

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



**ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES DE LINFOCITOS T
DE SANGRE PERIFÉRICA Y DE MUCOSA EN
PACIENTES CON ADENOCARCINOMA GÁSTRICO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Mercedes López Santalla

Bajo la dirección del doctor:
José Manuel Martín Villa

Madrid, 2006

- **ISBN: 978-84-669-2947-9**

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES DE LINFOCITOS T DE
SANGRE PERIFÉRICA Y DE MUCOSA EN PACIENTES CON
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

AUTOR: MERCEDES LÓPEZ SANTALLA

DIRECTOR: Dr. JOSÉ MANUEL MARTÍN VILLA

LUGAR DE
REALIZACIÓN: ÁREA DE INMUNOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Fdo. Autor

Mercedes López Santalla

VºBº Director de tesis

José Manuel Martín Villa

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
MADRID 2006

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES DE LINFOCITOS T DE
SANGRE PERIFÉRICA Y DE MUCOSA EN PACIENTES CON
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

TESIS DOCTORAL

MERCEDES LÓPEZ SANTALLA

MADRID 2006

RESUMEN

Recientes investigaciones llevadas a cabo en pacientes con cáncer y en modelos animales intentan dilucidar la delicada red de conexión establecida entre las células del sistema inmune y las células tumorales. El término "vigilancia inmunológica" describe la capacidad del sistema inmune para detectar las células tumorales y destruirlas. El papel del sistema inmune en el control del crecimiento del tumor ha sido el objetivo activo de la investigación de las últimas décadas. Los linfocitos T parecen ser elementos centrales en la respuesta frente a las células tumorales y, de hecho, se han encontrado células T específicas de tumor en la circulación de pacientes con cáncer o infiltrando el tejido tumoral. Estos linfocitos T activos habrían sido estimulados por antígenos neoplásicos de la superficie de células tumorales y así podrían eliminarlas. Sin embargo, no está claro por qué los linfocitos T fallan al ejercer este control, y el tumor progresa y se disemina.

Este fallo del sistema inmune se ha explicado, entre otras causas, por la secreción de un factor secretado por el tumor capaz de afectar a la funcionalidad de los linfocitos T dando lugar a un estado inmunodeficiente que no sería capaz de controlar la diseminación del tumor. Se han descrito varias disfunciones de las células T en pacientes con cáncer, incluyendo pobres respuestas proliferativas, alteraciones de algunas subpoblaciones celulares, producción de citoquinas disminuida y, finalmente, ausencia de moléculas de la superficie celular asociadas al TCR, como CD3 ζ .

El objetivo de este trabajo es doble. Por una parte, realizar una caracterización fenotípica y funcional de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes, clasificados según su situación clínica, y por otra, analizar el papel del linfocito T, utilizando un modelo de transformación con el virus linfotrópico *Herpesvirus saimiri*, obteniendo así líneas estables, que se crecen en laboratorio. Los resultados revelan que la presencia de CD45 y la respuesta a CD3 pueden usarse como marcadores para identificar pacientes con una peor situación clínica. Además, el análisis de las líneas mostró la existencia de un defecto en la expresión de la cadena CD3 ζ en las líneas de pacientes pero no de sanos, cultivadas en ausencia de IL-2. El hecho de encontrar el defecto en las líneas sugiere que es inherente a las células de los pacientes y no debido a factores tumorales ausentes en el medio de cultivo.

SUMMARY

Recent research carried out in cancer patients or animal models tries to delineate the delicate network established between cells of the immune system and tumour cells. The term "immune surveillance" describes the ability of the immune system to detect tumour cells and destroy them. The role of the immune system in the control of tumour growth has been the aim of active research in the last decades. T lymphocytes seem to be central elements in the response against cancerous cells and, in fact, tumour-specific T cells are found in the circulation of patients with cancer or infiltrating the tumoral tissue. These active T lymphocytes have been stimulated by neoplastic antigens on the surface of tumoral cells and their role would be to eliminate them. However, it is not clear why T cells fail to exert this control and tumours progress and disseminate.

This failure of the immune system has been explained, among other factors, by the secretion of tumour-derived substances able to affect the functionality of T lymphocytes and render the immune system to an immunodeficient state which would allow uncontrolled dissemination of the tumour. Several dysfunctions of T cells have been described in cancer patients, including poor proliferative responses, alterations of the leukocyte subpopulations, diminished cytokine production and, finally, absence of TCR-associated cell surface molecules, such as CD3 ζ .

The aim of this research is two fold. On one hand, we investigated the role of the T lymphocyte in the gastric adenocarcinoma. We used as a model *Herpesvirus saimiri*-transformed T-cell lines from gastric cancer patients and healthy volunteers. On one hand, we were further prompted to investigate the immune profile of a group of Spanish patients with gastric adenocarcinoma further subdivided according to their clinical status, to study whether immunological measurements could be used as additional criteria for classification of patients. On the other hand, we used *Herpesvirus saimiri*-transformed T-cell lines for functional analysis and different TCR signalling proteins expression. The results obtained revealed that CD45 marker and proliferative response to CD3 identify the subset of patients in worse clinical condition. Analysis of T cell lines disclosed a defective expression of the CD3 ζ chain on T-cell lines from patients, but not from controls, when cultured in the absence of IL-2. The fact that the defect is found in the lines, suggests that it is inherent to the cells of patients rather than due to tumour-derived factors, absent in the culture media.

INDICE

INDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1-38
1. CÁNCER	2
1.1. Cáncer gástrico.....	3
1.1.1. Epidemiología	
1.1.1.1. Factores de riesgo	
1.1.1.2. Helicobacter pylori	
1.1.1.2.1. Patogénesis	
1.1.2. Anatomía patológica	
1.1.3. Vías de diseminación	
1.1.4. Presentación clínica	
1.1.5. Diagnóstico	
1.1.6. Clasificación	
1.1.7. Factores pronósticos	
1.1.8. Tratamiento	
1.1.8.1. Inmunoterapia	
2. MECANISMOS DE DEFENSA ANTITUMORALES.....	14
2.1. Mecanismos no inmunes. Escape.....	14
2.2. Mecanismos inmunes.....	16
2.2.1. Concepto de supervivencia inmunológica	
2.2.2. Etapas de actuación del sistema inmune	
2.2.3. Mecanismos de escape	
2.2.3.1. Pérdida o disminución de las moléculas de histocompatibilidad de clase I	
2.2.3.2. Disminución, mutación o pérdida de los antígenos tumorales	
2.2.3.3. Alteración en los receptores de señalización de muerte celular	
2.2.3.4. Producción de citoquinas inmunosupresoras	
2.2.3.5. Células T supresoras	
2.2.3.6. Indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO)	
2.2.3.7. Pérdida de señales coestimuladoras	
2.2.3.8. Cambios en las células presentadoras de antígenos	
2.2.3.9. Disfunción de células T efectoras	

3. LINFOCITOS T.....	24
3.1. Clasificación de linfocitos T.....	24
3.1.1. Linfocitos intraepiteliales	
3.1.1.1 Sistema inmunológico de mucosas	
3.2. El receptor para antígeno del linfocito T: complejo TCR/CD3.....	26
3.2.1. CD3 ζ	
3.3.3. Activación del linfocito T	
3.3.4. Rafts lipídicos	
3.3.5. Moléculas coestimuladoras y rafts lipídicos	
3.3.6. La interleuquina 2 y su receptor	
4. HERPESVIRUS SAIMIRI.....	36
4.1. Características fenotípicas y funcionales de líneas celulares T-HVS.....	37
4.2. El modelo HVS aplicado al estudio del cáncer gástrico.....	38
II. OBJETIVOS.....	39-40
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41-60
1. CÉLULAS: ORIGEN Y CULTIVO.....	42
1.1. Obtención de células.....	46
1.1.1. Células mononucleares de sangre periférica	
1.1.2 Linfocitos T de sangre periférica	
1.1.3. Linfocitos intraepiteliales	
1.2. Obtención y cultivo de líneas celulares T-HVS.....	47
2. EVALUACIÓN FENOTÍPICA.....	48
2.1. Evaluación de la superficie por citometría de flujo.....	48
2.2. Evaluación intracelular por citometría de flujo.....	51
2.3. Evaluación intra y extracelular por microscopía confocal o inmunofluorescencia indirecta.....	51
3. ESTUDIO DE EXPRESIÓN PROTEICA.....	52
3.1. Aislamiento de balsas lipídicas.....	52
3.2. Precipitación de proteínas.....	52
3.3. Cuantificación de proteínas.....	52

3.4. Preparación de muestras para su carga en el gel.....	52
3.5. Estudio de expresión proteica por western-blot.....	53
3.6. Inmunoprecipitación.....	53
4. FUNCIÓN CELULAR.....	54
4.1. Proliferación celular.....	54
4.2. Movilización de calcio intracelular.....	55
4.3. Apoptosis y necrosis celular.....	56
4.4. Medición de niveles de interleuquina 2.....	56
4.5. Efecto de la interleuquina 2 en la expresión de la cadena CD3 ζ	57
5. SECUENCIACIÓN GÉNICA DEL PROMOTOR DE LA CADENA CD3 ζ	58
5.1. Extracción del DNA genómico.....	58
5.2. Amplificación del DNA.....	58
5.3. Purificación del DNA.....	59
5.4. Secuenciación.....	60
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	60
7. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	60
IV. RESULTADOS.....	61-95
1. Estudio comparativo de los parámetros clínicos y del perfil inmunológico de pacientes con adenocarcinoma gástrico.....	62
1.1. Análisis fenotípico.....	62
1.2. Análisis funcional.....	65
2. Estudios de linfocitos T de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma gástrico.....	68
2.1. Expresión de CD3 ζ	68
2.2. Realización de estudios de apoptosis y necrosis celular.....	69
3. Obtención y cultivo de líneas procedentes de linfocitos T de sangre periférica y de mucosa gástrica de pacientes con adenocarcinoma gástrico y de individuos control tras inmortalización con <i>Herpesvirus saimiri</i>	71
4. Análisis de la expresión y patrón de la expresión de la cadena CD3 ζ y CD3 ϵ	72
4.1. Líneas HVS de linfocitos T de mucosa.....	72
4.1.1. Citometría de flujo	
4.1.2. Western-Blot	

