TSAs característicos de cada neoplasia como se demuestra en modelos experimentales, donde los mejor conocidos son los inducidos por agentes químicos, éstos se ponen de manifiesto por técnicas de trasplante en ratones singénicos que sensibilizan al ponerse en contacto por primera vez con la neoplasia, la cual en esta ocasión es extirpada quirúrgicamente, pero al ser implantada nuevamente en los animales previamente expuestos, sufre un severo rechazo, de

ahí que también reciban el nombre de Ags de trasplante específicos de tumor (TSTA) (14).

Ya que cada uno de estos tumores muestra TSAs característicos, la resistencia al tumor generada por inmunización previa, no previene el crecimiento de una distinta neoplasia inducida aún por la misma sustancia química; sin embargo, hay evidencias de que algunos tumores inducidos químicamente o mediante luz UV, comparten TSAs. A la fecha se han aislado y caracterizado algunos de estos Ags, presentes en leucemias, sarcomas y melanomas murinos, encontrándose cierta homología con moléculas expresadas por la célula normal, como son las multifuncionales proteínas de choque térmico (15). Con estos datos se ha puesto en evidencia que algunos Ags que originalmente se pensaba eran específicos, en realidad no es así ya que son compartidos por diferente tipos de tumor y por lo tanto se consideran ahora como asociados a tumor. En las neoplasias humanas estos últimos son los más frecuentes y debido a los constantes fracasos en la búsqueda de TSAs, se ha sugerido que ésto pudiera deberse a su inexistencia, su escasa expresión ó su baja inmunogenicidad (16).

Antígenos asociados a tumor.

Por su parte, las neoplasias inducidas por virus generalmente poseen TAAs, denominados así ya que también se presentan en otros

tipos de tumores inducidos por el mismo virus o uno relacionado; estos Ags se ponen en evidencia por las técnicas de trasplante ya mencionadas, por lo que además se denominan como Ags de trasplante asociados a tumor (TATA). En el caso de los virus de DNA los TAAAs son de naturaleza viral ya que son codificados solamente por el DNA viral, el cual se expresa en la célula huésped como TAAAs que se pueden anclar a la superficie celular o permanecer en forma intracelular. En cambio, los virus de RNA además de inducir TAAAs del virus también son capaces de activar ciertos genes, propios de la célula huésped, cuyos productos corresponden a Ags tumorales de diferenciación TDAs (13).

Las células tumorales humanas pueden producir una gran variedad de sustancias que en las células normales correspondientes no se expresan en cantidades apreciables, ya que en estas últimas sólo son producidas en concentraciones significativas en un estadio específico del desarrollo celular. A este respecto, se ha observado que los timocitos de ratones normales llevan el Ag TL en su superficie, el cual desaparece una vez que la célula ha madurado; sin embargo, este Ag se expresa nuevamente en las células leucémicas de estos ratones (17).

Muchas otras moléculas que funcionan como TDAs son algunas de las proteínas codificadas por oncogenes, como son el Ag asociado a melanoma, p97, que es homólogo de la transferrina, el receptor de la transferrina y el receptor para el factor de crecimiento

nervioso (15).

Antígenos oncofetales.

Se sabe que las células transformadas son capaces de activar la transcripción de genes que generalmente solo se expresan en la etapa fetal o en estadios tempranos del desarrollo, entre este tipo de moléculas, se encuentran la alfafetoproteína y el antígeno carcinoembrionario que, mas que Ags propiamente, son considerados como marcadores tumorales, es decir, moléculas asociadas a ciertas neoplasias pero ajenas a un rechazo inmunológico en su contra por parte del huésped (13).

INMUNIDAD Y CANCER

Se considera que existen dos etapas centrales que involucran al sistema inmunológico en la interacción tumor-huésped. En la primera fase, se evita la aparición del tumor, lo cual se produce mediante el reconocimiento continuo y eliminación selectiva de las células mutadas que constantemente aparecen en el organismo, mecanismo propuesto por la teoría de la inmunovigilancia; por otro lado, cuando se sobrepasa esta primera barrera de defensa, las células transformadas provocan la activación de los distintos componentes celulares de la respuesta inmune, tanto en su fase inductora como efectora, para la erradicación específica de la neoplasia.

Teoría de la Inmunovigilancia.

A pesar de que los primeros estudios sobre la capacidad del sistema inmunitario para rechazar transplantes sugirieron la idea de que la función primordial de la inmunidad era la de una autovigilancia mediada por células, con el fin de mantener la integridad del organismo (18), años más tarde Burnett postuló su teoría de la selección clonal, que no consideró las observaciones realizadas en los aloinjertos, al proponer que existe una eliminación de las clonas autorreactivas y una selección de las que son capaces de reconocer Ags extraños. Hoy en día se ha logrado conciliar ambas propuestas ya que se acepta que la función primordial y evolutivamente más favorable del sistema inmune es en primer término, reconocer Ags propios y extraños con el fin de eliminar estos últimos, por lo cual lleva a cabo una doble función, la de ser tolerante a unos Ags y capaz de activarse frente a otros.

De la teoría de inmunovigilancia se desprendieron originalmente tres predicciones fundamentales, 1) los tumores por naturaleza son antigénicos, 2) las células T llevan a cabo las funciones de IS y finalmente 3), que debe haber una asociación entre las inmunodeficiencias y un riesgo incrementado de adquirir cáncer.

Estos postulados han perdido fuerza en base a las siguientes

observaciones, a) la mayoría de las neoplasias espontáneas y muchas inducidas experimentalmente carecen aparentemente de inmunogenicidad, b) los ratones desnudos (nu/nu), carentes de timo, presentan el mismo riesgo de padecer cáncer que los correspondientes ratones normales y c), la aparición de tumores en pacientes con diversas inmunodeficiencias se limita generalmente a linfomas no Hodgkin. Estos resultados manifestaban que la teoría de la inmunovigilancia no era tan general como inicialmente se pensaba, pues ésta parece funcionar sólo en contra de algunos tipos de tumores, y además puso en duda el papel primordial de las células T (18). Mientras que el primer obstáculo parece insalvable, se ha demostrado que las células realmente responsables de llevar a cabo la función de IS son las células asesinas naturales (NK) y los macrófagos (Mφ).

Las células NK fueron descritas en los años 70s, cuando se observó que células esplénicas recién aisladas de ratones no inmunizados podían lisar algunas líneas tumorales alogénicas en ensayos de citotoxicidad a corto tiempo (19, 20). La caracterización de estas células demostró que la actividad citotóxica natural correspondía a células nulas, ni T ni B y posteriormente, gracias a las técnicas de anticuerpos monoclonales y de biología molecular, fué posible la identificación de las células NK como una población diferente, que ahora se reconoce forma parte de los linfocitos granulares

gigantes con características no adherentes, no fagocíticas y que pueden lisar espontáneamente a células neoplásicas, células infectadas con virus, y algunos tipos de células inmaduras (21). La citotoxicidad espontánea no restringida genéticamente que llevan a cabo estas células se encuentra aún poco caracterizada; sin embargo, se sabe que se requiere de la unión entre la célula blanco y efectora mediada por ligandos de superficie, tales como el Ag 1 asociado a la función del linfocito (LFA-1) y el CD2, en la célula NK, con la molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1) y el LFA-3 respectivamente, en la célula susceptible (21). Después de la formación del conjugado, son necesarios otros eventos de reconocimiento en los que parece participar el homodímero zeta (22), molécula asociada a fenómenos de activación celular, antes de que la célula NK ejerza su capacidad citolítica.

Por otro lado, desde hace tiempo se sabe que los monocitos/macrófagos llevan a cabo uno de los mecanismos más primitivos de defensa como es la fagocitosis. Estas células adherentes se originan en la médula ósea de donde se distribuyen ampliamente por el organismo en forma de monocitos circulantes y como macrófagos en los tejidos. En 1972 se reportó que *Mos murinus* podían causar la lisis in vitro de células transformadas dejando intactas a las normales (23). Estas células ejercen su actividad cuando se estimulan con agentes promotores de la

inflamación y manifiestan una función antitumoral caracterizada por citostasis, la cual controla la multiplicación tumoral, y citólisis, que provoca la muerte celular inespecífica (24).

FASE INDUCTORA DE LA RESPUESTA INMUNOLOGICA

Para la inducción de una respuesta antitumoral específica se requiere de la activación de las células inmunocompetentes a través del reconocimiento de los Ags tumorales. En esta etapa, interactúan las células presentadoras de Ag (APC) y los linfocitos T cooperadores (Th), los cuales liberan moléculas solubles denominadas citocinas que modulan la actividad inmunológica propia y de otras poblaciones celulares. Una respuesta eficiente de los linfocitos T, además del reconocimiento del Ag previamente procesado y presentado en el contexto de las moléculas de clase II, requiere la presencia de señales coestimuladoras proporcionadas por la misma APC, de manera que la actividad de esta última célula es de vital importancia en la iniciación de una respuesta inmunológica (25).

PRESENTACION ANTIGENICA

El fenómeno de presentación antigénica es llevado a cabo por las APC, entre las cuales destacan el Mo, las células dendríticas, el linfocito B, las células de Langerhans y las células endoteliales principalmente (26) y comprende los eventos

celulares y bioquímicos necesarios tanto para el reconocimiento del Ag por las células Th como para su activación.

En 1974, Zinkernagel y Doherty (27) definieron el papel esencial y restrictivo del MHC en la respuesta de las células T a un estímulo por Ag. Es así que se requiere la participación de la APC para captar, procesar y presentar el Ag en asociación con las moléculas del MHC a los linfocitos T e iniciar la inducción de la respuesta inmune.

A la fecha se conocen dos rutas de presentación de Ag, ya que se han demostrado diferencias en la presentación de Ags endógenos, sintetizados por la misma APC, en el contexto de moléculas de clase I, y de Ags exógenos, provenientes del medio extracelular, que se internalizan por endocitosis y se asocian a moléculas de clase II (28).

VIA ENDOGENA

En este caso, se considera que los péptidos antigénicos se originan generalmente en el citosol, a través de una degradación enzimática. En la actualidad esta área de investigación se encuentra en constante desarrollo y hasta la fecha se adjudica esta función a la proteinasa multicatalítica conocida como proteosoma (29), la cual posee al menos una subunidad codificada en la región del MHC; en donde además se localizan los genes de dos moléculas transportadoras de

membrana que pertenecen a la superfamilia de proteínas acarreadoras dependientes de la unión a ATP, que parecen participar en la migración de los péptidos generados en el citoplasma al retículo endoplásmico (ER) (30), donde éstos se ensamblan a la cadena de clase I y a la B2-microglobulina; se postula que esta unión permite el tránsito del complejo péptido-molécula de clase I fuera del ER, por la vía secretoria y estabiliza su expresión en la superficie celular, por lo cual las moléculas de clase I-péptido se presentan en la membrana de la APC en una forma estable y funcional (31).

VIA EXOGENA

Los Ag exógenos son fagocitados por la APC y procesados enzimáticamente, por acción de las catepsinas B y D, en los endosomas "tempranos" y además por otras enzimas lisosomales en los endosomas "tardíos"; de manera que es en estos compartimientos donde se genera la variedad de péptidos antigénicos (32). Mientras esto se lleva a cabo, las cadenas α y β de las moléculas de clase II, recién sintetizadas en el ER, se asocian en un complejo trimolecular junto con una proteína conocida como cadena invariante (Ii), la cual inhibe la unión de péptidos endógenos producidos en este compartimiento al dímero de clase II; la Ii también parece intervenir en el transporte del trímero al endosoma "temprano", donde es alterada

proteolíticamente con el fin de permitir la unión de los fragmentos antigénicos exógenos a las moléculas de clase II, esta interacción actúa como señal para la pérdida definitiva de la II y la migración del complejo formado por las moléculas de clase II y el péptido hacia la superficie celular (33).

LINFOCITOS T

Los linfocitos T expresan en su superficie el receptor de la célula T (TCR), que consiste de un heterodímero portador del sitio de unión al péptido antigénico asociado a las moléculas codificadas por el MHC, y se expresa principalmente como TCR $\alpha\beta$ y en menor proporción como $\gamma\delta$ TCR. Este complejo interactúa de forma no covalente con el CD3, que está formado por al menos 5 cadenas invariables, algunas de las cuales participan de manera importante en la generación de señales transductoras, y con las proteínas CD4/CD8, que además de tener afinidad por una porción constante de las proteínas codificadas en el MHC, intervienen en los eventos de transducción (34).