4.1.3. Microscopía confocal	
4.2. Líneas HVS de linfocitos T de sangre periférica.....	76
4.2.1. Citometría de flujo	
4.2.2. Western-Blot	
5. Realización de estudios de movilización de calcio tras estimulación con mitógenos	79
5.1. Líneas celulares HVS procedentes de linfocitos T de mucosa.....	79
5.2. Líneas celulares HVS procedentes de linfocitos T de sangre periférica.....	82
6. Realización de estudios de apoptosis.....	84
6.1. Líneas celulares HVS procedentes de linfocitos T de mucosa.....	84
6.2. Líneas celulares HVS procedentes de linfocitos T de sangre periférica.....	86
7. Estudio de la producción de interleuquina 2 por las líneas de linfocitos T de mucosa de pacientes y de controles.....	87
8. Análisis de la secuencia del promotor del gen de la cadena CD3 ζ de pacientes con adenocarcinoma gástrico.....	87
9. Estudio de la expresión de Fc ϵ R1 γ y Syk de líneas de linfocitos T procedentes de sangre periférica y de mucosa de pacientes con adenocarcinoma gástrico y de individuos controles.....	88
10. Estudio de la expresión de Lck y ZAP70 en líneas HVS procedentes de sangre periférica y de mucosa de pacientes con adenocarcinoma gástrico y de individuos controles.....	90
11. Estudio de la expresión de Elf en líneas HVS procedentes de sangre periférica y de mucosa de pacientes con adenocarcinoma gástrico y de individuos controles.....	92
12. Estudio de la relación de la expresión de la cadena CD3 ζ y la interleuquina 2.....	93
12.1. Por western-blot.....	93
12.2. Por citometría de flujo.....	95
V. DISCUSIÓN.....	96-113
1. Estudio de los parámetros clínicos y su asociación con el perfil inmunológico (fenotípico y funcional) en pacientes con adenocarcinoma gástrico.....	97
1.1. Análisis fenotípico.....	98
1.2. Análisis de la respuesta proliferativa.....	100
2. Utilización de las líneas HVS como modelo de estudio.....	101
2.1. Defectos en la expresión de CD3 ζ	103
2.1.1. Efecto de la IL-2 en la expresión de la cadena CD3 ζ	

2.1.2. Incremento de la expresión de la arginasa I	
2.1.3. Infiltración de los macrófagos asociados al tumor	
2.1.4. Aumento de la tasa de apoptosis celular	
2.1.5 Elementos reguladores de la expresión de la cadena CD3 ζ	
2.1.6. Modificaciones epigenéticas	
2.1.7. Posible sustitución de la cadena CD3 ζ por otras cadenas	
2.2. Defecto en la proliferación celular.....	108
3. Hipótesis de tumoración gástrica según resultados obtenidos.....	109
3.1. Consecuencias de la infección por <i>Helicobacter pylori</i>	110
3.2. Respuesta del sistema inmune contra el tumor formado.....	111
VI. CONCLUSIONES.....	114-116
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	117-128
VIII. ABREVIATURAS.....	129-132
IX. PUBLICACIONES.....	133-134

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER

Las células de los organismos se diferencian y proliferan siguiendo un programa genético que está regulado por estímulos extracelulares. Alteraciones en este sistema de regulación constituyen la base genética del cáncer, que se entiende como una acumulación de mutaciones que afecta a las células somáticas durante la vida de un organismo y hacen que éstas proliferen de forma incontrolada. Son necesarios varios pasos para transformar una célula normal en una célula cancerosa. La mayoría de ellos, si no todos, incluyen mutaciones genéticas. Existen al menos 200 tipos distintos de cánceres, los cuales se pueden desarrollar en prácticamente cualquier órgano.

La carcinogénesis es un proceso con múltiples estadios. A cada paso de este proceso hay un mecanismo natural que protege del desarrollo del cáncer. La mayoría de los cánceres humanos están inducidos por factores carcinogénicos presentes en el entorno.

El proceso de carcinogénesis, tradicionalmente, ha sido dividido en iniciación, promoción y progresión (Jakobisiak *et al.*, 2003) (Figura I.1).

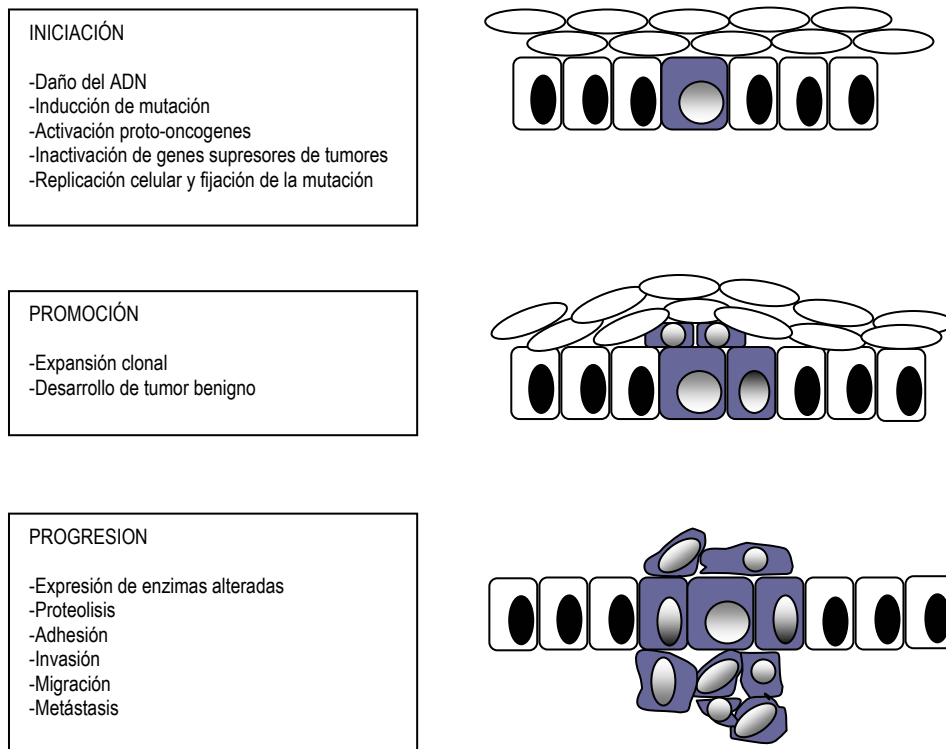
La iniciación empieza con un daño en el ADN de una población de células expuesta a carcinógenos químicos, físicos o microbianos (principalmente virus). Si no se repara el daño del ADN se podrían producir mutaciones genéticas. La mayoría de estas alteraciones del ADN son irrelevantes para la vida de la célula y no habría riesgo de cáncer.

La promoción se podría definir como el proceso de expansión clonal de una célula inicial que resulta en la formación de células pre-neoplásicas produciendo nódulos, pólipos o papilomas.

La progresión está caracterizada por la transformación de las células pre-neoplásicas en tumor maligno con capacidad de invasión a los tejidos de alrededor y la formación de metástasis.

Durante este proceso de multiestadaje, células seleccionadas podrían sufrir cambios genéticos o epigenéticos para pasar de un estado al siguiente y que, en último caso, llegarían a la formación del tumor maligno. En cada paso del proceso existen mecanismos de defensa naturales contra el cáncer que, a su vez, se pueden dividir en no inmunes e inmunes, y dentro de estos últimos en innatos y adaptativos.

FIGURA I.1. PROCESOS DE CARCINOGENÉISIS
(Jakobisiak, M. et al., 2003)



1.1. Cáncer gástrico

La organización mundial de la salud señala que el cáncer gástrico es uno de los neoplasmas más frecuentes en el mundo contemporáneo; constituye la segunda causa de muerte por tumor en el hombre y la tercera en la mujer. Es uno de los cánceres más frecuentes en Europa con una alta incidencia en Europa del Este. Son numerosos los factores de riesgo que se asocian con la aparición del cáncer gástrico. El descubrimiento de *Helicobacter pylori* y su asociación con las enfermedades gastroduodenales ha revolucionado los aspectos clínicos, fisiopatológicos y terapéuticos hasta el punto de considerar la bacteria como agente precursor del cáncer gástrico (Parkin *et al.*, 2001; Ferlay *et al.*; 2001).

1.1.1. Epidemiología

La característica epidemiológica principal en el cáncer gástrico es la disminución en la mortalidad que se ha producido en los últimos años, secundario a un descenso de la incidencia, ya que la supervivencia a 5 años no ha cambiado considerablemente en las últimas décadas. Existe una marcada variabilidad geográfica siendo Japón, China, Europa del Este y algunas regiones de América y Sudamérica como México, Chile, Colombia y Venezuela los países de mayor incidencia (Parkin, 1997). España ocupa una posición intermedia, aunque acercándose a las cifras de los países de alto riesgo. Estas diferencias geográficas no sólo se atribuyen a razones relacionadas con la calidad del diagnóstico y la terapéutica aplicada en cada país, sino que están influenciadas por una serie de factores de riesgo que difieren en las diversas poblaciones del planeta. Se observa que en los emigrantes procedentes de países con alta incidencia, la enfermedad se comporta como en las personas de los países receptores.

Dentro del cáncer gástrico, se distinguen dos subtipos histológicos, el tipo difuso y el tipo intestinal; es éste último el causante de la variabilidad geográfica, mientras que el tipo difuso se mantiene invariable. Afecta con mayor frecuencia a los varones con una proporción 2:1, con una edad de aparición máxima entre los 60-80 años. Cuando la aparición es por debajo de los 40 años, suele tratarse de tumores muy agresivos. En orden de frecuencia ocupa la cuarta posición en los varones, tras el cáncer de pulmón, próstata y colorrectal; en la mujer es el tumor de mayor incidencia tras el de mama y el colorrectal.

1.1.1.1. Factores de riesgo

Se han descrito diversos factores de riesgo del cáncer gástrico, los cuales desempeñan un papel primordial en su génesis.

Genéticos

- Familias de pacientes con cáncer gástrico: incidencia 2-3 veces mayor
- Grupo sanguíneo A

Ambientales

-Alimentación (variable en cada país): pescados secos y salados, alimentos muy condimentados, carnes rojas...

- Ingestión de alcohol, de bebidas calientes, de nitrato de sodio. Tabaco masticado
- Radiaciones

Premalignos

- Gastritis atrófica, metaplasma intestinal y displasia

- Anemia perniciosa
- Enfermedad de Menetrier
- Gastrectomía
- Pólipos gástricos

Infecciosos

- Sobrecrecimiento bacteriano
- Helicobacter pylori* CaG+

Otros

- Tratamiento a largo plazo de la úlcera péptica

1.1.1.2. *Helicobacter pylori*

Uno de los factores de riesgo de mayor interés actualmente es el infeccioso. El descubrimiento y caracterización de *H.pylori* en 1983 en Australia (Warren, 1983) cambió radicalmente la terapéutica de la enfermedad. En 1994, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, *International Agency for Research on Cancer*) clasificó a *H.pylori* como un carcinógeno para humanos (International Agency for Research on Cancer, 1994).