Con base en reconocimiento de las diferentes moléculas del MHC, las células T se dividen en dos variedades que son, los linfocitos T citotóxicos (Tc) cuyo reconocimiento del Ag se encuentra restringido por moléculas de clase I y tiene como función efectora la lisis específica de la célula blanco, en este caso de la célula tumoral. Por otro lado los linfocitos T

cooperadores, restringidos en su reconocimiento antigénico por moléculas de clase II, muestran como función principal la liberación de citocinas que regulan la actividad de las diferentes células inmunes. A su vez, los linfocitos Th murinos, fueron caracterizados por Mosmann (35) en base a su diferente patrón de secreción de citocinas, lo que originó su subdivisión en Th1, capaces de secretar interleucina 2 (IL-2), IL-3, interferón (IFN- γ), factor de necrosis tumoral (TNF- α), linfotoxina (LT) y factor estimulador de colonias de monocitos y granulocitos (GM-CSF); y en Th2, que producen IL-3, -4, -5, -6 y -10, LT y GM-CSF. A pesar de que hasta ahora estos hallazgos no han sido totalmente confirmados en el humano, se sugiere que las subpoblaciones Th murinas antes mencionadas parecen tener su contraparte en el humano (36).

Por lo que respecta a la presentación antigénica en las células con transformación maligna, se considera que por un lado, los Ags exógenos se liberan espontáneamente por la neoplasia y/o como resultado de la actividad citolítica de las células NK y de los Mos activados; además, ya que la célula neoplásica sufrió alteraciones a nivel nuclear, las proteínas codificadas por los genes afectados actúan como Ags endógenos. La presencia de ambas clases de Ags puede inducir la activación de los linfocitos Th y Tc, respectivamente, para generar finalmente una potente respuesta inmunológica antitumoral, fenómeno que se inicia de

manera imprescindible con la activación de los linfocitos Th.

ACTIVACION DE LA CELULA T

Desde otro punto de vista, además del reconocimiento intermembranal entre la APC y la célula T, a través de los mecanismos descritos anteriormente, es necesaria la interacción entre un grupo de proteínas denominadas moléculas accesorias, que incluyen al LFA-1, CD2, el ICAM 1 y el CD28 en el linfocito T y cuyos ligandos en la APC son el ICAM 1 y 2, LFA-3, el LFA-1 y el D7/BB-1 respectivamente (37). Estas proteínas contribuyen al proceso de activación, ya que incrementan la avidéz y estabilidad de la unión del TCR al péptido asociado a moléculas de clase II, así como también dan inicio a sus propias señales transductoras o amplifican las generadas vía TCR (37); ya que se ha demostrado que el solo estímulo generado através del TCR no parece ser suficiente para dar lugar a la respuesta proliferativa de la célula T y, de acuerdo con el modelo de doble señal propuesto por Bretscher y Cohn (38), de que se requiere de un segundo estímulo, éste puede ser suministrado por la IL-1 y la IL-6 (39), las que aparecen ser inducidas en el Mo debido al contacto intermembranal con la célula T (40).

Antes de que las células inmunocompetentes inicien una respuesta caracterizada por cambios morfológicos que inducen a su

proliferación y diferenciación, las señales de activación dependientes del TCR y del coestímulo, generan una serie de cambios bioquímicos como son el incremento en la concentración intracelular del ion Ca^{2+} , la fosforilación de proteínas tanto de membrana como citoplásmicas, cambios en la concentración de nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPC) y variaciones de pH. Estas modificaciones se inician a los pocos minutos después de la interacción del TCR con su ligando, debido a la activación de la fosfolipasa C (PLC), la cual lleva a cabo la hidrólisis del componente de membrana, el 4,5-fosfatidil inositol, apareciendo como productos el 1,4,6-inositol trifosfato (IP-3) y el diacilglicerol (DG) (41). Se ha propuesto que el TCR regula la actividad de la PLC a través de una proteína de unión a guanina (G) (42) y se ha demostrado que las moléculas transductoras de señales vía TCR son las proteínas p56^{lck} y p59^{fyn}, miembros de la familia de protooncogenes src, las cuales funcionan como tirosín cinasas (43). Recientemente se ha encontrado que la proteína p59^{fyn} interacciona directamente con el TCR, mientras que la p56^{lck} se encuentra asociada a la molécula CD4/CD8 y al parecer la interacción entre el TCR y las moléculas CD4/CD8 involucra la activación de ambas enzimas. Además, existen evidencias de que la molécula CD45 participa como tirosín fosfatasa y regula la actividad de la p56^{lck} mediante su defosforilación (43).

Se estima que los estímulos que recibe el linfocito T conducen

a la formación de el IP₃ y de DG, los que actúan como "segundos mensajeros" capaces de inducir un incremento en la concentración de Ca²⁺ intracélular además de la activación de la proteína cinasa C (PKC), respectivamente. En la actualidad existen evidencias de que esta última enzima estimula la p21^{ras}, una enzima dependiente de la unión a GTP perteneciente a la familia de protooncogenes ras, que parece tener un papel fundamental en la cadena de eventos que conducen a la proliferación de la célula T (44).

Aún no se conoce con exactitud el papel de estos eventos en la producción de señales que actúen a nivel nuclear, para iniciar la transcripción de un gran número de genes, que se ha demostrado que se expresan durante el período de activación de la célula T, los cuales y en analogía con la expresión de genes virales, se han dividido en a) inmediatos, pues no requieren de la síntesis de proteínas, como son el c-fos, c-myc, NF-kB y otros; b) tempranos, que si requieren de la síntesis de proteínas pero anteceden a la división celular, entre los más destacados se hallan los genes de la IL-2, el receptor para IL-2 (IL-2R), IFN- , IL-3, LT, etc., y c) tardíos, que se manifiestan posteriormente a la división celular y entre ellos se conoce a la familia Ags 1 a 5 de expresión tardía (VLA-1 a 5), Granzimas A y B, etc. Mientras que los eventos inmediatos y tempranos son probablemente comunes a la mayoría de células T, las fases tardías son características de los diferentes tipos funcionales

de linfocitos T (45).

Por lo que respecta a los mecanismos que regulan los genes de activación, el más estudiado ha sido el control transcripcional para el gen de IL-2, debido a la estrecha relación que guarda su expresión y la proliferación de la célula T; en este sentido, se han identificado secuencias de DNA que actúan como elementos de respuesta a los dos estímulos que recibe a nivel de su membrana la célula T. De esta manera se sabe que, las señales vía TCR inducen la actividad tanto del factor nuclear activador del gen de IL-2-proteína de unión a octámero (NF-IL2A/Oct-1) como del factor nuclear de activación de la célula T (NF-AT); mientras que las moléculas sensibles al efecto de la señal coestimuladora, son el factor nuclear activador del gen κ descrito originalmente en la célula B (NF- κ B) y el (AP-1/jun)/fos (46). Se ha puesto en evidencia que los sitios de unión para las moléculas mencionadas se encuentran en la región reguladora del gen de IL-2 y en especial, se conoce que los sitios que responden a las señales de transducción debidas al TCR son el A, de -93 a -63 pares de bases (bp) a partir del inicio de la transcripción, y el E, ubicado entre los -285 y -255 bp. El NF-AT es capaz de unirse al sitio E en forma dependiente de la síntesis de proteínas y de RNA; en contraste, existe una unión constitutiva al sitio A por el factor Oct-1, y ésta es funcional únicamente bajo la influencia del TCR.

Por otra parte, la molécula NF- κ B se une al sitio C,

que se encuentra entre los -267 y -257 bp de la región reguladora del gen de IL-2. En condiciones basales, el NF- κ B es inactivo debido a la unión con su inhibidor (I- κ B), el cual bajo la acción del coestímulo se inactiva, dejando libre al NF- κ B que cuando ingresa al núcleo forma un dímero capaz de activar la transcripción.

Finalmente, se expresa una secuencia genómica repetida denominada TRE que responde al forbol éster TPA en las regiones de -151 a -145 y -185 a -179 bp, de las cuales únicamente la primera une un heterodímero formado por la interacción de los factores de transcripción AP-1, codificado por el protooncogene c-jun, y la proteína codificada por c-fos.

En resumen, actualmente se empiezan a conocer algunas de las señales intracelulares que resultan de la interacción intermembranal entre la APC y el linfocito T y que conducen a la eficiente activación de este último.

Como consecuencia de las señales de activación que reciben las células Th, éstas liberan una serie de citocinas que, como ya se mencionó, difieren en cada subpoblación y son capaces de regular la respuesta inmune en forma cuali y cuantitativa. Asimismo, se ha asociado a estas subpoblaciones en diferentes fenómenos inmunes, las células Th1 participan promoviendo preferentemente una respuesta inmune celular que excluye, por vía del IFN- γ , la función cooperadora de las células Th2 en la activación de los

linfocitos B para la formación de Abs; mientras que cuando los linfocitos Th2 se activan y liberan IL-10, ésta causa una inhibición en la secreción de citocinas por Th1 (47).

En este contexto, y en forma posterior a los eventos de reconocimiento celular, es necesaria la participación de las distintas citocinas, cuyas funciones moduladoras y pleiotrópicas favorecen la activación de la respuesta inmune y su amplificación en la fase efectora.

FASE EFECTORA

En esta etapa podemos distinguir dos tipos de respuesta contra el tumor, una de las cuales es antígeno específica y cuenta con la participación de las células Tc y de los linfocitos B, y por otro lado, existe una respuesta selectiva, que engloba la actividad de las células NK, Mos activados y el fenómeno denominado LAK (células asesinas activadas por linfocinas).

En un principio, los linfocitos Tc se encuentran en una etapa inmadura de su desarrollo (pre Tc) y para su crecimiento y diferenciación, es necesario el reconocimiento del Ag asociado a moléculas clase I, aunado al estímulo de citocinas como la IL-2, 4, 5, 6, 10, IFN- γ y TNF- α , las cuales le confieren el carácter de linfocito T con capacidad citolítica (CTL) (48).

En vista de que la mayoría de los tumores expresan moléculas de clase I, se considera fundamental el papel de los CTL en la

erradicación de la neoplasia y se han descrito diferentes mecanismos por los que estas células llevan a cabo su función: a) por un proceso secretor gránulo dependiente, que involucra moléculas como perforinas y granzimas; b) un sistema gránulo independiente, en el que destacan la LT, el TNF- α y los factores citolíticos de la célula NK (NKCF); c) por una interacción intermembranal sin secreción de productos, en la cual parece actuar principalmente el TNF asociado a membrana y d) por productos metabólicos como el ATP, que se acumula en respuesta al estímulo vía TCR y genera un incremento de la permeabilidad en la superficie de la célula blanco, ya que el CTL presenta resistencia al efecto lítico debido a la presencia de la de la enzima ecto-ATPasa en su membrana (49).

El mecanismo más estudiado corresponde al de la proteína formadora de poros (PFP) que, junto con las granzimas y proteoglicanos, es el constituyente principal de los gránulos citoplásmicos del CTL y la célula NK; estos gránulos parecen liberarse en forma vectorial en el espacio intercelular formado por el sitio de contacto entre las células efectora y blanco. Después de la exocitosis dependiente de Ca^{2+} , los monómeros de PFP polimerizan formando canales transmembranales en la superficie de las células sensibles, lo que provoca un desequilibrio osmótico que causa la lisis celular (50). Sin embargo, actualmente se conoce que previo al evento lítico, se

produce la degradación del DNA (apoptosis) y, sin estar aún confirmado, se propone que este evento depende directamente de la interacción que se lleva a cabo a nivel de membrana entre las células participantes (51).

Otra expresión del fenómeno inmunológico, lo constituye la función de la célula B, que contribuye como APC y como célula productora de Abs con especificidad antitumoral (52). En virtud de contar con una Ig de membrana que actúa como su receptor específico, los linfocitos B son capaces de interactuar con el Ag particulado, endocitarlo y procesarlo para presentar los distintos péptidos inmunogénicos resultantes, en el contexto de las moléculas de clase II, a los linfocitos Th, los cuales promueven la proliferación y diferenciación de las clonas de linfocitos B hasta células productoras de Abs a través de la liberación de citocinas como la IL-2, IFN- γ , IL-4, -5 y -6, las que también contribuyen en la determinación del isotipo de las Igs producidas, ya que se ha demostrado que la IL-4 incrementa preferencialmente la síntesis de IgG1 e IgE, la IL-5 favorece la producción de IgA y el IFN- γ de la IgG2a. Es necesario señalar también el potencial inhibidor que la subpoblación de linfocitos Th1 muestra a través del IFN- γ , el cual actúa a bajas concentraciones como antagonista de la acción de la IL-4 sobre las células B y, a niveles elevados, como un inhibidor del crecimiento y diferenciación del linfocito B (53).

La participación de los Abs en el rechazo tumoral se basa en su propiedad de fijar al complemento (C') y mediante la activación de este último, contribuir a la lisis de las células transformadas, así como también por un mecanismo que involucra la actividad inmune celular denominada citotoxicidad dependiente de Ab (ADCC), en la cual los Mos activados y las células NK, que son estimuladas por los factores secretados por linfocitos Th1, incrementan la expresión de su FcR y por lo tanto la citólisis específica.

Por lo que respecta a la citotoxicidad carente de restricción genética, las células NK son capaces de llevar a cabo dos tipos de actividad citolítica, una espontánea no restringida por el MHC, tanto en las fases tempranas del desarrollo de las células malignas con el objetivo de evitar la aparición del tumor, como en la fase de mayor actividad inmunológica a fin de causar la regresión de la neoplasia; y además la ADCC mencionada previamente. En este último fenómeno, las células blanco cubiertas de Ab son lisadas por las células efectoras (NK) que muestran el marcador CD16 (FcR III), receptor de baja afinidad para unir a las IgG 1 y 3 humanas el cual, en asociación con la molécula zeta, parece promover la expresión de moléculas de activación y la secreción de citocinas como IFN γ , TNF α y β , IL-3, y GM-CSF entre otras (21).

Tanto la citotoxicidad espontánea como la ADCC coinciden en

una fase efectora común semejante a la del CTL, la desintegración del DNA y formación de poros en la membrana. Además de la exocitosis de gránulos citolíticos, la célula NK libera también NKCF.

Por otro lado y en relación a la actividad lítica mediada por el Mo, los estudios iniciales determinaron que este efecto no era mediado por el sobrenadante del cultivo de Mos activados, por lo cual se propuso que solo dependía del contacto directo con la célula sensible. Recientemente, se han encontrado evidencias que indican que dicha unión parece estar mediada por residuos de α -galactopiranosil en la superficie del Mo y una lectina de membrana presente en células tumorales (54).

Aunque existen varios medios para lograr la activación del Mo y que éste manifieste su actividad antitumoral, inmunológicamente los agentes activadores más importantes son las citocinas liberadas por la célula Th como el TNF- α y la IL-2 entre otras, las cuales promueven la síntesis de TNF- α en el Mo que, de este modo, actúa lisando las células tumorales sensibles a dicho factor (52).

Entre las diversas moléculas efectoras de la función citotóxica de los Mos activados se han propuesto al TNF, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), óxido nítrico y proteasas neutras.

El TNF fué descrito primeramente como una molécula capaz de causar in vivo la necrosis hemorrágica de ciertos tumores; sin

embargo, actualmente se sabe que sus actividades biológicas no se limitan a la función antitumoral; en particular el TNF- α posee un amplio espectro de propiedades inmunomoduladoras como la estimulación de la proliferación de linfocitos T y B, incrementa la producción de Igs, la expresión de moléculas del MHC, la generación de Tc, y la actividad NK y LAK dependientes de IL-2 (55).

El H_2O_2 es un producto de la cascada respiratoria inducida durante la actividad fagocítica del Mo, se forma por vía enzimática a partir del ión superóxido, con la participación de las enzimas NADPH oxidasa y/o superóxido dismutasa, además de ser convertido a su vez en radical oxhidrilo; la interacción del peróxido con la mieloperoxidasa y un haluro forma ácidos de gran potencial tóxico que basan su actividad en sus propiedades oxidantes.

La liberación de óxido nítrico dependiente de L-arginina se presenta también durante los eventos de activación del Mo, y su efecto citotóxico se manifiesta al inhibir la respiración celular y la duplicación del DNA (24).

Estos mecanismos pueden causar efectos citolíticos o citostáticos en las células transformadas en función del tipo de activación o de la señal desencadenante, de la susceptibilidad de la célula blanco y de la heterogeneidad de las células efectoras.

Por otro lado, los FCRs presentes en el Mo, juegan un papel

muy importante en la ADCC y la fagocitosis, ya que la interacción de éstos con su ligando, favorece la activación tanto del proceso citotóxico como la fagocitosis.

Otra línea de defensa trascendente en la inmunología tumoral lo constituye un grupo heterogéneo de poblaciones inmunocelulares de sangre periférica con capacidad de manifestar la función LAK, que inicialmente se caracterizó por la lisis de células tumorales obtenidas de manera reciente y de células malignas resistentes a la acción de las células NK (56).

En base a estudios inmunofenotípicos, ahora se sabe que la mayor contribución a la actividad LAK la proporcionan las células NK (CD16+, CD56+), los Mos y en menor proporción, los linfocitos T (CD3+, CD4-, CD8-, TCR $\gamma\delta$ o $\alpha\beta$). Originalmente la inducción del fenómeno LAK parecía ser dependiente de IL-2, pero con el conocimiento cada vez más amplio de las interacciones y funciones de las citocinas, se ha demostrado el efecto cooperador del TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-6 e incluso de la IL-7 en forma análoga a la IL-2 (57). Además, parecen existir circuitos que regulan la función LAK, debido a que se ha observado una actividad inhibidora por moléculas como la IL-4 y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) (58). Acerca de la capacidad efectora de estas células, se considera que utilizan los mecanismos de citotoxicidad convencionales propios de sus células progenitoras. La participación del sistema inmune en la eliminación de la

neoplasia se hace evidente in vivo en cortes histológicos del tumor, donde se ve reflejada la interrelación de las células inmunocompetentes del huésped y las células transformadas. Se ha demostrado que los linfocitos que infiltran al tumor (TIL) presentan, en general, una alta capacidad para eliminar al tumor autólogo (59) en una forma restringida o no por el MHC; este hecho pone de manifiesto la funcionalidad de los diferentes mecanismos inmunológicos con que cuenta el huésped para eliminar al tumor y, en vista de la estrecha interacción tumor-células inmunes, parece establecerse una compleja red que regula tanto el crecimiento de la neoplasia como su efectiva eliminación por parte del huésped, la cual es limitada por los diferentes mecanismos de evasión que presenta el tumor como un medio de supervivencia.

MECANISMOS DE EVASION

La naturaleza poco inmunogénica de la mayoría de las neoplasias humanas se explica como el resultado de una disminución en la densidad de Ags específicos, de moléculas de clase I y/o moléculas de adhesión en la superficie de las células malignas; este fenómeno representa en sí mismo, una manera de evitar tanto la activación de una respuesta inmune en su contra como la función eficiente de las células efectoras, lo cual

finalmente repercute en un incremento en las posibilidades de crecimiento tumoral.

Se ha observado que la célula tumoral manifiesta una disminución de la expresión de Ags en respuesta a la presión selectiva de los mecanismos efectores específicos, como lo demostraron Old y cols., quienes encontraron una pérdida de la antigenicidad del Ag TL en células leucémicas expuestas *in vitro* al correspondiente Ab (60).

Como una característica asociada al crecimiento celular, se ha encontrado que algunas neoplasias son capaces de liberar, mediante proteólisis y/o en forma de vesículas, Ags tanto del MHC, TDAs o TAAs, los cuales, además de intervenir como activadores de la inmunidad, actúan limitando los mecanismos de citotoxicidad mediados por Abs y la actividad de las células responsables de la ADCC al evitar la unión del Ab a la membrana de la célula tumoral (61).

A la vez, se ha demostrado que algunas neoplasias inducen Abs que pueden llegar a unirse a sus Ags de superficie, lo que propicia la activación del C' con la subsecuente lisis de las células malignas; sin embargo, en estos casos las células neoplásicas se valen de mecanismos adicionales para evitar su destrucción. Entre éstos, se ha encontrado que las células tumorales muestran un amplio repertorio de enzimas proteolíticas, por lo cual no es extraño encontrar que estas

enzimas, expresadas a nivel de membrana o secretadas al microambiente (62), actúen teniendo como sustrato los propios Abs, es así, que se han hallado fragmentos Fc y Fab en los eluidos de células tumorales (63), de este modo la digestión de los Abs en forma previa o durante su interacción con las células malignas evita la eliminación del tumor vía C' o ADCC.

Asimismo, Hellstrom y cols. determinaron en el suero de ratones con sarcoma progresivo, la existencia de factores bloqueadores, cuya actividad residía en inhibir el efecto citotóxico de linfocitos T reactivos a TSTAs, posteriormente demostraron que la naturaleza de estos factores correspondía a la formación de complejos inmunes solubles (64), los que también modifican la actividad efectora en contra del tumor.

Por otro lado y en relación a la actividad citolítica del C', tanto en sistemas de tumores animales y humanos, se ha descrito la producción de Abs bloqueadores, los cuales se unen a las células blanco pero son incapaces de activar al sistema del C' (65), es así que estos compiten con los pocos Abs que sí fijan C', lo cual permite de manera indirecta un incremento en la sobrevivencia del tumor. Sumado a este fenómeno, las células tumorales pueden expresar el factor acelerador del decaimiento (DAF), una glicoproteína de membrana que previene el ataque por C' debido a que favorece la disociación de las C3 y C5 convertasas, con lo cual acelera el decaimiento de estas enzimas

ancladas en su superficie celular, y disminuye en forma subsecuente la formación del complejo lítico de ataque a la membrana en la superficie de la célula tumoral (66).

Existe también otro grupo de moléculas con características inmunorreguladoras que pueden desprenderse de la membrana de las células transformadas, como es el caso del ICAM-1, molécula que aún en forma soluble conserva la capacidad de unir a su ligando, (LFA-1), de manera que se ha descrito la inhibición de la actividad NK y LAK en su blanco de acción por el impedimento ejercido por estas proteínas solubles (67). De igual forma, los receptores de IL-2 y TNF- α , presentes en algunas neoplasias, puede secretarse en forma activa con afinidad por las citocinas respectivas, las cuales por unión a su receptor en forma soluble, pueden verse inactivadas, bloqueando así su amplio espectro de funciones antitumorales; se ha demostrado in vitro que el CD25 (IL-2R de baja afinidad) neutraliza la actividad NK y LAK (68), mientras que el TNFR bloquea la actividad citolítica del rTNF- α (69).

A través de los mecanismos evasores de la inmunidad, la neoplasia puede modificar la respuesta del huésped a diferentes niveles, como ya se menciona la baja inmunogenicidad dificulta su reconocimiento a las células de la IS y en último instancia a las células citolíticas; sin embargo, no es la única forma de impedir la inducción de un rechazo inmunológico ya que en algunos

modelos se ha determinado una posible alteración en la función de las APCs, principalmente del Mo, por una disminución en su expresión de moléculas de clase II y en consecuencia de su capacidad para presentar los péptidos antigénicos (52), y/o también debido a que muestra una disfunción en su capacidad de generar la señal coestimuladora requerida para la activación de las células T (70).

En cambio, otros investigadores han sugerido una alteración en las funciones cooperadoras de las células Th (71); en este sentido, se ha demostrado una disminución en la producción de IL-2 (72), que puede deberse a que las células tumorales produzcan moléculas con propiedades inmunomoduladoras negativas como son las PGs y la familia del factor de crecimiento transformante (TGF).

A pesar de que en la actualidad existen diversos estudios que abordan, desde diferentes puntos de vista, el fenómeno evasivo y de inmunidad a las neoplasias, todos ellos parecen convergir en la posibilidad de que el manejo a nivel inmunológico, aunado a los tratamientos convencionales, sea de gran utilidad terapéutica en el paciente con cáncer.

ANTECEDENTES

Desde hace largo tiempo se ha observado, en modelos animales y en humanos, que el desarrollo neoplásico se asocia de manera directa o indirecta a una alteración en las actividades normales de las células inmunocompetentes, valoradas en la respuesta blastogénica a un estímulo mitogénico, reacciones de hipersensibilidad cutánea tardía, rechazo a injertos de piel y en la producción de Abs. Generalmente se ha atribuido esta disfunción inmunológica a un defecto en la función de las células T, el cual puede ser inducido por las células malignas o por las propias células del huésped, bajo la influencia del tumor (73,74). Con el fin de comprender este fenómeno, se han planteado diferentes explicaciones, en las cuales el punto de partida es el hecho de que las células cancerosas pueden inducir modificaciones en los mecanismos normales de autoregulación del sistema inmunitario del huésped.

Los estudios iniciales de Gershon y Kondo (75) atribuyeron un papel modulador y predominantemente supresor a una cierta población de linfocitos T (Ts) que podía actuar de manera inespecífica o en forma dependiente de Ag; en el campo de la inmunología tumoral, este hecho consideró que probablemente existía una correlación entre el desarrollo del tumor, la presencia de células Ts y la inmunodeficiencia observada de

manera natural o experimental.

Los estudios posteriores sobre el funcionamiento de los linfocitos Ts plantearon un complejo circuito de interacciones entre diferentes subpoblaciones de células Ts y los factores que éstas liberaban; pero en virtud de que esta teoría se sustenta sobre una endeble base molecular (76) y a la luz de los conocimientos actuales en relación a las subpoblaciones de las células Th, el fenómeno de supresión inespecífica se explica ahora en función de la actividad de las citocinas que liberan los linfocitos Th1 y Th2, de forma tal que la neoplasia podría modificar la actividad de alguna de estas dos subpoblaciones, alterando los procesos de inmunidad celular y/o humoral; sin embargo, el problema de la supresión Ag específica se encuentra aún en espera de una posible reformulación o de una explicación alterna a la de las células Ts.

SUPRESION NO ANTIGENO ESPECIFICA EN CANCER

Este tipo de supresión se caracteriza en forma predominante por la liberación de moléculas solubles por parte de la neoplasia, las cuales actúan de manera inespecífica sobre las células inmunocompetentes del huésped.

Un grupo de moléculas con capacidad inmunopresora asociada al tumor son las PGs, que en un gran número de estudios han sido también consideradas como las mediadoras de la actividad

supresora del Mo activado (77,24).