1.1.1.2.1. Patogénesis (Baldari *et al.*, 2005) (Figura 1.2)

H.pylori es transmitido de persona a persona vía oral-fecal. La primera barrera que se encuentra es el bajo pH del estómago. La bacteria sintetiza una ureasa que cataliza la urea y produce CO₂ y NH₃, lo cual produce un microambiente a su alrededor que le permite moverse a través de la mucosa del epitelio gástrico y tapizar este epitelio con ayuda de las adhesinas que interaccionan con las células del huésped. Además, el amoníaco causa daño en la mucosa porque altera el funcionamiento mitocondrial, la respiración celular y el metabolismo energético. Por otro lado, modifica la secreción gástrica al estimular la secreción de gastrina e incrementar la producción de ácido clorhídrico que altera la barrera de mucosa gástrica.

El crecimiento de la bacteria se ve limitado en el lumen del estómago debido a la falta de nutrientes necesarios. Para ello la bacteria secreta una proteína denominada Cag (*cytotoxin associated gene*) que permeabiliza la membrana consiguiendo así los nutrientes necesarios. La bacteria es capaz de activar la expresión de un potente factor quimiotáctico de neutrófilos, la interleuquina-8 (IL-8), por parte de las células

epiteliales gástricas. Por otro lado la bacteria secreta NAP (*neutrophil-activating protein*) que interacciona directamente con neutrófilos, monocitos y mastocitos, dando lugar a la activación de sus funciones inflamatorias.

Entre los factores envueltos en la progresión de la enfermedad está la citotoxina VacA (*vacuolization cytotoxin*), la cual causa degradación vacuolar masiva de las células epiteliales dando lugar a una erosión epitelial. VacA forma canales en la membrana de las células diana para conseguir aporte de nutrientes como bicarbonato, piruvato y urea.

VacA y p58 activan la Rac GTPasa y promueven la reorganización del citoesqueleto de actina de forma aberrante lo que interfiere en el reordenamiento de F-actina en la sinapsis inmunológica.

VacA también inhibe la proliferación de PBL inducida por coestimulación con CD28 por interferencia en la progresión del ciclo celular dependiente de IL-2.

La inflamación del epitelio gástrico inducida por *H.pylori* está asociada a respuesta Th1 (D'Elios *et al.*, 1997). Los linfocitos T específicos de *H.pylori* expresan IFN- γ pero no IL-4 ni IL-5. El tipo de respuesta Th1 se cree que contribuye a la inflamación gástrica inducida por *H.pylori*.

La rápida maduración y activación de células dendríticas derivadas de monocitos por *H.pylori* se acompaña de altos niveles de IL-12 y bajos niveles de IL-10, lo cual favorece la respuesta Th1. Estas células dendríticas activan células T autólogas vírgenes o *naive* y la expresión de IL-2, TNF- α e IFN- γ pero no IL-4.

Una vez tapizado el epitelio gástrico, *H.pylori* debe evitar la respuesta inmune innata llevada a cabo principalmente por fagocitos y los productos derivados de ellos (intermedios de oxígeno y nitrógeno). Para disminuir el efecto negativo de estas especies produce enzimas como la catalasa, la superóxido dismutasa y la NADPH reductasa.

H.pylori también activa la óxido nítrico sintasa de la mucosa gástrica y de los macrófagos que se asocia a daño en las células epiteliales y apoptosis. El óxido nítrico (NO) es un importante componente de la respuesta innata y un potente agente antimicrobiano. La producción de NO es nociva para la bacteria, por ello *H.pylori* produce arginasa que convierte la L-arginina en urea y L-ornitina disminuyendo así la cantidad de L-arginina que necesita la óxido nítrico sintasa para producir NO. Además, la urea es utilizada por la ureasa de la bacteria para producir NH₃.

Las cepas de *H.pylori* Cag+, VacA+ son más virulentas y no son eliminadas vía fagocitosis ya que se acumulan en fagosomas y producen la apoptosis de los macrófagos. Además, VacA interfiere en el procesamiento antigénico por las células B y subsiguiente presentación a células T.

H. pylori causa reducción en la expresión de la subunidad CD3 ζ de linfocitos T (Zabaleta *et al.*, 2004). Por otro lado, los macrófagos que producen arginasa también median efectos inmunosupresivos entre ellos la disminución de esta subunidad.

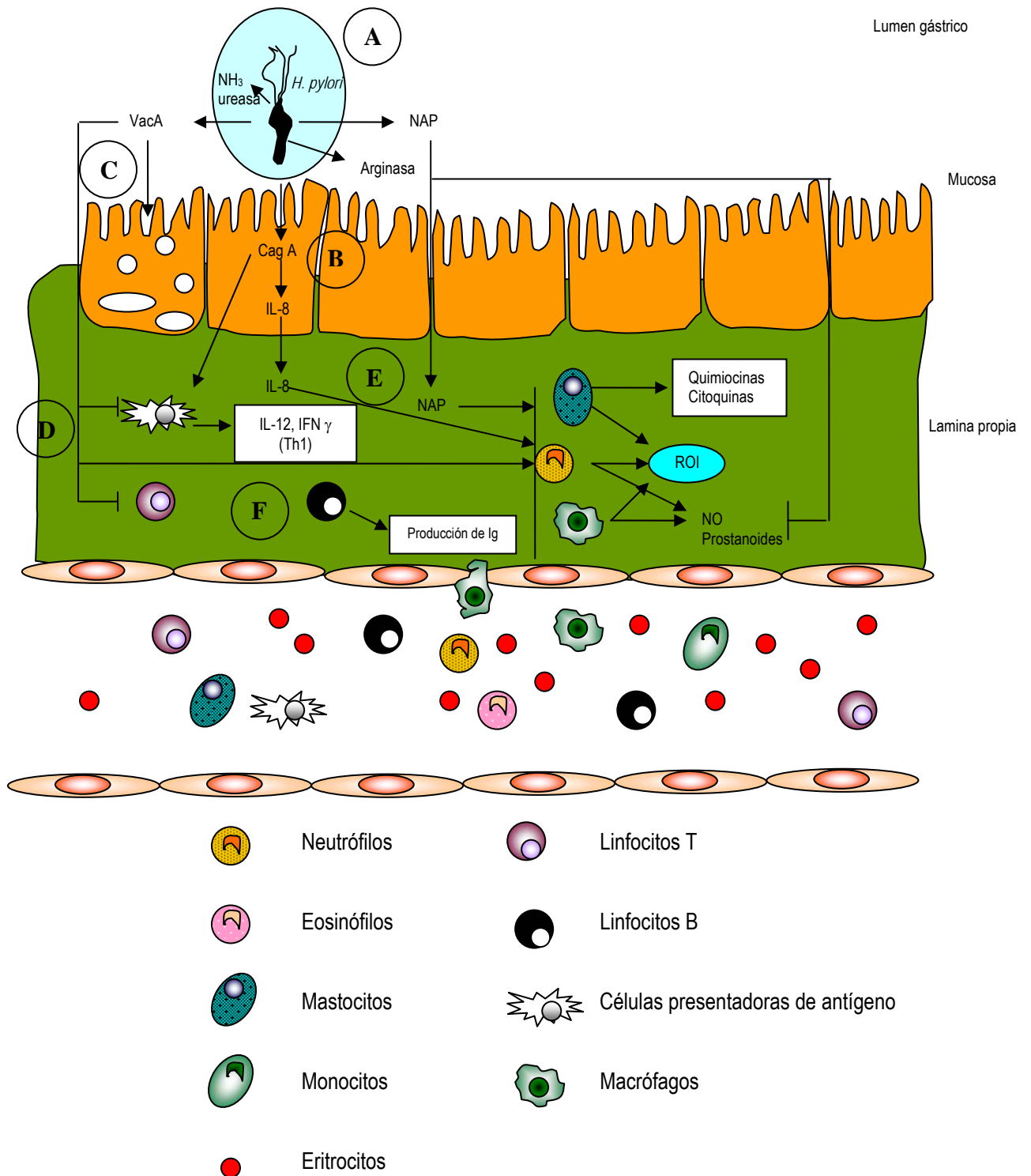
Sobrenadantes de cultivos con *H. pylori* inhiben la producción de IL-2 dependiente de mitógeno y la proliferación de linfocitos de sangre periférica, se cree que por la inhibición del factor de transcripción NFAT por VacA que bloquea el incremento masivo de calcio en el citoplasma.

Todos estos procesos dan lugar a un respuesta inflamatoria en la mucosa gástrica (Ernst, 1999). Esta reacción puede persistir durante mucho tiempo de vida produciendo finalmente como resultado una carcinogénesis mediada por:

- 1) Apoptosis de las células epiteliales
- 2) Incremento en la proliferación celular epitelial
- 3) Incremento en la producción de amonio dando lugar a la atrofia de la mucosa gástrica
- 4) Incremento en el riesgo de mutaciones genéticas por incremento oxidativo del daño en el ADN, por incremento en la proliferación celular, incremento en la liberación de radicales libres, cambios en la expresión de genes, inestabilidad genómica, mutaciones, hipermetilaciones...
- 5) Incremento en la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible de neutrófilos y células mononucleares del tejido gástrico
- 6) Producción de anticuerpos antigástricos que son autoanticuerpos contra la membrana epitelial del lumen o de estructuras de las células parietales

La inflamación (gastritis crónica) puede derivar a atrofia de la mucosa, metaplasia intestinal, displasia glandular y carcinoma. Esta secuencia de eventos es conocida como "cascada de Correa" (Correa, 1988).

Figura I.2. Infección por *Helicobacter pylori* y el sistema inmune



a) Colonización del epitelio gástrico usando ureasa; b) Secreción CagA e inducción de IL-8 por células epiteliales; c) Vacuolización inducida por VacA; d) apoptosis celular; e) Establecimiento de un gradiente quimiotáctico con IL-8 y NAP que induce extravasación y migración de mastocitos y fagocitos a la lamina propia, esto induce secreción de especies reactivas de oxígeno que producen daño gástrico; f) APCs y linfocitos T son atraídas a la lamina propia donde *H.pylori* inhibe la respuesta inmune adaptativa por bloqueo de la presentación antigénica y la activación de células T (Baldari *et al.*, 2005)

1.1.2. Anatomía patológica

Aproximadamente el 90% de los tumores gástricos son adenocarcinomas. Cuando se habla de cáncer gástrico se refiere, casi siempre, al adenocarcinoma. Se trata de un tumor originado a partir de células secretoras de moco. En un 50% de los casos se localiza en el área antro-pilórica, en un 20% en la curvatura menor, en 5% en la mayor, en un 5% en fundus, en un 10% en el cardias y el otro 10% se trata de variantes difusas tipo linitis plástica.