Las PGs normalmente son producidas por macrófagos, células dendríticas y fibroblastos bajo el efecto de diferentes estímulos como la IL-1, TNF- α , lipopolisacárido (LPS), componentes de la cascada del C', etc. Sin embargo, algunos tipos de tumores son capaces de liberar PGs de manera directa, mientras que otras neoplasias pueden inducir en el monocito su liberación (78).

Diversos estudios in vitro sustentan el papel supresor de las PGs al demostrar entre otros efectos la inhibición de la proliferación de células T, la síntesis de IL-2 y la producción de IgM por la célula plasmática. Estos efectos se originan de la interacción de las PGs con su receptor, el cual estimula la producción de un segundo mensajero, el CAMP, que modula algunos de estos efectos.

En relación a la inhibición de la célula T, se ha determinado que ésta se debe principalmente a la acción diferencial de las PGs sobre la subpoblación Th1 (79), suprimiendo de manera importante la secreción de IL-2 e IFN- γ mientras que la producción de IL-4 por linfocitos Th2 permanece inalterada; de manera adicional, la IL-4 parece establecer un mecanismo de retroalimentación al regular la actividad del Mo mediante la inhibición de la producción de PGs, TNF- α e IL-1 (80). Estos datos sugieren que la estrecha interacción que se establece entre las subpoblaciones de linfocitos Th y el Mo a través de los

distintos factores solubles que liberan, puede verse modificada de manera negativa por la acción de las células tumorales sobre alguno de los componentes de la respuesta inmunológica normal.

Paralelamente, se ha estudiado la actividad supresora del Mo de manera independiente de las PGs, la cual se identificó en la década de los 60s, cuando se reportó que un incremento en el número de estas células inhibía la respuesta primaria de Abs in vitro (81). En los pacientes con enfermedad maligna, el fenómeno supresor que llevan a cabo los Mos ha sido una característica notable que parece ser promovida directamente por la neoplasia. Esto último tiene apoyo en estudios donde reportan que productos liberados por células tumorales estimulan la maduración de diversas células sanguíneas, entre ellas a los monocitos/macrófagos, lo que conducen a un aumento numérico de esta población, alterandose el balance normal que guarda con los linfocitos T, lo cual se refleja como una supresión en la respuesta inmune (82).

Como se ha podido observar, los eventos que conducen a la disminución en la capacidad inmunológica del huésped en presencia de un tumor, están determinados de manera fundamental por la expresión de moléculas solubles con características inmunodepresoras; de esta forma encontramos que la neoplasia es la principal productora de este tipo de factores (73), de los cuales la gran mayoría hasta ahora han sido difíciles de

caracterizar, salvo algunas que también son producidas por las células normales, tal es el caso de la familia del TGF, que a continuación se describe.

El TGF- β , identificado inicialmente como un factor responsable de la transformación fenotípica de fibroblastos de rata (83), es un factor regulador del crecimiento y diferenciación de diferentes células, pues como ya se ha descrito, ejerce un fuerte efecto inhibitor de la proliferación de células epiteliales, inmunocompetentes y precursores hematopoiéticos (84). El TGF- β ha sido aislado y purificado de tejidos normal y neoplásico, lo que ha permitido su caracterización. Actualmente se sabe que existen tres tipos estrechamente relacionados tanto estructural como funcionalmente, por lo cual, prácticamente toda la información hará referencia al tipo II que es el más estudiado.

El TGF- β es secretado por un amplio espectro de tipos celulares y debido a que potencialmente tiene alcance en igual número de poblaciones que expresan el receptor específico, es natural y obligado que la actividad de este factor este sometida a una estrecha regulación. Es así que el TGF- β , que es liberado por cualquier estirpe celular, se encuentra de inicio en una forma latente (TGF- β 1) de alto peso molecular que para manifestar su funcionalidad requiere de una previa activación, la cual parece estar mediada por la actividad enzimática de la plasmina y catepsinas o por medio de procedimientos químicos como cambios

extremos de pH o la exposición a agentes caotrópicos (85).

Cuando el TGF- β se encuentra en forma activa se presenta como un homodímero de 25 Kd que puede inhibir una serie de eventos en las células inmunocompetentes tales como la cascada respiratoria y la expresión de moléculas de clase II en el macrófago, la proliferación de las células T y B, la producción de Abs por la célula plasmática y la actividad NK y LAK. En el caso del glioblastoma se ha descrito un tipo de inmunosupresión por TGF- β dependiente de la expresión de activadores, en este caso enzimas (85).

Respecto a los factores solubles secretados por las células tumorales, se considera que esta línea de investigación se inició como una ramificación de los estudios sobre la actividad inhibitoria encontrada en el suero de los individuos portadores de un tumor (73). Los estudios que abordan la actividad de estas moléculas supresoras se han realizado utilizando cultivos de células tumorales obtenidas de manera reciente, extractos de estas células y más frecuentemente líneas tumorales, con el inconveniente de que en estos sistemas, los resultados encontrados no necesariamente correlacionan con el fenómeno supresor que se presenta in vivo (73).

Hasta ahora, se considera que los factores liberados por el tumor parecen ser característicos de cada tipo de neoplasia, además de que una misma estirpe maligna puede expresar diferente

moléculas supresoras, como es el caso del mastocitoma P815 que, al ser inoculado intraperitonealmente en ratones DBA/2, causa la acumulación de líquido de ascitis, a partir del cual se han purificado dos fracciones, una de un alto peso molecular (mayor de 160 KD) y otra de bajo peso molecular (menor de 10 KD) (86), que producen el mismo efecto biológico de inhibir la estimulación mitogénica de las células inmunocompetentes.

Aunque se ha logrado determinar con cierta precisión el peso molecular de muy pocos de estos factores, éste es muy variable. La naturaleza de este tipo de moléculas es aún poco conocida debido a la gran dificultad que representa caracterizarlas dentro del amplio espectro de factores solubles que libera una célula tumoral; sin embargo, se considera que los factores supresores pueden incluirse tres grupos: a) los de naturaleza protéica, sensibles a la acción de enzimas proteolíticas o a ciertas temperaturas. En este grupo se han descrito moléculas producidas en tumores como el linfoma y mastocitoma (87, 88); b) los que presentan carbohidratos, resistentes al efecto proteolítico de ciertas enzimas y al calor, pero lábiles a la oxidación con periodato, como los factores liberados por las células del carcinoma de ovario, o recuperables mediante cromatografía de afinidad en columnas con lectinas en el caso de extractos de sarcoma, melanoma y carcinoma pulmonar (89, 90) y c), los que poseen grupos lipídicos y son insensibles a

degradación con proteasas, pero que son extraíbles con solventes orgánicos, como los factores purificados del mastocitoma P815 y los gangliósidos reportados en otras líneas tumorales (86,91).

Dentro de los efectos funcionales de estas moléculas, originalmente se determinó la incapacidad de las células mononucleares (MNC) para estimularse con mitógenos y células alogénicas, mientras que ahora se valora la IL-2 (92) y/o su receptor, y su estudio se ha extendido al efecto que ejercen estos factores sobre poblaciones efectoras como las células NK y LAK (93). De esta forma, a través del bloqueo de alguna de las poblaciones celulares participantes en la respuesta, se puede correlacionar la actividad de las moléculas supresoras liberadas por el tumor con las alteraciones en la inmunidad del huésped; sin embargo es importante señalar que es primordial el estudio de la fase inductora ya que, como lo propone Mass (94), en ocasiones una disfunción en la actividad celular en la fase efectora, la producción de Abs específicos o la citotoxicidad celular, puede ser una consecuencia de una alteración provocada por el tumor en las células inductoras de la inmunidad, principalmente en el linfocito Th, que al encontrarse inhibido no promueve adecuadamente las funciones efectoras.

Uno de los pocos casos en que se ha logrado la caracterización exacta de las moléculas responsables de la inmunosupresión es en el caso del glioblastoma (95), donde inicialmente se encontró que

los linfocitos de sangre periférica (PBL) obtenidos de estos pacientes, presentaban un defecto en su respuesta al estímulo inducido por mitógenos y/o Ags, posteriormente se encontró que este fenómeno se debía a una alteración en la secreción de IL-2 por las células Th así como en la expresión del IL-2R de alta afinidad. Hallazgos previos sobre la capacidad inhibidora en la funcionalidad de linfocito T, por componentes del suero de pacientes con glioblastoma, sugirió como responsables a moléculas producidas por dicha neoplasia, lo cual fué confirmado mas tarde al encontrar que el sobrenadante del cultivo de líneas y de células del tumor obtenidas de manera reciente, producían el mismo efecto; actualmente se ha logrado la caracterización de dichos factores, los cuales corresponden a la familia del TGF- β y en particular al tipo 2 (96).

De manera similar, fué en 1968 cuando Krant (97) demostró por primera vez que en el cáncer pulmonar se presentaba una inmunosupresión en la actividad celular, la cual valoró mediante ensayos de hipersensibilidad tardía y estimulación mitogénica de linfocitos T, por lo cual atribuyó este fenómeno supresor a una linfopenia y a una deficiencia de las células T causadas por el tumor; posteriormente, en el suero de los pacientes con cáncer pulmonar se encontró la presencia de factores séricos que inhibían la respuesta de Abs en células esplénicas estimuladas con eritrocitos de carnero (98), planteandose las posibilidades

de que dichas moléculas fueran producidas por las células tumorales o del propio huésped; más tarde, Roth (90) reportó que los extractos obtenidos de biopsias de carcinoma pulmonar inhibían la estimulación mitogénica de MNC de individuos normales, esto apoyaba la propuesta de que las células del carcinoma broncogénico eran productoras de moléculas responsables de la inmunosupresión en el huésped; por otra parte, el trabajo de Vose (99) respecto a la inhibición de la actividad de los TIL en biopsias de tumores pulmonares, atribuye este efecto a las células inmunocompetentes del huésped, las cuales regulan su respuesta de manera negativa; sin embargo, en este reporte queda como incógnita la contribución del tumor en este fenómeno.

En este contexto y aunado a estos estudios, los cuales no hacen énfasis en la estirpe histológica del tumor, en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, el grupo del Dr. Sullivan observó que en las biopsias de pacientes con Ca. pulmonar, los TIL presentaban una alteración de su capacidad proliferativa en su respuesta a un estímulo mitogénico (100) y de manera particular, en el caso del adenocarcinoma los TIL presentaban la mayor inhibición. Este trabajo tiene como finalidad dilucidar si dicha inhibición es causada por moléculas solubles liberadas por la propia neoplasia.

OBJETIVOS

1. Investigar la posible inmunosupresión generada por los diferentes tipos de neoplasias pulmonares como un mecanismo de evasión a la respuesta inmune del huésped.
2. Estudiar este fenómeno mediante la utilización de métodos in vitro que permitan poner de manifiesto la posible producción de molécula(s) soluble(s) inmunosupresora(s).
3. En caso de encontrar dichos factores, valorar su efecto en la función de las MNC y determinar la(s) célula(s) blanco de la acción de tales moléculas.
4. Evaluar la influencia que los factores supresores ejercen en la fase inductora de la respuesta inmune y de forma particular, en la proliferación de los linfocitos T y la producción de TNF por la población de células sanguíneas adherentes.

MATERIAL Y METODOS

Líneas celulares. Se utilizaron las líneas de tumores pulmonares humanos tipo adenocarcinoma (A-427), ca. epidermoide (SK-MES-1), ca. de células pequeñas (NCI-H69), así como dos líneas tumorales de origen no pulmonar, una eritroleucemia (K-562) y un linfoma (Jurkat). Por otro lado, para la determinación de TNF se manejó una línea de fibroblastos de ratón sensible a esta citocina (L-929).

Todas las líneas celulares fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC). Estas células se mantuvieron en crecimiento en el medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma No. cat. R 6504), al cual se hará referencia en todo el desarrollo experimental; éste se suplementó con 10% de suero fetal bovino (FCS) (Flow No. cat. 29-161-54) y con una mezcla de antibiótico constituida por Penicilina (100 ug/ml) y Estreptomicina (100 ug/ml).

Obtención de células mononucleares. A partir de muestras sanguíneas heparinizadas obtenidas de individuos sanos, se recuperaron las células mononucleares (MNC). Estas se separaron mediante un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (Nycomed No. cat. 802912) (101), se lavaron 3 veces con solución salina balanceada (BSS) y mediante una tinción vital con azul tripano (Sigma No cat. T 9520), la cual se utilizó rutinariamente en el

conteo celular, las MNC se ajustaron a una concentración de 1×10^6 /ml.

Curva de dosis respuesta a concanavalina-A. Con el fin de determinar la concentración óptima de concanavalina A (Con-A) (Sigma No. cat. C-2010) necesaria para obtener la máxima estimulación de las MNC, se realizó una curva de dosis respuesta. A las MNC resuspendidas en un volumen de 100 μ l, se adicionó el mismo volumen de Con-A a las concentraciones de 1, 5, 10 y 50 μ g/ml. El cultivo se incubó por 72 h siguiendo las condiciones señaladas para el ensayo de proliferación celular.