Los adenocarcinomas se pueden dividir histológicamente en dos categorías:

- 1) Un tipo intestinal o bien diferenciado con células neoplásicas cohesivas formando estructuras parecidas a glándulas que frecuentemente se ulceran
- 2) Un tipo difuso en el cual la cohesión entre células está ausente, resultando en una infiltración o engrosamiento de la pared del estómago sin una formación discreta de la masa.

1.1.3. Vías de diseminación

El cáncer gástrico puede extenderse por 5 vías diferentes:

- a) Por extensión intramural
- b) Por contigüidad tras atravesar la pared gástrica hacia los órganos adyacentes como el páncreas, bazo, colón o hígado.
- c) Por vía linfática a ganglios regionales, paraórticos, supradiafragmáticos o pelvianos. Según la localización del tumor primitivo los ganglios diana son diferentes. En tumores de tercio medio o de múltiple localización, los ganglios de riesgo son los perigástricos cardiales, los de la curvatura menor y los de la mayor, los del hilio esplénico, arteria esplénica, cadena retropancreática superior y los del ligamento hepatoduodenal. Los tumores de tercio superior y unión gastroesofágica diseminan en los ganglios paraesofágicos. En tumores del tercio inferior los ganglios subpilóricos están afectados hasta en un 50%.
- d) Por vía hematógena, fundamentalmente a hígado y pulmón. Aproximadamente un 30% de pacientes tienen afectación hepática al diagnóstico.
- e) Por vía intraperitoneal, por ejemplo al ovario.

1.1.4. Presentación clínica

Los síntomas son inespecíficos, lo que provoca un retraso en el diagnóstico y que éste sea en estadios avanzados de la enfermedad.

Los síntomas preclínicos más frecuentes son: pérdida de peso, anorexia, astenia, dolor epigástrico, que en ocasiones se acompaña de náuseas y vómitos y sensación de plenitud abdominal. Los tumores de localización

cardial provocan disfagia y, en ocasiones, la hemorragia digestiva alta es la primera manifestación. La primera manifestación puede evidenciar la presencia de metástasis a distancia.

1.1.5. Diagnóstico

Ante la sospecha de cáncer gástrico se realizan las siguientes pruebas:

Las determinaciones de laboratorio suelen ser normales en estadios precoces. En estadios avanzados suele aparecer en el 50 % de los casos anemia normocítica por pérdida aguda de sangre o anemia microcítica sideropénica por pérdidas crónicas, 40% sangre oculta en heces, 26% niveles bajos de proteínas y función de hígado anormal en el 26% de los casos (Weed *et al.*, 1981). Actualmente no existe ningún marcador tumoral con suficiente especificidad y sensibilidad.

Estudio radiológico con doble contraste de bario. Tiene una sensibilidad del 80-90%.

Endoscopia. Es sin duda el método más fiable. Combinada con la toma de biopsia, al menos 6-8 muestras de diferentes puntos de la lesión, alcanza una precisión diagnóstica del 95%.

Ecografía endoscópica. Permite una evaluación muy precisa del grado de invasión del tumor y de la afectación ganglionar (85-70%, respectivamente). Ha de ser una prueba complementaria a la realización de TAC (Tomografía axial computarizada).

TAC abdominal. Permite conocer la extensión tumoral a estructuras vecinas y ganglios linfáticos.

1.1.6. Clasificación

Los sistemas de clasificación más utilizados son el propuesto por la *American Joint Commission on Cancer* (AJCC) o UICC (*International Union Against Cancer*, Sobin *et al.*; 1997), la llamada clasificación TNM (*Tumor mode metastasis*) y el propuesto por la *Japanese Research Society for Gastric Cancer* (JRS GC) (*Japanese Gastric Cancer Association*, 1998). Ambos se basan en el estudio de la invasión tumoral en la pared del estómago y en la afectación de nódulos linfáticos (Diego Morillas and Solís Herruzo, 2005).

-Clasificación por la AJCC:

Tx, T1, T2, T3 y T4: según la profundidad de afectación tumoral

T0: No existe evidencia de tumor primario

Tis: Tumor intraepitelial que no invade la lámina propia

T1: El tumor invade la lámina propia o submucosa

T2: El tumor invade la *muscularis* propia o la subserosa

T3: El tumor afecta a la serosa o peritoneo visceral, sin invadir estructuras vecinas

T4: El tumor invade estructuras adyacentes

Nx, N1, N2 y N3: según el número de ganglios perigástricos afectados

Nx: No se pueden evaluar los ganglios regionales

N0: No están afectados los ganglios regionales

N1: Afectación de 1 a 6 ganglios regionales

N2: Afectación de 7 a 15 ganglios regionales

N3: Afectación de más de 15 ganglios regionales

Mx, M1 y M2: según la existencia o no de metástasis a distancia

Mx: no se puede evaluar metástasis a distancia

M0: Ausencia de metástasis a distancia

M1: Presencia de metástasis a distancia

Tabla I.1. Clasificación según la *American Joint Commission on Cancer*

Estadio 0	Tis	N0	M0		
Estadio IA	T1	N0	M0		
Estadio IB	T1	N1	M0	/T2 N0 M0	
Estadio II	T1	N2	M0	/T2 N1 M0	/T3 N0
Estadio IIIA	T2	N2	M0	/T3 N1 M0	/T4 N0 M0
Estadio IIIB	T3	N2	M0		
Estadio IV	T4	N1	M0	/T4 N0 M0	/T1 N3 M0
	T2	N3	M0	/T3 N3 M0	/T4 N2 M0
	T3	N3	M0	/Cualquier T, cualquier N M1	

-Clasificación por la JRSGC:

Las normas generales para el estudio del Cáncer gástrico en Cirugía y Patología, publicadas por *The Japanese Research Society for Gastric Cancer* (JRSGC), definen una clasificación basada en: la profundidad de invasión y en la presencia y extensión de la misma a la serosa; clasifica 18 regiones ganglionares dentro de 4 categorías N según los ganglios afectados (perigástrico, eje celíaco, esplénicos...) y la presencia y extensión de metástasis en peritoneo e hígado.

Tabla I.2. Clasificación según *The Japanese Research Society for Gastric Cancer*

SUPERVIVENCIA	ANATOMÍA PATOLÓGICA	CURABILIDAD	GASTRECTOMÍA	RESECCIÓN	ESTADIO
Muerto	Intestinal	A	Subtotal	R0	IA
Vivo	Difuso	B	Total	R1	IB
		C	Irresecable	R2	II
					IIIA
					IIIB
					IV

- Estadio

Depende de tres parámetros:

- T1-T4. Define el grado de penetración, mucosa, submucosa, músculo...

- M0 o M1. Define si existe o no metástasis.

- N1-N3. Define la afectación ganglionar.

Según estos parámetros se define el estadio.

- Anatomía patológica

- Intestinal: El epitelio gástrico parece epitelio intestinal, como si hubiera microvellosidades. Mejor pronóstico debido a que es menos agresivo.

- Difuso: Cuando no es intestinal. Más agresivo.

- Curabilidad (J.R.S.G.C.)

- A: Tras la gastrectomía no hay tumor residual, con un buen pronóstico. No hay linfadenectomía o está limitada a los ganglios próximos. No hay metástasis.

- B: No hay tumor residual pero no cumple alguna de las normas para ser curabilidad A.

- C: Tumor residual.

- Gastrectomía

- Subtotal: Máximo 4/5 partes del estómago.

- Total: Estómago entero. Mejor pronóstico.

- Irresecable: El tumor afecta a estructuras importantes.

- Resección (U.I.C.C.)

- R0: No queda tumor residual. Dejan bordes sin tumor de 2 a 3 cm.

- R1: Queda tumor microscópico.

- R2: Queda tumor macroscópico que no se puede eliminar

1.1.7. Factores pronósticos

Los factores con mayor significación pronóstica son:

- Localización tumoral: los de peor pronóstico son los de tercio superior

- Forma macroscópica: las formas infiltrantes tienen peor pronóstico que los tipos polipoides o ulcerados

- Tipo histológico: presenta peor pronóstico el tipo difuso

- Grado de diferenciación: peor los de mayor grado de diferenciación

-Grado de invasión parietal: es el factor pronóstico de mayor importancia. Cuando el tumor ha alcanzado la capa muscular, las tasas de supervivencia disminuyen considerablemente. La supervivencia de tumores que no superan la mucosa y submucosa es del 90%, cuando se alcanza la serosa desciende al 50%.

-Afectación linfática: mayor importancia que la afectación positiva o no de los ganglios linfáticos, tiene el número y localización de los ganglios afectados. La supervivencia disminuye notablemente a medida que se afectan grupos linfáticos más alejados del tumor inicial

-Presencia de tumor residual tras cirugía

-Metástasis a distancia: conlleva tasas de supervivencia a 5 años inferior al 3%

1.1.8. Tratamiento

El cáncer gástrico temprano puede ser tratado endoscópicamente, pero es poco común, sólo el 10% de los pacientes se encuentran en estadio I cuando se detecta la patología. Generalmente, el tratamiento para el cáncer gástrico es quirúrgico con una eliminación completa del tumor primario y una resección de los nódulos linfoides adyacentes. La gastrectomía total está recomendada para lesiones en el estómago proximal, tercio superior. El adenocarcinoma de tipo intestinal en la parte distal, dos tercios inferior, es tratado con gastrectomía subtotal distal y resección del nódulo linfoide, si es carcinoma de tipo difuso en la zona distal se realiza gastrectomía total.

La quimiorradiación adyuvante combinada con la resección ha demostrado ventajas en la supervivencia y se hace como tratamiento estándar. Los ensayos evaluando la quimioterapia y quimio-radioterapia preoperativa están mostrando resultados prometedores.

1.1.8.1. Inmunoterapia (Plunkett *et al.*, 1999)

En los pasados 25 años se han llevado a cabo extraordinarios avances en la comprensión del sistema inmune, su papel en la respuesta antitumoral y los mecanismos de escape del tumor. Muchos de estos avances ofrecen potenciales tratamientos para luchar contra el cáncer. El concepto de inmunoterapia del tumor apareció hace más de 100 años desde que William Coley observó una regresión del tumor inducida por la estimulación del sistema inmune con toxinas bacterianas (Coley, 1893). La inmunoterapia se ha venido estudiando en los últimos años llegando a la práctica clínica.

Estos descubrimientos han llevado a las siguientes aplicaciones en clínica:

-Citoquinas: Han sido usadas para estimular la citotoxicidad restringida y no restringida a MHC. Principalmente los interferones que modulan la expresión de MHC-I y II y producen un incremento de la citotoxicidad de NK y linfocitos T. También se ha visto el efecto beneficioso de la IL-2 que es capaz de estimular a las células linfoides.

-Vacunas: Éstas se basan en los últimos avances en la identificación de antígenos tumorales. Las células tumorales alogénicas o autólogas, péptidos y carbohidratos aberrantes o sobreexpresados por células tumorales se han utilizado como inmunógenos. Como adyuvante a las vacunas de péptidos se han utilizado células dendríticas debido a su eficiencia como células presentadoras. También se han utilizado virus o bacterias transfectados con cDNA codificando para antígenos tumorales o cDNA codificando para una proteína no propia.

-Anticuerpos monoclonales: Éstos se desarrollan contra antígenos tumorales y pueden estar conjugados con radioisótopos o enzimas que produzcan citotoxicidad. También se han generado anticuerpos biespecíficos que se unen al antígeno tumoral y la célula T y así activan a las células T cercanas al tumor. En leucemias y linfomas se han utilizado anticuerpos monoclonales contra las células del sistema inmune cancerosas.

En el cáncer gástrico el tratamiento más efectivo es la resección quirúrgica de tumor con linfadenectomía. Esto se acompaña de quimioterapia o inmunquimioterapia para prolongar la supervivencia del paciente.

Para aumentar la eficacia clínica de la inmunquimioterapia se está utilizando un nuevo método utilizando modulación bioquímica e inmunopotenciación no específica con modificadores de la respuesta biológica.

2. MECANISMOS DE DEFENSA ANTITUMORALES

2.1. Mecanismos no inmunes. Escape

El 80-90% de los cánceres humanos son inducidos por factores ambientales y el 30-40% por carcinógenos presentes en nuestra dieta. La mayoría de estos carcinógenos son genotóxicos, es decir, dañan el ADN, directamente, formando aductos covalentes o, indirectamente, a través de la inducción de especies reactivas de oxígeno. Algunos carcinógenos no son genotóxicos pero estimulan la proliferación celular incrementando la probabilidad de producción de errores espontáneos durante la replicación del ADN.

Existen mecanismos naturales que eliminan estas especies reactivas de oxígeno como el β -caroteno o diferentes enzimas como las catalasas y peroxidasas, la glutatión-S-transferasa, la uridina difosfato flucuronosil transferasa o la quinona.

Si las enzimas que eliminan estos procesos carcinogénicos fallan y se produce daño en el ADN, existen múltiples mecanismos para reparar el daño. Si las alteraciones del ADN no son reparadas, éstas pueden inducir proliferación celular si se han producido en genes críticos (proto-oncogenes o genes supresores de tumores).

Además de estas mutaciones irreversibles en el ADN se pueden producir alteraciones reversibles que son las llamadas modificaciones epigenéticas; éstas alteran la estructura de la cromatina y la expresión de genes (Jones *et al.*, 2002). La metilación del ADN y la acetilación de histonas constituyen los mecanismos epigenéticos más importantes.

La metilación del ADN ocurre exclusivamente en la posición 5' de las citosinas en el contexto de los dinucleótidos CpG. Los dinucleótidos CG (islas CpG) constituyen el 1-2% del genoma y se caracterizan por alto contenido en C+G y suelen estar localizados en la región promotora o en zonas próximas a la región de transcripción. La metilación de estas islas CpG inhibe la expresión de genes porque provoca la inaccesibilidad al ADN por parte de la maquinaria de transcripción. En las células de mamíferos la metilación del ADN está mediada por las acciones de las ADN metiltransferasas (DNMTs). Su mecanismo de acción se basa en transferir un grupo metilo de la S-adenosina-metionina a la posición 5' de la citosina durante la fase S (Januchowski *et al.*, 2004). Algunas metiltransferasas metilan *de novo* el DNA, otras mantienen el patrón de metilación en las nuevas hebras de DNA complementarias al DNA parental, reconociendo el grupo metilo en la hebra de DNA parental e introduciendo un grupo metilo en la complementaria.

Todavía no está muy claro si la metilación es un proceso reversible. Si los patrones de metilación actúan como señales biológicas para la expresión de genes parece lógico pensar que estos patrones sean reversibles y además hay evidencias convincentes de que existe demetilación. La identidad de las demetilinasas y la naturaleza de su actividad están todavía en controversia. Se ha identificado una enzima con actividad demetilasa, MBD2 aunque su completo mecanismo de acción está por descubrir (Szyf, 2005).

La acetilación de las proteínas de las histonas es realizada por la acción opuesta de varias acetiltransferasas de histonas (HATs) y varias deacetilasas de histonas (HDACs). La acetilación se produce en los residuos de lisina neutralizando las cargas de las proteínas de las histonas y dando lugar a una disminución de la interacción del ADN con éstas facilitando la relajación de la cromatina y la expresión de genes. En contraste, la deacetilación de lisinas por las HDACs da lugar a la compactación de la cromatina y a la represión de la transcripción.

Una vez que el tumor ha conseguido superar todas estas barreras, empieza a crecer y cuando llega a medir entre 1-2 mm de diámetro necesita aporte metabólico y lo consigue gracias a la angiogénesis, creación de vasos sanguíneos que le sirven, además, como vías de escape para la invasión y la metástasis.

Finalmente, si consigue evadir estos mecanismos, se produce la metástasis según los siguientes pasos:

- Penetración en la membrana basal separando tejido conectivo de epitelial
- Desprendimiento de las células neoplásicas del primer tumor
- Movimiento de las células del tumor a la sangre y a los vasos linfáticos (intravasación)
- Supervivencia de las células tumorales en la circulación
- Interacción de las células tumorales con las células endoteliales
- Movimiento de las células a través de las paredes de los vasos sanguíneos (extravasación)
- Migración de las células tumorales a la parénquima del tejido

-Crecimiento de las células del tumor en un lugar metastásico

Para todo ello es necesaria la participación de moléculas de adhesión, angiogénesis y degradación de matriz mediante proteasas.

2.2. Mecanismos inmunes

2.2.1. Concepto de vigilancia inmunológica

La hipótesis de vigilancia inmunológica fue propuesta primeramente por Paul Ehrlich en 1909 (Ehrlich, 1909) y redefinida por Burnet y Thomas en 1970 (Burnet, 1970). En ella se postulaba que el sistema inmune está constantemente supervisando el desarrollo de tumores y previene el desarrollo de la enfermedad neoplásica.

Dado el vasto número de cambios genéticos y epigenéticos asociados con la carcinogénesis está claro que el tumor expresa neoantígenos que serían reconocidos por el sistema inmune. La respuesta inmune opera en los primeros estadios del cáncer, si bien cuando se ha establecido el tumor se produce tolerancia ya que los tumores generan mecanismos que bloquean la respuesta inmune.

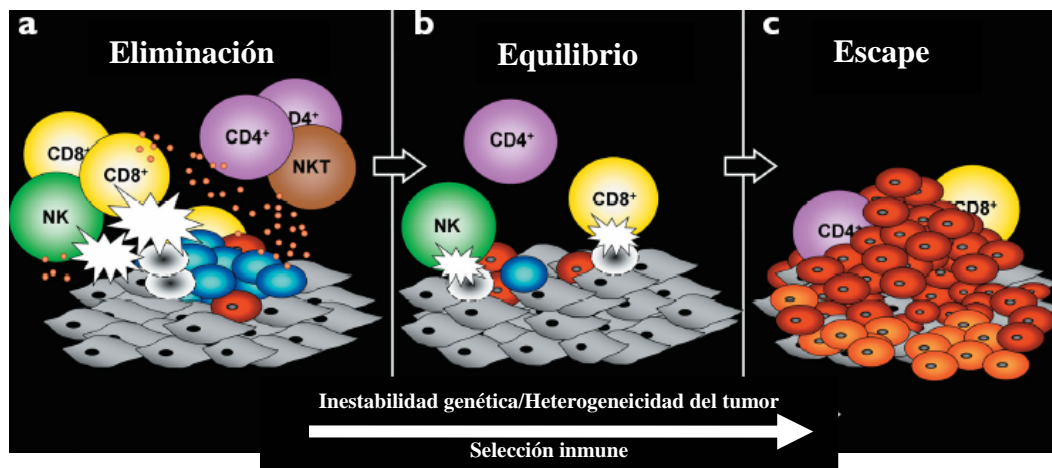
Se han necesitado trabajos de muchos grupos de investigación para poder definir la dinámica de defensa. Tanto la inmunidad innata como la inmunidad adaptativa participan en los procesos antitumorales. Dentro de los mecanismos más importantes podemos nombrar a las células NK, células NKT, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, varias citoquinas y linfocitos T citotóxicos (CTL).

2.2.2. Etapas de actuación del sistema inmune

El proceso se puede dividir en tres etapas: eliminación, equilibrio y escape (Figura I.3) (Dunn *et al.*, 2002). Una propuesta más detallada para el proceso de eliminación, basada en datos de varios grupos actuales, está descrita en la figura I.4.

La vigilancia inmunológica ocurriría durante el proceso de eliminación (Figura I.3a y I.4a). En esta fase, el tumor sólido adquiere cierto tamaño, empieza a crecer invasivamente y necesita aporte sanguíneo. Para ello produce proteínas angiogénicas y estromagénicas. Este crecimiento invasivo causa daños en el tejido del entorno induciendo señales de inflamación que dan lugar al reclutamiento de células del sistema inmune innato (NK, NKT, células T $\gamma\delta$, macrófagos y células dendríticas). Las estructuras de las células transformadas, producidas por el propio proceso tumoral o por la inflamación, son reconocidas por los linfocitos infiltrantes tales como NK, NKT y linfocitos

Figura I.3. El proceso de la carcinogénesis



a) Eliminación (vigilancia inmunológica)

b) Equilibrio (generación de variantes de células tumorales que aumentan la capacidad de evadir el ataque del sistema inmune)

c) Escape (Expansión del tumor)

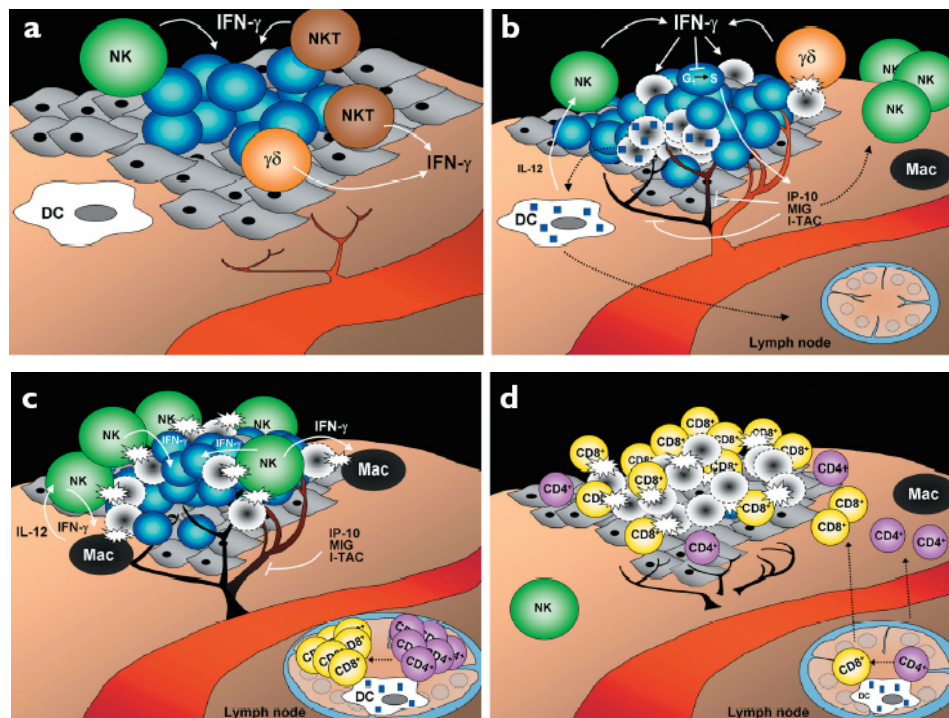
Azul: Células tumorales en desarrollo, Rojo: Variantes de células tumorales, Gris: Células del estroma no transformadas, Naranja: Nuevas células tumorales variantes. Círculos naranjas: citoquinas y los flashes blancos: actividad citotóxica de linfocitos contra células tumorales (Dunn *et al.*, 2002).