Obtención de células adherentes. A partir de las MNC de los individuos 1-5 y A-D, se obtuvieron las células con propiedad de adherencia al plástico; con este fin las MNC se resuspendieron en medio de cultivo para ser colocadas en una placa de plástico, la cual se incubó a 37 °C en atmósfera de 5% de CO₂ durante 2 h. Posteriormente, se recuperaron las células no adherentes provenientes de los tres primeros lavados y la placa se continuó lavando las veces requeridas hasta observar solo células adheridas. Con el propósito de favorecer su desprendimiento, se trataron con MOPS-EDTA (Sigma No. cat. M 6270) a 37 °C en atmósfera de CO₂ por 15 min y su separación fué completada en forma mecánica mediante el uso de un gendarme. Los monocitos se

lavaron dos veces, se cuantificaron utilizando azul tripano, y se ajustó su concentración a 1×10^6 /ml. La pureza de los monocitos, valorada por la tinción inespecífica de la esterasa (Sigma No. cat. 180 B), fué del 75 al 85 %.

Preparación de eritrocitos de carnero con AET. Se obtuvieron eritrocitos de carnero (SRBC) en solución de Alsever y esta suspensión se trató con bromuro de 2-aminoetilisotiourea (AET) como lo describieron Madsen y Johnsen (102). En breve, los SRBC se lavaron 3 veces con solución salina isotónica (SSI) y al paquete celular se le adicionó una solución 140 mM de AET a pH 9.0, la suspensión se incubó a 37 °C durante 15 min para después eliminar el AET por lavados sucesivos con SSI hasta que no se detectó hemólisis. Finalmente, se preparó una suspensión al 1% de SRBC "tratados".

Purificación de linfocitos T por formación de rosetas E. Las células no adherentes, recuperadas a partir de las MNC, se ajustaron a una concentración de $2-3 \times 10^6$ /ml para luego adicionar un volumen similar de la suspensión de SRBC "tratados". Esta mezcla se incubó a 37 °C por 15 min, se centrifugó a baja velocidad por 5 min e inmediatamente se incubó a 4 °C durante 4 h. Transcurrido este tiempo, se resuspendió suavemente el botón de células y en base a su tamaño se recuperaron las rosetas E

mediante un gradiente de densidad en Ficoll-Hypaque, luego del cual el paquete celular obtenido se sometió a un choque hipotónico para eliminar los eritrocitos. Los linfocitos T, purificados de esta manera, se lavaron tres veces con medio de cultivo y se cuantificaron ajustando a una concentración de 1×10^6 /ml. La pureza de la población de células T, determinada por inmunofluorescencia indirecta utilizando Abs anti-CD3, fué del 95 al 98%.

Obtención de las líneas celulares. Las células del linfoma, eritroleucemia y Ca. de células pequeñas se recuperaron en forma mecánica, mientras que las líneas de Adenocarcinoma y Ca. epidermoide por medios enzimáticos con tripsina-verseno (In vitro No. cat.910303). Todas las líneas se lavaron tres veces con BSS y, debido a la diferencia en su tiempo de generación, se ajustó su concentración a razón de 1×10^6 /0.6 ml para las primeras y 1.6×10^6 /0.6 ml para las segundas, ésto con el objeto de que al finalizar el cocultivo su concentración fuera muy similar; además, dicho cocultivo solo se realizó cuando las células tumorales mostraban una alta viabilidad.

Cocultivo celular. Las células tumorales se colocaron en una placa de plástico de 24 pozos (Nunc No. cat. 143982), mientras que las MNC o los linfocitos T en su caso, se incorporaron en un

compartimiento adicional, provisto en su base con una membrana de policarbonato con un poro de 0.45 μm (Transwell Costar No. cat. 3413). De esta forma, se realizó un cocultivo en un doble compartimiento que únicamente permitió la interacción celular a través de moléculas solubles.

Los controles de los experimentos consistieron en colocar las células inmunocompetentes en ambos compartimientos.

Cuando se utilizaron monocitos, éstos se colocaron en el compartimiento inferior, mientras que la línea de Adenocarcinoma pulmonar en el superior. Para los controles de este experimento se utilizó la misma distribución que en los antes señalados.

Todos los ensayos se incubaron a 37 °C en atmósfera de 5% de CO_2 por un tiempo de 18 h.

Ensayo de proliferación celular. Finalizado el período de incubación del cocultivo, se recuperaron las MNC y los linfocitos T del Transwell, se lavaron y se ajustaron a una concentración de 1×10^6 /ml y 100 μl de esta suspensión se colocó en pozos de una placa de 96 (Nunc No. cat. 168055) para luego añadir 100 μl de medio de cultivo (basales) o de Con-A a la concentración óptima (estimulados). La placa se incubó a 37 °C por un intervalo de 72 h y justamente faltando 18 para finalizar dicho período, se adicionó 1 μCi de timidina tritiada a cada pozo (Amersham No. cat. TRA 120). Al terminar el tiempo de incubación, se procedió a

recuperar el cultivo marcado con ayuda de un cosechador de células (Brandel MH-12 Serie 8635), de manera que el DNA marcado quedara retenido en zonas individuales de tiras de papel de fibra de vidrio (Brandel No. cat. FP-12), las cuales se trasladaron a viales conteniendo líquido de centelleo (Ready Safe. Beckman No. cat. PN158735) para determinar la cantidad de timidina incorporada al DNA utilizando un contador de centelleo (Beckman Modelo LS 6000SE No. cat. 606603), que reportó los resultados en cuentas por minuto (cpm).

Estimulación de monocitos. Al finalizar la incubación del cocultivo de monocitos, se eliminaron los compartimientos que contenían a las células tumorales y las células adherentes fueron estimuladas con 50 ul de lipopolisacárido (LPS) a una concentración de 10 ug/ml, incubándose a 37 °C durante 24 h. Transcurrido este período, se recuperó el sobrenadante (SN), en el cual posteriormente se valoró la actividad del TNF.

Determinación de TNF. Este ensayo se realizó siguiendo la técnica descrita por Sullivan y cols. (103), la cual se describirá brevemente. Las células L-929, previamente separadas por tripsinización, se ajustaron a una concentración de 3×10^5 /ml, de donde se colocaron 100 ul a cada pozo de una placa de 96. A estas células, se adicionaron 100 ul de mitomicina C (5 ug/ml)

(Sigma No. cat. M-0503) y se incubó la placa a 37 °C durante 24 h. Después de lo cual se eliminó la mitomicina y se agregaron 100 ul de medio de cultivo y 100 ul de diluciones seriadas del SN proveniente de los monocitos activados. Este cultivo se incubó a 40 °C durante 24 h. Finalmente, se desechó el medio de la placa para fijar las células con glutaraldehído (Merck No. cat. 4239) al 2.5% por un tiempo de 15 min, después de un lavado con solución balanceada de fosfatos (PBS) se tiñeron las células con cristal violeta (Merck No. cat. 9007391) al 0.2% en PBS durante 15 min, se lavó la placa y se adicionaron 200 ul de ácido acético al 33%. Se midió la absorbancia a 570 nm en un lector Dynatech MR 600, que reportó los resultados en unidades de absorbancia.

Cálculos y análisis estadístico. Para cuantificar la inhibición causada por cada una de las líneas celulares en la proliferación de MNC y linfocitos T, se utilizó la siguiente fórmula:

$$IP (\%) = \left(1 - \frac{\text{cpm exp (est)} - \text{cpm exp (basal)}}{\text{cpm control (est)} - \text{cpm control (basal)}} \right) \times 100$$

en donde

IP(%) = Porcentaje de inhibición de la proliferación.
 cpm exp = Cuentas por minuto de los linfocitos (previamente cocultivados con cada una de las líneas tumorales) estimulados.
 cpm (basal) = Cuentas por minuto de los cultivos de linfocitos, ya sea experimental o control, no

estimulados.
cpm control = Cuentas por minuto del control (linfocitos en cocultivo con células autólogas) en presencia del mitógeno.

Para calcular el porcentaje de inhibición generado por el tumor en la producción de TNF por los monocitos, se aplicó la siguiente relación:

$$IC = \left(1 - \frac{DO \text{ exp (est)} - DO \text{ L929}}{DO \text{ control (est)} - DO \text{ L929}} \right) \times 100,$$

donde

- IC = Inhibición de la citotoxicidad.
- DO exp (est) = Densidad óptica causada por el SN de monocitos cocultivados con la línea de Adenocarcinoma y posteriormente estimulados con LPS.
- DO L929 = Desarrollo de color máximo debido a la población intacta de células L-929.
- DOmonos est = Densidad óptica causada por el SN obtenido del cultivo de monocitos control estimulados con LPS.

Finalmente, para determinar si existían diferencias significativas entre los grupos experimentales con respecto al comportamiento de los controles, se utilizó la prueba t de Student.

RESULTADOS

Con el objetivo de valorar si los diversos tipos de tumor causan algún efecto inhibitorio, mediado por factores solubles, en las principales poblaciones que participan en el fenómeno inmunológico, se cocultivaron células de origen sanguíneo de individuos sanos con las diferentes líneas celulares malignas, mediante un sistema que sólo permitió su interrelación a través de moléculas solubles. Los resultados de nuestros experimentos se mencionarán a continuación.

Determinación de la dosis óptima de Con-A para inducir la máxima estimulación en MNC. Con el fin de determinar la concentración de mitógeno más adecuada para inducir la máxima proliferación en las MNC, éstas se estimularon con distintas concentraciones de Con-A. Como se observa en la fig. 1, la mayor estimulación se produjo cuando las MNC se pusieron en presencia de 10 ug/ml de la lectina; dicha concentración así como el lote de Con-A se mantuvieron constantes durante todo el desarrollo experimental.

Efecto de los factores liberados por las diversas líneas de tumores estudiados en la proliferación de las MNC. En la Fig. 2 se muestra la proliferación de MNC de 11 individuos sanos después de haber interaccionado, en el cocultivo anteriormente

CURVA DE DOSIS-RESPUESTA A CONCAVALINA-A

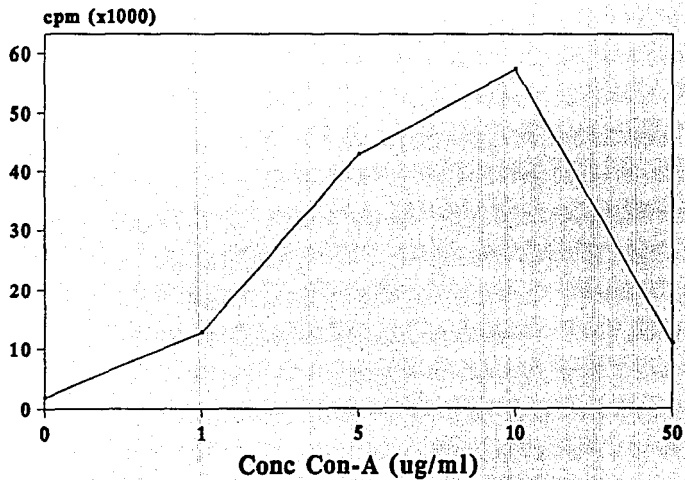


Fig. 1

descrito, con cada una de las líneas de células tumorales. La primera barra, representa el control de máxima estimulación inducida por el mitógeno en las MNC provenientes del cocultivo con las MNC del mismo individuo. En esta misma figura se observa de manera general que los tumores de origen no pulmonar, eritroleucemia y linfoma, no afectan de manera importante la proliferación de las MNC; en contraste con las neoplasias pulmonares que causan, en la mayoría de los individuos, una profunda alteración en la respuesta proliferativa de estas células.