En la segunda fase de la vigilancia (figura I.4b), el equilibrio, el IFN- γ produce muerte de células tumorales al inducir mecanismos apoptóticos y antiproliferativos. También induce la producción de las quimiocinas CXCL10 (proteína 10 inducible por interferón, IP-10), CXCL9 (monocina inducida por IFN γ , MIG) y CXCL11 (quimiotáctico de células T inducible por IFN γ , I-TAC) por parte de células del tumor o del tejido sano. Algunas de las quimiocinas tienen capacidades angiostáticas bloqueando la formación de nuevos vasos dando lugar a la muerte de células tumorales. Los restos celulares formados, ya sea directa o indirectamente, como consecuencia del IFN γ , son ingeridos por las células dendríticas locales las cuales migran a los nódulos linfáticos drenantes. Las quimiocinas producidas durante el proceso inflamatorio reclutan más NK y macrófagos.

En la tercera fase (Figura I.4c), las NK infiltrantes de tumor y los macrófagos se activan mutuamente por producción de IFN γ e IL-12 y matan células tumorales por mecanismos de apoptosis mediadas por TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*), perforina e intermedios reactivos de nitrógeno y oxígeno. En

los nódulos linfáticos drenantes, las células dendríticas recién migradas inducen células T CD4 *helper* específicas de tumor que secretan IFN γ (Th1) y así facilitan el desarrollo de células T CD8 específicas de tumor.

Figura I.4. Respuesta inmune ante el tumor



- a) Inicialización de la respuesta (los linfocitos de la respuesta reconocen las células transformadas y producen IFN γ)
- b) El IFN γ da lugar a:
 - i) inducción de quimiocinas
 - ii) acción antiproliferativa del IFN γ del desarrollo del tumor
 - iii) la activación de la actividad citolítica en macrófagos y NK
- c) El crecimiento del tumor es mantenido por la actividad citolítica de células NK y de macrófagos activados mientras las células T CD4 y CD8 específicas de tumor se desarrollan en el nódulo linfático
- d) las células T CD4 y CD8 específicas de tumor vía gradiente de quimiocinas migran a la zona tumoral donde reconocen y destruyen las células tumorales.

Azul: Células tumorales, Gris: Células no transformadas, Blanco: Células dendríticas, Verde: NK, Amarillo: CD8+, Morado: CD4+, Negro: Macrófagos (Dunn *et al.*, 2002).

En la cuarta fase (Figura I.4d), las células T citolíticas destruyen las células remanentes que expresan antígenos de tumor.

En la fase de equilibrio del proceso de carcinogénesis (Figura I.3b), el sistema inmune del huésped y las células tumorales entran en un equilibrio. En este proceso los linfocitos y el IFN γ ejercen una presión de selección sobre las células tumorales. Esta presión es suficiente para contenerlas pero no para extinguirlas. Las células tumorales son genéticamente inestables y mutan rápidamente. Durante este período muchas células

mutantes son destruidas pero algunas de ellas se hacen resistentes al ataque inmune. Esta fase del proceso es la más larga y puede conllevar un período de muchos años.

En el proceso de escape (Figura I.3c) existen variantes del tumor que sobreviven y se hacen resistentes a la detección o eliminación inmunológica a través de los cambios genéticos y epigenéticos empezando a expandirse de manera descontrolada.

2.2.3. Mecanismos de escape del tumor

A pesar de que el sistema inmune es capaz de reconocer al tumor y destruirlo, un gran número de tumores continúa creciendo y evadiendo el reconocimiento y destrucción por el sistema inmune. El tumor posee múltiples mecanismos para escapar del sistema inmune (Khong *et al.*, 2002; Rodriguez *et al.*, 2003b; Ahmad *et al.*, 2004); y son uno de los mayores obstáculos para el diseño, desarrollo y éxito de la inmunoterapia.

2.2.3.1. Pérdida o disminución de las moléculas de histocompatibilidad de clase I (MHC-I)

La alteración de la expresión de las moléculas MHC-I en los tumores es un fenómeno bien conocido. La pérdida selectiva de alelos ha sido descrita con multitud de modelos murinos y con líneas celulares humanas. Estos fenotipos alterados permiten a las células tumorales evitar el reconocimiento y el ataque por parte de las células T CD8+, capaces de mediar citotoxicidad. Los cambios en las moléculas de MHC (Garrido *et al.*, 2001) pueden ser debidos a mutaciones en el gen de la β_2 -microglobulina, pérdida de haplotipos, pérdida alélica por mutaciones en los genes, alteraciones en los factores de transcripción o mutación en los genes de las proteínas que controlan el ensamblaje y la expresión en membrana de moléculas HLA, incluyendo el proteasoma (LMP-2 y LMP-7) y los transportadores de péptidos (TAP1 y TAP2) .

Las células tumorales, con un decremento en la expresión de MHC, deberían ser más susceptibles a la lisis por células NK, sin embargo, los tumores pueden expresar ligandos inducidos por el estrés como MICA y MICB (*Major histocompatibility complex (MHC) class I chain related*) los cuales inhiben, cuando se liberan las formas solubles, la función citotóxica de las células NK, linfocitos T $\gamma\delta$, linfocitos T-CD8 y la producción de IFN γ .

2.2.3.2. Disminución, mutación o pérdida de los antígenos tumorales

Las células tumorales pueden evadir el reconocimiento del sistema inmune por la disminución en la expresión de los antígenos tumorales a través de mecanismos que aún no están claros, pero parecen ser independientes de la expresión de MHC. La expresión de antígenos de tumor es conocida por su heterogeneidad, incluso en un mismo tumor. Este cambio antigénico, mecanismo común utilizado por los virus para escapar del reconocimiento inmunológico, ha sido descrito en tumores, tanto en modelos murinos como en

pacientes. Estas mutaciones disminuyen severamente el reconocimiento del antígeno tumoral por células T mediante una variedad de mecanismos, incluyendo modulación de la interacción péptido-MHC y unión del TCR al complejo MHC-péptido.

2.2.3.3. Alteración en los receptores de señalización de muerte celular

La eliminación de células T que responden a antígenos propios a través de la unión del ligando de Fas (FasL) al receptor Fas es un mecanismo bien conocido para la inducción de apoptosis y la tolerancia a antígenos propios. Se ha descrito la existencia de altos niveles de expresión de FasL en células tumorales que podría inducir apoptosis en células T infiltrantes o circulantes dando lugar al escape de la respuesta inmune. Varios trabajos han sugerido la existencia de un aumento en el porcentaje de apoptosis de células T de sangre periférica en diferentes tipos de cáncer.

Las células del tumor también han mostrado pérdidas en la expresión de Fas, desarrollando resistencia a apoptosis inducida por FasL expresado en células efectoras del sistema inmune. Esta alteración de Fas en tumores puede ser debida a mutaciones en el gen que codifica para Fas o en mutaciones de algunas proteínas implicadas en la cascada de apoptosis, tales como caspasa 10 y FADD. Algunos tumores expresan el inhibidor de la caspasa 8 (cFLIP, *cellular FLICE-inhibitory protein*) haciéndoles resistentes a la apoptosis mediada por Fas. Este inhibidor también inhibe la apoptosis mediada por el receptor de TNF (TNF-R y TRAIL-R) (*Tumor necrosis factor*). El incremento de expresión de cFLIP en células de tumor se cree que contribuye a la resistencia contra células T *in vivo*.

2.2.3.4. Producción de citoquinas inmunosupresoras

Las células tumorales producen un número de citoquinas y quimiocinas que pueden tener efecto supresor sobre las células del sistema inmune. En algunos tipos de cáncer se ha observado que la expresión de mRNA de interleuquina-4 (IL-4), interleuquina-10 (IL-10), TGF- α y TGF- β 1 es más alta que la de IL-2, IL-12, IL-18 e INF- γ . Es decir, hay un predominio de expresión de citoquinas de tipo 2, inmunosupresoras.

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es secretado por muchos tumores y no sólo es importante para la vascularización del tumor sino también es producido por éstos para escapar del reconocimiento inmunológico y bloquear la diferenciación y maduración de las células dendríticas por supresión del factor de transcripción NF κ β (*Nuclear Factor- κ β*) en células madres hematopoyéticas.

La IL-10 es una citoquina supresora que se ha visto muy aumentada en ciertos tipos de cáncer. Tiene la habilidad de inhibir la presentación antigénica, la producción de IL-12 y la inducción de respuestas Th1 *in vivo*.

Se han encontrado altas concentraciones de TGF- β en pacientes con cáncer encontrándose en mayor cantidad en aquellos pacientes con peor pronóstico.

La producción de los factores solubles VEGF, IL-10, TNF y TGF- β es el mecanismo utilizado por el tumor para evitar el reconocimiento por el sistema inmune mediante dos efectos: inhibir la función efectora y el desarrollo de células inmunes actuando en los estadios tempranos de la inmunopoyesis.

2.2.3.5. Células inmunosupresoras

Existen dos tipos de células (las células T reguladoras CD4+CD25+ y las células NKT CD4+DX5+) que pueden tener efecto supresor sobre el sistema inmune del huésped proporcionando al tumor la oportunidad de escapar del reconocimiento inmune.