Efecto de los factores liberados por las distintas líneas de tumores estudiados en la proliferación de linfocitos T. En la fig. 3 se encuentra representada la proliferación de los linfocitos T obtenidos de 9 individuos sanos, cinco de los cuales (1-5) aparecen en la gráfica anterior (fig.2), después de haber estado en contacto en un cocultivo con cada línea celular. Al igual que en las MNC, la primera barra representa el control de la mayor estimulación generada por el mitógeno en los linfocitos T, que proceden del cocultivo con las correspondientes células autólogas. El comportamiento de los controles, como en el caso de MNC, es sumamente variable. Como se observa en la gráfica, los resultados exhiben un comportamiento análogo al de MNC, ya que se puede observar que las neoplasias de origen no pulmonar no

PROLIFERACION DE MNC

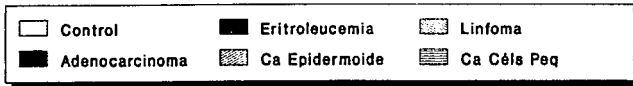
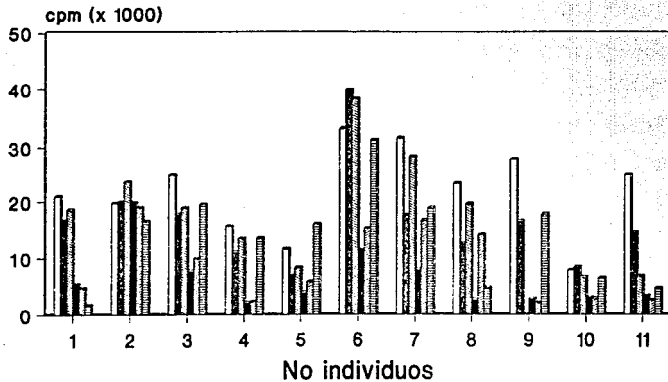


Fig. 2

PROLIFERACION DE LINFOCITOS T

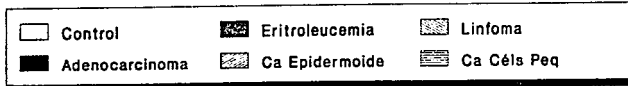
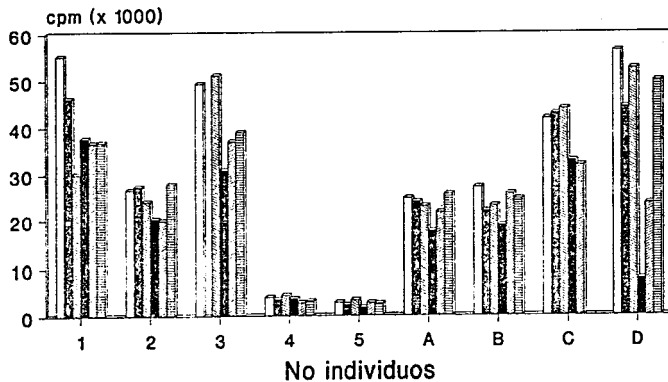


Fig. 3

alteran de manera significativa la proliferación de las células T, mientras que los tumores pulmonares parecen tener también un efecto negativo en los linfocitos T, sin embargo éste es mucho menor que en el caso de las MNC.

En las gráficas anteriores hemos podido señalar algunas de las características principales de nuestros resultados; no obstante, no es posible percibir con claridad la influencia real de cada línea tumoral en las células inmunocompetentes, por esta razón decidimos representar los datos en gráficas que muestran el porcentaje de inhibición causado por cada una de las neoplasias estudiadas con respecto al control de máxima estimulación.

Comparación del efecto inhibitorio de las distintas neoplasias en MNC y linfocitos T. En este conjunto de gráficas se presenta el porcentaje de inhibición generado en MNC y linfocitos T por las distintas líneas transformadas, como se muestran en las figs. 4 y 5.

Con respecto a nuestras líneas control (fig. 4), la línea de Eritroleucemia causa una inhibición en MNC del 30 al 46 % en 7/11 casos mientras que en linfocitos T, en la mayoría de los individuos, varía entre el 16 y 30 %. Por otra parte, la línea de linfoma genera un bloqueo en la proliferación de MNC por debajo del 30% en prácticamente todos los casos (9/10), lo cual parece repetirse en linfocitos T ya que en éstos se muestra una

INHIBICION DE LA PROLIFERACION DE MNC Y LINFOCITOS T POR TUMORES NO PULMONARES

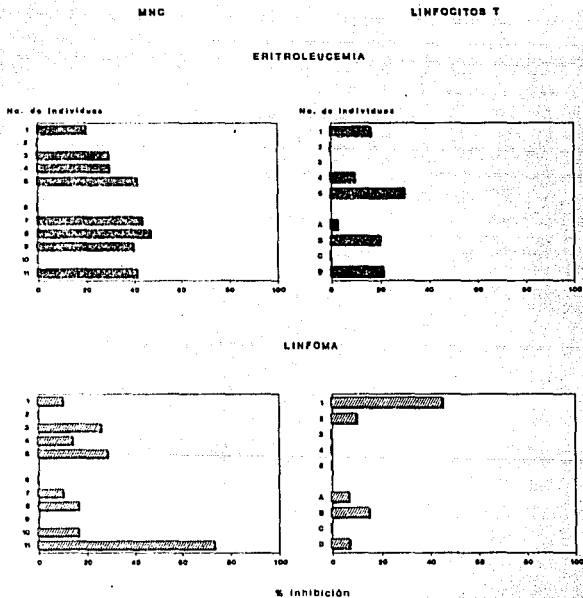
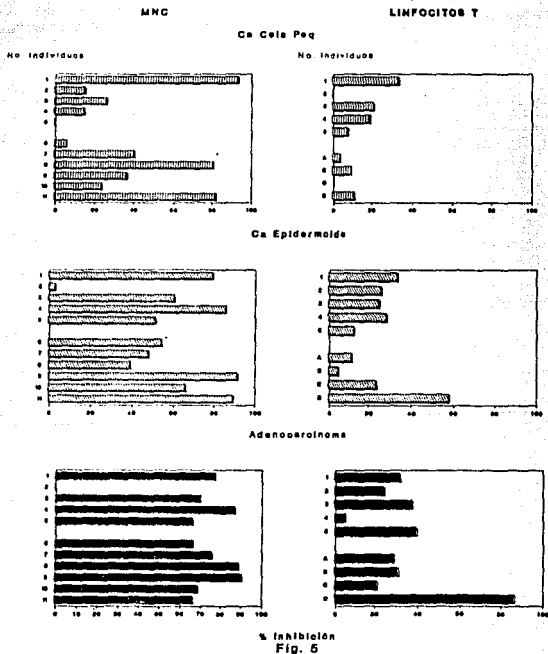


Fig. 4

(INHIBICION DE LA PROLIFERACION DE MNC Y LINFOCITOS T POR TUMORES PULMONARES



alteración menor al 15 % en la mayor parte de la población en estudio (8/9).

En relación al efecto que causan las neoplasias pulmonares (fig. 5), es en éstas donde encontramos los mayores niveles de inhibición. El ca. de células pequeñas induce en las MNC de 3/11 casos una supresión mayor del 80 % en tanto que en los linfocitos T se observa que la inhibición máxima fué del 30%. Por su parte, el ca. epidermoide afecta a las MNC en niveles del 60 al 90 % en prácticamente la mitad de los individuos (6/11), esta inhibición baja considerablemente en linfocitos T, a niveles que fluctúan entre el 20 y 30 % en 5/9 casos. De manera contrastante, el adenocarcinoma pulmonar induce de manera consistente los niveles más altos de inhibición. En las MNC los porcentajes sobrepasan el 60% en 10/11 individuos, mientras que en esta misma población el ca. epidermoide afecta a 6/11 sujetos; con respecto a los linfocitos T éstos sufren una inhibición mayor al 30 % en 6/9 sujetos, a diferencia del ca. epidermoide, que bloquea en este rango a sólo 2/9 personas.

Efecto del adenocarcinoma pulmonar en la actividad del monocito. Debido a que el adenocarcinoma indujó una alteración notable en las MNC y ésta fué menor en la población de células T, decidimos evaluar la posible influencia que pudiera tener este tumor en la funcionalidad de los monocitos; con este fin, se

concentró el estudio en el efecto de este tumor sobre la producción de TNF en células adherentes.

En la Fig. 6 se muestran los resultados del efecto del Adenocarcinoma pulmonar sobre la liberación de TNF por monocitos obtenidos de 8 individuos sanos . En este caso, se expresaron los datos en porcentajes de citotoxicidad. Como se muestra en la fig. 6, el adenocarcinoma produce una inhibición estadísticamente significativa ($p < 0.001$), de aproximadamente un 20 %, solamente en 1/8 individuos.

Finalmente, se decidió representar de manera gráfica la comparación de las alteraciones causadas por el adenocarcinoma en las tres poblaciones analizadas (Fig. 7). La tendencia general es que el adenocarcinoma genera en las MNC una modificación mayor del 60% en 4/5 individuos. El efecto de este tumor sobre las células T fué mucho menor, en un rango del 20 al 40%, y prácticamene no modificó la funcionalidad del monocito. Es importante señalar que la suma de las inhibiciones en los monocitos y linfocitos T no corresponde al total de la mostrada por las MNC.

EFFECTO DEL ADENOCARCINOMA PULMONAR SOBRE LA CITOTOXICIDAD DEBIDA AL TNF

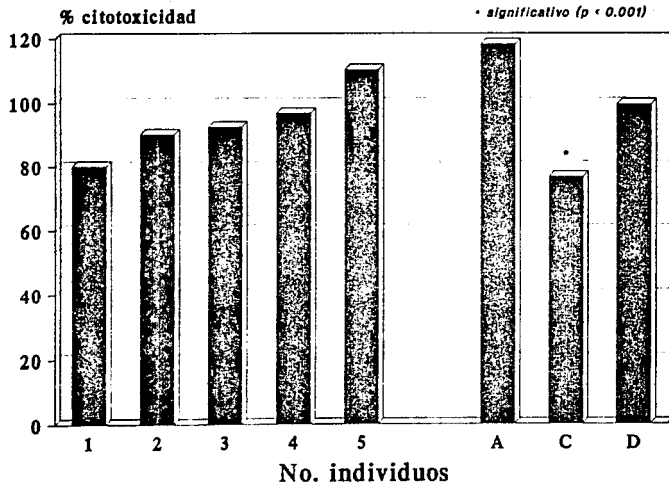


Fig. 6

COMPARACION DE LA INHIBICION CAUSADA POR EL ADENOCARCINOMA PULMONAR

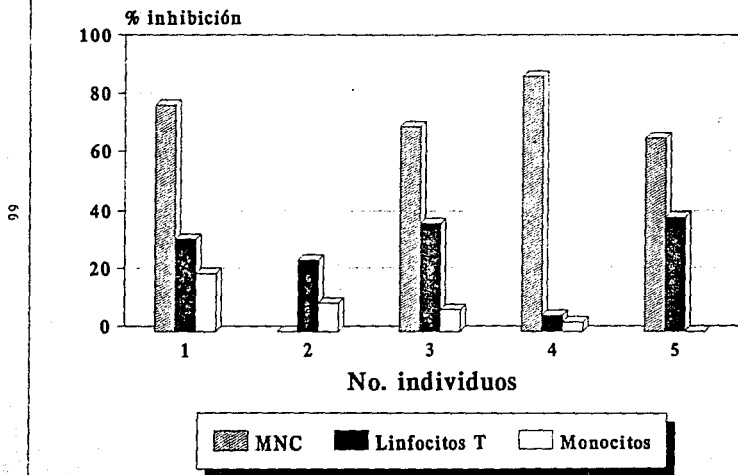


Fig. 7

DISCUSION

En virtud de que se deseaba estudiar la posible producción de moléculas inmunosupresoras por las diferentes estirpes histológicas del carcinoma pulmonar, decidimos utilizar un sistema de cocultivo in vitro en el cual, se evitó el contacto directo entre las células inmunocompetentes y las líneas tumorales, ambas poblaciones interaccionaron únicamente a través de la liberación de factores solubles, cuyo efecto se valoró posteriormente al determinar alteraciones en la respuesta proliferativa inducida por un mitógeno; mediante el uso de este sistema se pudo evaluar el efecto de las células tumorales en el fenómeno de activación de la respuesta inmunológica, por lo que iniciaremos la discusión haciendo referencia a algunos aspectos de nuestro sistema experimental.

Con el propósito de que el efecto inhibitor se pusiera de manifiesto sin afectar la viabilidad de las células inmunológicas, en estudios previos, se establecieron previamente las condiciones óptimas de cocultivo, las cuales tuvieron como parámetros constantes la relación numérica entre las poblaciones participantes y el periodo de incubación del cocultivo. Además se utilizaron dos líneas celulares de origen no pulmonar como contraste con las líneas de tumores pulmonares, así como para el control del efecto ejercido por la pérdida rápida de nutrientes

en el medio y la acidificación de éste en la proliferación de las células inmunes, a causa de la elevada capacidad metabólica que presentan estas líneas.

En relación a la máxima proliferación inducida por el mitógeno, tanto para las MNC como para los linfocitos T, se consideró que el cultivo de células inmunocompetentes, en uno y otro compartimento del sistema de cocultivo, representaba nuestro control óptimo, ya que las condiciones fueron lo mas similares a las de los cocultivos con las líneas tumorales. Es así que todos los cocultivos con las líneas celulares tuvieron como marco de referencia el control mencionado, el cual como se observa en las Figs. 2 y 3 es sumamente variable de un sujeto a otro, lo cual se ha asociado tanto a las características genéticas como a factores fisiológicos y nutricionales del individuo (104).

Como se observa en la fig. 2, las MNC sufren una severa alteración en su proliferación, principalmente por efecto de su interacción con las neoplasias pulmonares. En relación a dicha inhibición, el efecto supresor más notable en MNC se debió a la línea de adenocarcinoma y ca. epidermoide, mientras que las líneas control aparentemente no causaron inhibición. No obstante, al observar con más detalle estos resultados, encontramos que la línea de la eritroleucemia presenta un ligero efecto, de aproximadamente el 40%, en casi la mitad de los individuos estudiados, lo cual correlaciona con un reporte

reciente (105), en el cual del sobrenadante del cultivo de estas células se concentró una fracción que suprime de manera considerable la proliferación de MNC estimuladas con un Ab anti-CD3; en nuestros ensayos, la inhibición fué menor a la reportada por este grupo, lo cual puede deberse a la diferencias en el sistema experimental utilizado así como a las variaciones genéticas entre las poblaciones analizadas.