Las células T reguladoras CD4+CD25+ han sido recientemente descritas como una subpoblación que constituye el 5-10% del total de células T CD4+ y parecen controlar la tolerancia a los autoantígenos (Baecher-Allan *et al.*, 2005), la inhibición de la proliferación de células T y producción de TGF- β . Se ha descrito un incremento en el porcentaje de esta población en pacientes con diferentes tipos de cáncer (Ichihara *et al.*, 2003). Todas estas observaciones proporcionan claras evidencias de la contribución de las células T CD4+CD25+ a la disfunción inmune de los pacientes con cáncer.

2.2.3.6. Indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO)

Esta enzima tiene una distribución ubicua en tejidos y células de mamíferos y su función es la de convertir el triptófano en N-formilkilurenina. Esta enzima citosólica cataliza el paso inicial y limitante en el catabolismo del triptófano. Los bajos niveles de triptófano en el tumor causan arresto de las células T en la fase G1 y apoptosis de células T activadas. Esta enzima está expresada constitutivamente en tumores humanos y se ha visto, en ratón, que bloquea la expansión clonal de células T.

Todos estos datos demuestran que IDO debe representar un potente mecanismo por parte de las células dendríticas para regular la respuesta inmune frente a antígenos tumorales.

2.2.3.7. Pérdida de señales coestimuladoras

Para la activación de los linfocitos T se requiere un mínimo de dos señales, una proporcionada por el antígeno y otra, llamada coestimuladora, proporcionada por proteínas de membrana como son B7.1 (CD80)/B7.2 (CD86) (June *et al.*, 1994) cuyos ligandos son CD28 y CTLA4, respectivamente; CD40L en células T CD4 activadas que se une a CD40 en células presentadoras de antígeno; CD58 (LFA-3) que se une a CD2 y CD54 (ICAM-1) que se une a LFA-1. Miembros de la superfamilia del receptor del TNF como CD27, CD30, 4-1BB y OX40 se han mostrado también como señales coestimuladoras. La estimulación de las células T en ausencia de esta coestimulación da lugar a su entrada en la anergia o en apoptosis.

Las células tumorales son capaces de inducir tolerancia específica de antígeno o anergia debido a la pérdida o baja expresión de moléculas coestimuladoras.

2.2.3.8. Cambios en las células presentadoras de antígenos

Las células presentadoras de antígeno (macrófagos y células dendríticas) procesan y presentan antígenos a células T.

Las células mieloides inmaduras se ven incrementadas en número en la circulación de ratones portadores de tumores y en pacientes con cáncer. Cuando se elimina el tumor disminuye el número de esta población y se recupera la respuesta de linfocitos T. El aumento de estas células parece ser inducido por VEGF producido por las células del tumor las cuales bloquean la maduración de las células dendríticas por supresión de la activación del factor de transcripción $\text{NF}\kappa\beta$. Además los tumores inducen incremento selectivo de las células DC2 o células dendríticas reguladoras que inducen anergia en linfocitos T.

Estas células de fenotipo mioide inmaduro expresan marcadores granulocito-monocito Gr1+CD11b+ en ratones portadores de tumores y se acumulan en bazo, nódulos linfáticos y sangre. Son capaces de inhibir la producción de anticuerpos, la generación de CTLs, la función de células T y la proliferación linfocítica. La acumulación de células Gr1+CD11b+ y su habilidad para inhibir la función de células T ha sido descrita en pacientes con cáncer. Estas células son capaces de disminuir la expresión de la molécula $\text{CD3}\zeta$ significativamente e inhibir las células T CD8+ específicas de antígeno.

Los tumores también alteran la función citotóxica de los macrófagos por bloqueo de la producción de óxido nítrico. El óxido nítrico es un importante componente del mecanismo citotóxico desarrollado por macrófagos, células endoteliales y neuronas. Varios estudios han encontrado que macrófagos de pacientes con cáncer o de ratones portadores de tumores poseen disminución de la producción de óxido nítrico cuando se compara con individuos controles. Sin embargo, estos estudios no encuentran una disminución de la iNOS, sugiriendo que es otro mecanismo, tal como la falta del sustrato del óxido nítrico, la arginina, el responsable de la inhibición de la producción de óxido nítrico.

2.2.3.9. Disfunción de células T efectoras

Los linfocitos T son células de especial relevancia en la inmunidad adaptativa. Su papel principal es reconocer el antígeno presentado a través de MHC por la célula presentadora de antígeno mediante la unión a su receptor de antígeno de la célula T (TCR). Así se activará y dará lugar a una serie de eventos para llevar a cabo la respuesta inmune adaptativa.

Los linfocitos T parecen ser elementos principales contra las células cancerígenas. Se han encontrado linfocitos T específicos de tumor en la circulación de pacientes con cáncer (Letsch *et al.*, 2000) o infiltrando el

tejido tumoral (*tumour-infiltrating lymphocytes*, TIL, (Whiteside *et al.*, 1994a; Whiteside, 1994b). Estos linfocitos T, aparentemente, han sido estimulados por los antígenos neoplásicos en la superficie de la célula tumoral y su papel sería eliminar la célula tumoral que los presenta. Sin embargo, no está claro porqué los linfocitos T fallan al ejercer este control y los tumores progresan y se diseminan (Pawelec, 2004).

Este fallo del sistema inmune ha sido explicado, entre otras razones, por la secreción de factores derivadas del tumor que serían capaces de producir una inmunosupresión permitiendo la diseminación del tumor (Lockhart *et al.*, 2001). Tal factor, el cual ha sido caracterizado bioquímicamente en ciertos tumores (Taylor *et al.*, 2001), podría afectar a la funcionalidad de los linfocitos T.

Se ha descrito una disminución o ausencia de moléculas asociadas al TCR, como p56lck (Mizoguchi *et al.*, 1992; Finke *et al.*, 1993; De Paola *et al.*, 2003), p59fyn (Mizoguchi *et al.*, 1992) o CD3 ζ , en ratones portadores de tumores (Mizoguchi *et al.*, 1992) y en diferentes tipos de cánceres humanos, como el cáncer gástrico (Kim *et al.*, 1999; Ishigami *et al.*, 2002; Kono *et al.*, 1998), renal (Finke *et al.*, 1993), de ovario (Taylor *et al.*, 2001), cervical (Kono *et al.*, 1996a; de Gruijl *et al.*, 1999), colorrectal (Nakagomi *et al.*, 1993), pancreático (Schmielau *et al.*, 2001b), de cabeza y cuello (Muller *et al.*, 2002), de pulmón (Schule *et al.*, 2002) o melanoma (Zea *et al.*, 1995). Hay muchos estudios acerca de las posibles causas de la baja expresión de CD3 ζ :

- 1) Existencia de un factor secretado por el tumor (Lockhart *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2001)
- 2) Altos niveles de IL-10 y TGF β que dan lugar a un efecto inmunosupresor sobre las células del sistema inmune.
- 3) Altos niveles de IFN γ , que activa a los monocitos y granulocitos que producirían especies reactivas de oxígeno causando estrés oxidativo (Otsuji *et al.*, 1996; Schmielau *et al.*, 2001a).
- 4) Disminución de L-arginina por su consumo por macrófagos (Rodríguez *et al.*, 2002) lo que daría lugar a una disminución en la estabilidad del mRNA de la cadena CD3 ζ . Los niveles de arginina están regulados por la óxido nítrico sintasa (iNOS) y la arginasa I producida por macrófagos o células tumorales. Los niveles de arginasa I se aumentan por macrófagos por las citoquinas Th2.
- 5) Infiltración de macrófagos asociados al tumor (*tumor-associated macrophage*, TAM. (Ishigami *et al.*, 2003) que pueden producirIDO que elimina el triptófano del medio dando lugar a la apoptosis de células T.
- 6) Apoptosis de células T (Rabinowich *et al.*, 1998) que puede ser producida por gangliósidos que suprimen el factor de transcripción NF κ B65 o por la producción deIDO.

Todo ello llevaría a la aparición de defectos funcionales como decremento en la fosforilación de tirosinas, en la movilización de calcio intracelular, en la proliferación a diferentes mitógenos o en la traslocación de NF κ B65 que da lugar al predominio del homodímero NF κ B50/50 actuando como represor del gen del IFN γ . De

hecho, la producción de citoquinas durante el crecimiento progresivo del tumor en modelos de ratón mostró una respuesta tipo Th1 (IL-2 e IFN γ) en los estadios tempranos que tras la implantación del tumor se transformó en un patrón de citoquinas tipo Th2 (IL-4 e IL-10).

Se han descrito, también, cambios en otras moléculas de señalización como Jak3, tirosina quinasa asociada a la cadena γ del elemento común a los receptores para las citoquinas IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15.

En ciertos trabajos se sugirió que las alteraciones en la transducción de señales del linfocito T se producían en estadios avanzados del tumor (Nakagomi *et al.*, 1993; Bukowski *et al.*, 1998) así como que esta disminución era mayor en TIL o células T de los nódulos linfáticos drenantes que en los linfocitos T de sangre periférica. Sin embargo, algunos pacientes muestran también alteraciones en la transducción de señales en estadios tempranos de la enfermedad (Kono *et al.*, 1996a). Otros han sugerido una asociación entre los niveles de expresión de CD3 ζ y la supervivencia al tumor (Whiteside, 2004).

La expresión de CD3 ζ se recobra en terapias basadas en la administración de IL-2 (Rabinowich *et al.*, 1996; Bukowski *et al.*, 1998; De Paola *et al.*, 2003) pero no siempre coincide con una recuperación de la función de la célula T, medida como expresión y actividad tirosina quinasa y de ciertos factores de transcripción.

3. LINFOCITOS T

En la mitad de los años 80, los avances en la biología de las células T proporcionaron la base para comprender los eventos moleculares que se producen en la activación de estas células. Entre estos mecanismos se descubrieron los elementos que forman parte del receptor de antígeno de la célula T y los mecanismos de transducción de señales tras la estimulación por antígeno (Weiss *et al.*, 1991; Frank *et al.*, 1990).

3.1 Clasificación de linfocitos T

Se han identificado dos linajes de linfocitos T según las moléculas que constituyen el TCR: el linaje constituido por las cadenas $\alpha\beta$ (linaje mayoritario en humanos, 90-95% de las células T periféricas) o el linaje constituido por las cadenas $\gamma\delta$ (linaje minoritario en humanos, 5-10% de las células T periféricas). Tanto en uno como en otro linaje, el TCR se asocia al complejo CD3.

Los linfocitos T $\gamma\delta$ son muy heterogéneos desde el punto de vista del reconocimiento antigénico: algunos reconocen antígenos restringidos por proteínas MHC clásicas, otros por moléculas no clásicas y otros se unen indirectamente al antígeno.

Los linfocitos T $\alpha\beta$ se han especializado en el reconocimiento de fragmentos de antígenos presentados por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), sobre la superficie de las células presentadoras de antígeno o células diana (APC).