Por su parte, la línea del linfoma causó un fenómeno más homogéneo puesto que en 10/11 casos se presenta una inhibición por debajo del 30%, lo cual sugiere que esta línea no libera factores supresores que afecten a las MNC; sin embargo, existe un reporte (106) en el cual se prueba el efecto de diversas líneas neoplásicas sobre las MNC en un sistema de cocultivo directo, después del cual las células se estimularon con fitohemaglutinina (PHA), un mitógeno de células T, encontrándose un nivel de supresión de alrededor del 70%. Es así que el linfoma parece ejercer su efecto inhibitor probablemente a través de un contacto intermembranal, de manera que en nuestro sistema de cocultivo indirecto no sea posible detectar dicha inhibición.

También es importante destacar que este tipo de fenómeno en ocasiones no se presenta de igual manera cuando se cambia de mitógeno, como lo indican los datos de Renk (107), en donde ciertos individuos manifestaron diferencias notables en la inhibición de la proliferación de las células T cuando se utilizó

PHA o Con-A; por lo cual, otra posibilidad es que el tipo de mitógeno utilizado haya contribuido a las diferencias observadas en nuestros ensayos respecto a los anteriormente mencionados.

Por otro lado, en las líneas de cánceres pulmonares, el ca. de células pequeñas, que se ha caracterizado por su capacidad de producir hormonas (108), generó en nuestros experimentos una inhibición en 3/11 casos (Nos. 1, 8 y 11), en donde quizás las MNC de estos individuos son altamente susceptibles genéticamente y/o sensibles a cambios en las condiciones de cultivo (variaciones de pH, disminución de nutrientes, presencia de enzimas) (ver fig. 5).

Con respecto a la línea de ca. epidermoide, ésta indujo en las MNC un patrón de inhibición más homogéneo que en el caso anterior y, dado que en 6/11 casos se presentó un profundo efecto negativo, parece indiscutible la producción de moléculas supresoras las cuales, debido a que ciertos individuos presentaron una baja susceptibilidad a su acción, parecen ejercer su actividad en función de las características genéticas propias de cada sujeto.

Finalmente, el efecto supresor de la línea de adenocarcinoma fue muy significativo en prácticamente todos los sujetos de estudio, lo cual indica que esta neoplasia libera moléculas solubles, probablemente de manera constitutiva, las que suprimen la proliferación de MNC; sin embargo, es todavía difícil

extrapolar el comportamiento de esta línea tumoral a este tipo de tumores. A este respecto será necesario establecer líneas de células transformadas con igual grado de diferenciación para estudiar si presentan este mismo comportamiento.

Al indagar sobre el blanco de acción de los factores supresores, se decidió estudiar en primera instancia la población enriquecida de linfocitos T los cuales, al igual que las MNC, se cocultivaron en un sistema indirecto con cada una de las líneas tumorales, esperando obtener elevados porcentajes de inhibición o cercanos a los de MNC; sin embargo, al analizar los resultados, se observa que de manera global se presentaron inhibiciones menores que en MNC, pero a pesar de esta disminución en los porcentajes de supresión, el comportamiento de las células T frente a cada línea celular correlacionó con el de MNC.

En el caso de las líneas de las neoplasias no pulmonares, nuevamente sobresalió la línea de eritroleucemia pues se produjeron valores de inhibición significativos en la mitad de la población analizada; estos resultados indican que el factor supresor producido por esta línea no afecta de manera primordial a los linfocitos T como sugiere De Felice (105).

Con respecto a la línea del linfoma, sigue siendo válida la posible acción a nivel intermembranal de estas células, ya que en el sistema utilizado tampoco fué posible detectar una fuerte inhibición en linfocitos T, pues solamente 2/9 sujetos se

inhibieron frente a esta línea.

En cuanto a los tumores pulmonares, la línea de ca. de células pequeñas, de igual forma que en MNC, inhibió ligeramente sólo a 3/9 individuos, de los cuales 2 (Nos. 1 y 3) fueron afectados por las otras neoplasias pulmonares, lo que parece indicar una particular disposición de las células inmunocompetentes de algunos individuos, a ser inhibidas por los diferentes tipos de tumores pulmonares.

El ca. epidermoide por su parte, indujo un patrón de inhibición en linfocitos T análogo al expresado en MNC, lo cual a pesar de no ser tan constante en toda la población de estudio, indica que los factores inhibidores que produce este tumor pueden también afectar a las células T, aunque en menor proporción.

Finalmente, la inhibición mayor y más constante fué causada nuevamente por el adenocarcinoma, ya que en 6/9 personas se provocó una inhibición significativa, pero menor que en MNC, lo cual pone énfasis en que las moléculas supresoras liberadas por esta línea celular generan una alteración sobre linfocitos T, aunque no parece afectar sólo a esta población celular.

En base a los resultados previos, decidimos analizar la población de monocitos, lo cual fué posible en solo algunos de los sujetos de estudio, y para ello se valoró la liberación de TNF. Este estudio se realizó únicamente con la línea de adenocarcinoma, la cual fué la que sintetizó los factores

solubles con características inmunosupresoras predominantes.

Al revisar los datos obtenidos sobre la inhibición en la producción de TNF, encontramos que esta línea celular tuvo poca influencia (1/8 casos) en la actividad de los monocitos, lo que sugiere que esta neoplasia no ejerce su efecto inhibitorio directamente sobre los monocitos ó bien, si existe alguna acción, ésta no se manifiesta a nivel de la producción de TNF.

Haciendo una correlación global de nuestros resultados con la línea de Adenocarcinoma pulmonar (fig. 7), nos parece importante se establezca la interacción entre los linfocitos "modificados" por el contacto con las moléculas supresoras liberadas por esta línea y los monocitos, que parecen no modificar su actividad por la acción de dichos factores; a este respecto, como una posible explicación, proponemos el siguiente modelo en el cual el tumor liberaría factores supresores que actuarían de manera preferencial sobre linfocitos T, lo que impide que esta población inmunológica libere moléculas solubles que favorezcan la adecuada activación del monocito, que a su vez genera señales que actúan de manera negativa en las células T; de tal forma que esta última población presente en MNC recibe tanto una señal negativa de las propias células malignas como la producida por el monocito. Por otra parte, este modelo también explica que cuando se elimina la población de células adherentes, se evita también que expresen su acción inhibidora, por lo cual las células T sufren solamente la

influencia del adenocarcinoma y presentan por lo tanto una menor inhibición en su proliferación con respecto a las MNC.

Esta interpretación parece coincidir con lo descrito por Fariñas (109), donde en pacientes con ca. broncogénico se valoró el efecto de los monocitos sobre las células T estimuladas con un mitógeno, en estos experimentos, al igual que en los nuestros, se encontró una mayor inhibición de la estimulación en MNC comparada con los linfocitos T, y en lugar de determinar TNF se cuantificó la producción de IL-1 en monocitos, la cual se presentó dentro de los niveles normales, de igual forma que con nuestros resultados al analizar TNF.

Finalmente, a pesar de que son necesarios mas estudios para comprobar el modelo propuesto, este podría explicar como se generan en los pacientes con cáncer pulmonar avanzado las profundas alteraciones cuantitativas y funcionales que presentan los monocitos, linfocitos T y células B a nivel sistémico, descritas de manera constante en la literatura (97).

BIBLIOGRAFIA

1. Wainscoat JS and Fey MF. Assesment of clonality in human tumors: a review. *Cancer Res.* 50:1355-1360, 1990.
2. Bishop JM. The molecular genetics of cancer. *Science.* 235:305-311, 1987.
3. Park M and Van de Woude GF. Principles of molecular cell biology of cancer: oncogenes. 45-66. In: *Cancer. Principles & Practice of Oncology.* De Vita, Hellman & Rosenberg. J.B. Lippincott Company, USA. 1989. Vol I. Ch 4. pp 45-66.
4. Weinberg AR. Tumor suppressor genes. *Science.* 254:1138-1145, 1991.
5. Kriek E, Engelse DL, Scherer E, Westra JG. Formation of DNA modifications by chemical carcinogens. Identification, localization and quantification. *Biochim Biophys Acta.* 738:181-201, 1984.
6. Pitot CH. Principles of carcinogenesis: chemical. In: *Cancer. Principles & Practice of Oncology.* De Vita, Hellman & Rosenberg. J.B. Lippincott Company, USA. 1989. Vol I. Ch 8. pp 116-135.
7. Fry Michael RJ. Principles of carcinogenesis: Physical. In: *Cancer. Principles & Practice of Oncology.* De Vita, Hellman & Rosenberg. J.B. Lippincott Company, USA. 1989. Vol I. Ch 9. pp 136-148.
8. Howley PM. Principles of carcinogenesis: viral. In: *Cancer. Principles & Practice of Oncology.* De Vita, Hellman & Rosenberg. J.B. Lippincott Company, USA. 1989. Vol I. Ch 10. pp 149-166.
9. Zur Hausen H. Viruses in human cancers. *Science.* 254:1167-1173, 1991.
10. Balmain A and Brown K. Oncogenes activation in chemical carcinogenesis. *Adv Cancer Res.* 51:147-182, 1988.
11. Meeting Report. American Cancer Society Workshop Conference on tumor promotion and antipromotion. *Cancer Res.* 47:5509-5513, 1987.

12. Liotta LA. Cancer cell invasion and metastasis. *Sci Am.* 266:343-41, 1992.
13. Lennox ES. What are tumor antigens. In: *Immunity and Cancer*. Reif AE & Mitchell MS. Eds. Academic Press, Florida, 1985. Section 1. pp 17-27.
14. Law LW. Characteristic of tumor specific antigens. *Cancer Surveys.* 4:1-19, 1985.
15. Hellström KE and Hellström I. Oncogene-associated tumor antigens as targets for immunotherapy. *Faseb J.* 3:1715-1722, 1991.
16. Ashman LK. The immunogenicity of tumour cells. *Immunol Cell Biol.* 65:271-277, 1987.
17. Old LJ. Cancer Immunology. *Sci Am.* 237:154-168, 1977.
18. Stutman O. Immunological surveillance revisited. In: *Immunity to Cancer*. Reif AE & Mitchell MS, Academic Press, Florida, 1985. Section 3. pp 323-345.
19. Herberman RB, Nunn ME, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngenic and allogenic tumors. I Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer.* 16:216-229, 1975.
20. Herberman RB, Nunn ME, Holden HT, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngenic and allogenic tumors. II Characterization of effector cells. *Int J Cancer.* 16:230-239, 1975.
21. Robertson MJ and Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood.* 76:2421-2438, 1990.
22. Monostori E, Desai D, Brown MH, Cantrell DA, Crumpton MJ. Activation of human T lymphocytes via the CD2 antigen results in tyrosine phosphorylation of T cell antigen receptor psi-chains. *J Immunol.* 144:1010-1014, 1990.
23. Hibbs JB, Lambert LH, Remington JS. Control of carcinogenesis: a possible role of activated macrophage. *Science.* 177:998-1000, 1972.
24. Russel SW. Macrophage effector and regulatory functions. In: *Immunity to Cancer*. Reif AE & Mitchell MS, Academic

Press, Florida, 1985. Section 2. pp 205-216.

25. Unanue ER and Cerottini JC. Antigen presentation. *Faseb J.* 3:2496- 2502, 1989.
26. Shevach EM. Macrophages and other accessory cells. In: *Fundamental Immunology.* Paul WE, Raven Press, USA, 1984. Ch 5. pp 71-107.
27. Zinkernagel RM and Doherty PC. Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Science.* 251:547-548, 1974.
28. Gerlier D and Rebourdin-Combe C. Antigen processing from cell biology to molecular interactions. *Immunol Today.* 10:3-5, 1989.
29. Ortiz Navarrete V, Seeling A, Gernold M, Frentzel S, Kloetzel PM, Hammerling GJ. Subunit of 20S' proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex. *Nature.* 353:662-664, 1991.
30. Perham P. Transporters of delight. *Nature.* 348:674-675, 1990.
31. Braciale TJ and Braciale VL. Antigen presentation: structural themes and functional variations. *Immunol Today.* 12:124-129, 1991.
32. Brodsky FM and Guagliardi L. The cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol.* 9:707-744, 1991.
33. Hämmerling CJ and Moreno J. The function of invariant chain in antigen presentation by MHC class II molecules. *Immunol Today.* 11:337-340, 1990.
34. Ashwell JD. Genetic and mutational analysis of the T cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol.* 8:139-167, 1990.
35. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 136:2348-2357, 1986.
36. Romagnani S. Human Th1 and Th2 subsets:doubt no more.

Immunol Today. 12:256-257, 1991.

37. Dustin ML and Springer TA. Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Annu Rev Immunol.* 9:27-66, 1991.
38. Bretscher P and Cohn M. A theory of self-nonself discrimination. *Science.* 169:1042-1049, 1970.
39. Holsti MA and Raulet DH. IL-6 and IL-1 synergize to stimulate IL-2 production and proliferation of peripheral T cells. *J Immunol.* 143:2514-2519, 1989.
40. Weaver CT, Duncan LM, Unanue ER. T cell induction of macrophage IL-1 during antigen presentation. Characterization of a lymphokine mediator and comparison of Th1 and Th2 subsets. *J Immunol.* 142:3469-3476, 1989.
41. Altman A, Coggeshal KM, Mustelin T. Molecular events mediating T cell activation. *Adv Immunol.* 48:227-360, 1990.
42. Augustine JA, Secrist JP, Danrels JK, Leibson PJ, Abraham RT. Activation of phospholipase C through a G protein in dependent coupling mechanism. *J Immunol.* 146:2889-2897, 1991.
43. Rudd CE. CD4, CD8 and the TCR complex: a novel class of protein-tyrosine kinase receptor. *Immunol Today.* 11:400-406, 1990.
44. Downward J, Graves J, Cantrell D. The regulation and function of p21ras in T cells. *Immunol Today.* 13:89-92, 1992.
45. Crabtree G. Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science.* 243:355-361, 1989.
46. Ullman KS, Northrop JP, Verweij CL, Crabtree GR. Transmission of signal from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: the missing link. *Annu Rev Immunol.* 8:421-452, 1990.
47. Mosmann TR and Moore KW. The role of IL-10 in crossregulation of Th1 and Th2 responses. *Immunoparasitol Today.* 12:A49-A53, 1991.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

48. Chen WF and Zlotnik A. IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J Immunol.* 147:528-534, 1991.
49. Podack ER, Hengartner H, Lichtenheld M. A central role of perforin in cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* 9:129-157, 1991.
50. Krähenbühl O and Tschopp J. Perforin-induced pore formation. *Immunol Today.* 12:399-402, 1991.
51. Berke G. Lymphocyte-triggered internal target desintegration. *Immunol Today.* 12:396-399, 1991.
52. Greenberg PD. Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells. *Adv Immunol.* 49:281-355, 1991.
53. Croft M and Swain SL. B cell response to fresh and effector T cell helper cells. Role of cognate T-B interaction and the cytokines IL-2, IL-4 and IL-6. *J Immunol.* 146:4055-4064, 1991.
54. Takacs B and Staehli C. Activated macrophages and antibodies against the plant lectin, GS1-B4, recognize the same tumor associated structure (TAS). *J Immunol.* 138:1999-2007, 1987.
55. Gordon C and Wofsy D. Effects of recombinant murine tumor necrosis factor- α on immune functions. *J Immunol.* 144:1753-1758, 1990.
56. Grimm EA, Mazunder A, Zhang HZ, Rosenberg SA. Lymphokine activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med.* 155:823-830, 1982.
57. Naume B and Espevik T. Effects of IL-7 and IL-2 on highly enriched CD56+ natural killer cells. *J Immunol.* 147:2208-2214, 1991.
58. Geller RL, Smyth MJ, Strobl SL, Bach FH, Ruscetti FW, Longo DL, Ochoa AC. Generation of lymphokine-activated killer activity in T cells. Possible regulatory circuits. *J Immunol.* 146:3280-3288, 1991.
59. Topalian SL, Solomon D, Rosenberg SA. Tumor-specific cytotoxicity by lymphocytes infiltrating human melanomas.

142:3714-3725, 1989.

60. Old LJ, Stockert E, Boyse EA, Kim JH. Antigenic modulation: loss of TL antigens from cells exposed to TL antibody. Study of the phenomenon in vitro. J Exp Med. 127:523-539, 1968.
61. Law SKA. Antigen shedding and metastasis of tumor cells. Clin Exp Immunol. 85:1-2, 1991.
62. Sylven B. Lysosomal enzyme activity in the interstitial fluid of solid mouse tumor trasplants. Eur J Cancer. 4:463-474, 1968.
63. Sobczak E and De Vaux Saint Cyr Ch. Study of the in vivo fixation of antibodies on tumors provoked in hamsters by injection of SV-40 transformed cells (TSV5 C12). Int J Cancer. 8:47-52, 1971.
64. Sjögren HO, Hellström I, Bansal SC, Hellström KE. Suggestive evidence that the "blocking antibodies" of tumor bearing individuals may be antigen-antibodies complexes. Proc Natl Acad Sci USA. 68:1372-1375, 1971.
65. Witz IP. Tumor bound immunoglobulins:in situ expression of humoral immunity. Adv Cancer Res. 25:95-148, 1977.
66. Terachi T, Stanescu G, Pontes JE, Medof ME, Caulfield MJ. Coexistence of autologous antibodies and decay-accelerating factor, an inhibitor of complement, on human renal tumor cells. Cancer Res. 51:2521-2523, 1991.
67. Becker JC, Dummer R, Hatmann AA, Burg G, Schmidt RE. Shedding of ICAM-1 from human melanoma cell lines induced by IFN- γ and tumor necrosis factor- α . Functional consequences on cell-mediated cytotoxicity. J Immunol. 147:4398-4401, 1991.
68. Kay NE, Burton J, Wagner O, Nelson DL. The malignant B cells from B-chronic lymphocytic leukemia patients release TAC-soluble interleukin-2 receptors. Blood. 72:447-450, 1988.
69. Gatanaga T, Hwang C, Kohr W, Capuccini F, Lucci JA, Jeffes EWB, Lentz R, Tomich J, Yamamoto RS, Granger GA. Purification and characterization of an inhibitor (soluble tumor necrosis factor receptor and limphotoxin obtained

- from the serum ultrafiltrates of human cancer patients. Proc Natl Acad Sci USA. 87:8781-8784, 1990.
70. Jenkins MK. The role of cell division in the induction of clonal anergy. Immunol Today. 13:69-73, 1992.
 71. Tada T, Sano H, Sato S, Shima J, Fujiwara H, Hamaoka T. Immune dysfunction expressed selectively on L3T4+ T cells in the tumor bearing state. J leuk Biol. 47:149-157, 1990.
 72. Siegel JP. Interleukin-2 production in cancer patients. Cancer Bull. 39:24-29, 1987.
 73. Kamo I and Friedman H. Immunosuppression and the role of suppressive factors in cancer. Adv Cancer Res. 25:271-321, 1977.
 74. Roth JA. Tumor induced immunosuppression. Surg Gyn Obst. 156:233-240, 1983.
 75. Gershon RK and Kondo K. Infectious immunological tolerance. Immunology. 21:903-914, 1971.
 76. Moller G. Do suppressor T cells exist? Scand J Immunol. 27:247-250, 1988.
 77. Owen K, Gomolka D, Droller MJ. Production of prostaglandin E2 by tumor cells in vitro. Cancer Res. 40:3167-3171, 1980.
 78. Leung KH, Fisher DG, Koren HS. Erythromyeloid tumor cells (K-562) induces PGE synthesis in human peripheral blood monocytes. J Immunol. 131:445-449, 1983.
 79. Betz M and Fox BS. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. J Immunol. 146:108-113, 1991.
 80. Nishioka Y, Sone S, Orino E, Nii A, Ogura T. Down-regulation by interleukin 4 of activation of human alveolar macrophages to tumoricidal state. Cancer Res. 51:5526-5531, 1991.
 81. Laughter AH and Twomey JJ. Suppression of lymphoproliferation by high concentrations of normal human mononuclear cells. J Immunol. 119:173-179, 1977.

82. Fu YX, Watson GA, Kasahara M, Lopez DM. The role of tumor-derived cytokines on the immune system of mice bearing a mammary Adenocarcinoma. I. Induction of regulatory macrophages in normal mice by the in vivo administration of rGM-CSF. *J Immunol.* 146:783-789, 1991.
83. Roberts AB, Frolik CA, Anzano MA, Sporn MB. Transforming growth factors from neoplastic and nonneoplastic tissues. *Fed Proc.* 42:2621-2626, 1983.
84. Wakefield LM, Thompson NL, Flanders KC, O'connor-McCourt MD, Sporn MB. Transforming Growth Factor- β : multifunctional regulator of cell growth and phenotype. *Ann NY Acad Sci.* 551:290-298, 1990.
85. Huber D, Philipp J, Fontana A. Protease inhibitors interfere with the transforming growth factor- β -dependent but not the transforming growth factor- β -independent pathway of tumor cell-mediated immunosuppression. *J Immunol.* 148:277-284, 1992.
86. Cornelius JG and Normann SJ. Isolation of a low molecular weight inhibitor of lymphocyte proliferation from tumor ascites. *J Immunol.* 141:2175-2180, 1988.
87. Hersh EM and Drewinko B. Specific inhibition of lymphocyte blastogenic response to mitogens by a factor produced by cultured human malignant lymphoma cells. *Cancer Res.* 34:215-220, 1974.
88. DeLustro F and Argyris B. Mechanism of mastocytoma mediated suppression of lymphocyte reactivity. *J Immunol.* 117:2073-2080, 1976.
89. Medoff JR, Clack VD, Roche JK. Characterization of an immunosuppressive factor from malignant ascites that resembles a factor induced in vitro by a carcinoembryonic antigen. *J Immunol.* 137:2057-2064, 1986.
90. Roth JA, Grimm EA, Gupta RK, Ames RS. Immunoregulatory factors derived from human tumors. I. Immunologic and biochemical characterization of factors that suppress lymphocyte proliferative and cytotoxic responses in vitro. *J Immunol.* 128:1955-1962, 1982.
91. Grayson G and Ladish S. Immunosuppression by human gangliosides. II. Carbohydrate structure and inhibition of

- human NK activity. *Cell Immunol.* 139:18-29, 1992.
92. Hersey P, Bindon C, Czernieck M Spurling A, Wass J, McCarthy WH. Inhibition of interleukin 2 production by factors released from tumor cells. *J Immunol.* 131:2837-2842, 1983.
 93. Gregorian SK and Battisto JR. Immunosuppression in murine renal carcinoma. I. Characterization of extent, severity and sources. *Cancer Immunol Immunother.* 31:325-334, 1990.
 94. Maas RA, Dullens HF, Otter WD. T cells and tumors. *Immunol Today* (letter). 13:78-79, 1992.
 95. Fontana A, Hengartner H, DeTribolet N, Weber E. Glioblastoma cells release interleukin 1 and factors inhibiting interleukin 2-mediated effects. *J Immunol.* 132:1837-1844, 1984.
 96. Roszman T, Elliot L, Brooks W. Modulation of T cell function by gliomas. *Immunol Today.* 12:370-374, 1991.
 97. Krant JK, Manskopf E, Bandrup C, Madoff MA. Immunologic alterations in bronchogenic cancer. *Cancer.* 21:623-631 1968.
 98. Izumi T, Nagai S, Suginosita T. Serum immunosuppression test as a new tool for immunodiagnosis of lung cancer. *Cancer Res.* 40:444-447, 1980.
 99. Vose BM and Moore M. Suppressor cell activity of lymphocyte infiltrating human lung and breast tumours. *Int J Cancer.* 24:579-585, 1979.
 100. Saucedo LE. TESIS. Análisis funcional y fenotípico de los linfocitos que infiltran los tumores sólidos. *Fac Química, UNAM.* 1989.
 101. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab Invest (Suppl).* 21:77-89, 1968.
 102. Madsen M and Johnsen HE. A methodological study of rosette formation using AET-treated sheep red blood cells. *J Immunol Meth.* 27:61-74, 1979.
 103. López-González S, Ponce I, Hernández JA, Cervera I, López A. Manuscrito en preparación.

104. Humphrey H and White RG. Immunology for Students of Medicine. 3a. ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970:1-34.
105. De Felice M, Bond HM, Pizzano R, Turco MC, Valerio E, Lamberti A, Giarruso PC, Venuta S. Identification and Characterization of a T cell growth inhibitory factor produced by K-562 erythromyeloid cells. Cell Immunol. 138:55-63, 1991.
106. Miescher S, Whiteside TL, Carrel S, Fliedner UV. Functional properties of tumor-infiltrating and blood lymphocytes in patients with solid tumor: effects of tumor cells and their supernatants on proliferative response to lymphocytes. J Immunol. 136:1899-1907, 1986.
107. Renk CM, Gupta RK, Morton DL. Inhibition of normal allogenic lymphocyte mitogenesis by a factor released from human tumor cells in culture. Cancer Immunol Immunother. 11:7-16, 1981.
108. Beck LK, Kane MA, Bunn PA. Innovative and future approaches to small cell lung cancer treatment. Sem Oncol. 15:300-314, 1988.
109. Fariñas MC, Rodríguez-VV, Zarrabeitia MT, Parras BJ, Sanz OJ. Contribution of monocytes to the decreased lymphoproliferative response to phytohemagglutinin in patients with lung cancer. Cancer. 68:1279-1284, 1991.