Los linfocitos T $\alpha\beta$ se subdividen a su vez en células T cooperadoras (T *helper*, Th) y células T citotóxicas (Tc). Los T cooperadores expresan la molécula CD4 y secretan citoquinas y otros factores cuando reconocen antígenos presentados por moléculas MHC de clase II. Son importantes en la inducción de proliferación de las células B y de su maduración hacia células plasmáticas (células secretoras de anticuerpos). Los linfocitos T citotóxicos expresan CD8 en su superficie y provocan la muerte de las células sobre las que reconocen antígenos extraños unidos a moléculas MHC de clase I (Davis *et al.*, 2003).

3.1.1. Linfocitos gastrointestinales (James, 1994)

Para poder describir la función de estos linfocitos es necesario hacer mención al sistema inmunológico de mucosas.

3.1.1.1. Sistema inmunológico de mucosas

Las superficies mucosas del tracto gastrointestinal, respiratorio y urogenital tienen una superficie de 400 m² y están cubiertas de una capa de células epiteliales. La mayoría de los antígenos con los que se encuentra el sistema inmunológico de un ser vivo a lo largo de su vida entran a través de las mucosas, siendo la mayor zona del organismo en contacto con el medio externo. Como defensa, la mucosa está poblada con células del sistema inmune, el llamado sistema inmunológico de mucosas.

El sistema inmunológico de las mucosas (MALT- *mucosal associated lymphoid tissue*) consiste en tejidos linfoides asociados con las caras internas del organismo. Pueden ser divididos atendiendo a su morfología y funcionamiento en tejido linfoide organizado y tejido linfoide difuso.

-Tejido linfoide organizado: Formado por los folículos de la mucosa. Es el responsable de la inducción de la respuesta inmunológica. La agregación de los folículos se produce en las llamadas Placas de Peyer situadas en el intestino delgado y en el apéndice. Las Placas de Peyer están formadas por una acumulación de células B y células T. Las Placas de Peyer toman el antígeno del lumen intestinal a través del epitelio, conocido como epitelio asociado al folículo (FAE). Los nódulos linfáticos mesentéricos (MLN) funcionan como una unión entre la recirculación periférica y las mucosas

-Tejido linfoide difuso: Consiste en linfocitos dispersos por el epitelio y la lámina propia de la mucosa. En él se produce la respuesta inmunológica efectora.

La lámina propia es la capa de tejido conjuntivo situada entre el epitelio y la *muscularis mucosa*. En ella se encuentran células T, células B, macrófagos, células dendríticas, granulocitos y mastocitos. Los linfocitos T de lamina propia son principalmente CD4+ (60-70%) y la gran mayoría TCR $\alpha\beta$ (95%). Cerca del 10% son CD25+ y

la mayoría expresa CD45RO, fenotipo de memoria. Estas células T CD4+ son de especial importancia para la regulación de la respuesta inmune local y producen una gran cantidad de citoquinas como IFN- γ , IL-4 e IL-10.

Las células T CD8 de lámina propia pueden tener una actividad citolítica potente. Algunas de estas células pueden ser verdaderas células efectoras ayudando a las células B a producir IgA. Dentro de las células T de lamina propia están las células T reguladoras que son responsables del mantenimiento de la tolerancia local a los antígenos ambientales.

Los linfocitos gastrointestinales se denominan a todos los linfocitos T que se encuentran entre las células epiteliales. Estos linfocitos interactúan con el antígeno en los tejidos linfoides organizados y luego se diferencian y maduran en los centros germinales de los folículos linfoides. Posteriormente, dejan rápidamente la mucosa y migran a través de los nódulos linfoides mesentéricos hacia la circulación sistémica. De la sangre, los linfocitos activados por antígeno, migran de vuelta a la mucosa y se extravasan, principalmente, a la lámina propia donde se les denomina linfocitos de lamina propia (LPL) o si llegan a la zona intraepitelial, sobre la membrana basal, se les denomina linfocitos intraepiteliales (IEL).

Son células principalmente T CD8+ (citotóxicos o supresores), sólo el 5-15% son T CD4+ (cooperadores o inductores). Muchas de las T CD4+ también expresan CD8 $\alpha\alpha$. Son células de memoria y, por lo tanto, expresan marcadores de memoria siendo la mayoría CD45RO. Más del 95% expresan TCR $\alpha\beta$ aunque en la mucosa de colon hay una alta proporción de células TCR $\gamma\delta$, con lo que se piensa que tienen un papel especial. Las secuencias VDJC han mostrado la evidencia de oligoclonalidad en estas células.

La activación de células T va rápidamente seguida de un aumento de la expresión del receptor de la IL-2. Estos linfocitos expresan elevadas cantidades de CD25 que se correlaciona con una mayor respuesta proliferativa a bajas dosis de IL-2. Esto indica un estado de activación de estas células siendo además capaces de producir altas cantidades de IL-2 (Zeitz *et al.*, 1988). Además también expresan MHC-II y otros marcadores de activación.

Las funciones de estas células no están claras. Sin embargo, pueden participar en citotoxicidad, secreción de citoquinas, regulación de la renovación del epitelio de la mucosa y tolerancia.

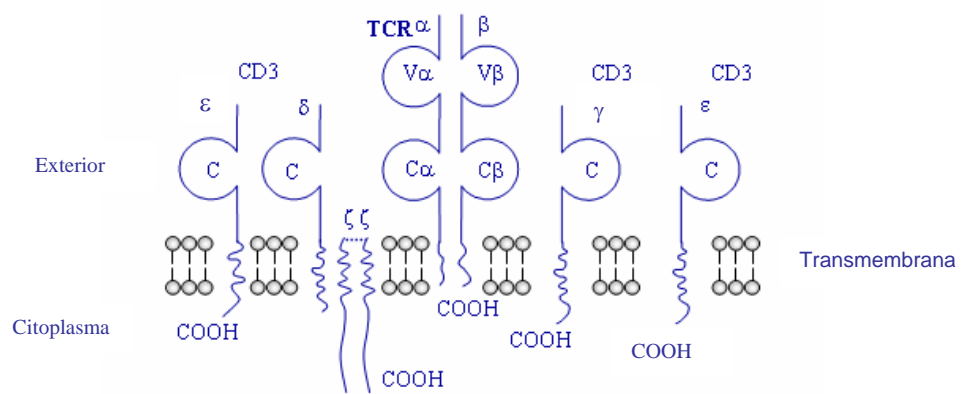
3.2. El receptor para antígeno del linfocito T: complejo TCR/CD3

En ambos casos, el TCR está formado por dos cadenas polimórficas ($\alpha\beta$ o $\gamma\delta$) que le confieren la especificidad de antígeno y forman el sitio de unión al antígeno presentado en el MHC. Son cadenas variables y glicosiladas que se asocian entre sí por un puente disulfuro. Estas cadenas están unidas covalentemente al complejo CD3 formado por las cadenas invariantes γ , δ , ϵ y ζ , unidas entre sí por uniones no covalentes, excepto ζ (Clevers *et al.*, 1988). Las cadenas CD3 γ , CD3 δ (ambas glicosiladas y de gran similitud, (Krissansen *et al.*, 1986) y la cadena CD3 ϵ (no glicosilada) pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, como el

TCR. La cadena ζ se asocia al complejo TCR, bien en forma de homodímeros $\zeta\zeta$ (en el 90% de los complejos TCR/CD3) o, bien, formando heterodímeros con otras cadenas de su misma familia como η , derivada de un procesamiento alternativo del mRNA de la cadena ζ (Clayton *et al.*, 1991) (Figura I.5).

Las cadenas CD3 son las responsables de transducir la señal de reconocimiento al interior celular (Ashwell *et al.*, 1990) y de regular los niveles de expresión del receptor en la superficie celular. Las cadenas CD3 γ , CD3 δ y CD3 ϵ constan de una región extracelular grande con un dominio inmunoglobulina, una región transmembrana y un dominio intracelular pequeño con un dominio ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*). Sin embargo, la cadena CD3 ζ posee un corto dominio extracelular, una región transmembrana y una región intracelular grande que contiene tres dominios ITAM.

Figura I.5. Esquema de los componentes del complejo TCR y CD3 y su relación con la membrana celular



3.2.1. CD3 ζ

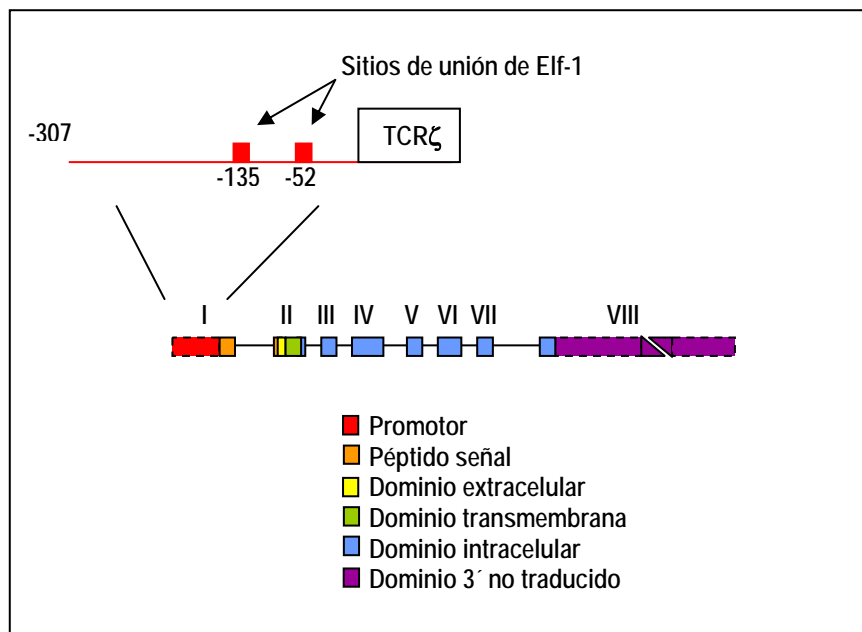
La cadena CD3 ζ forma parte del complejo CD3. La unión del TCR $\alpha\beta$ al péptido presentado vía MHC en la célula presentadora de antígeno da lugar a una serie de señales intracelulares en los dominios citoplasmáticos de la cadena CD3 ζ (Weiss *et al.*, 1994). Estos dominios denominados ITAM son secuencias conservadas YxxLx6-8YxxL que contienen residuos de tirosina (Y) separados entre sí por 18 aminoácidos y son la diana para las fosforilaciones mediadas por tirosina quinasas asociadas al receptor (Latour *et al.*, 2001). La asociación del TCR con los ligandos adecuados tiene como consecuencia una rápida fosforilación de estos residuos y de proteínas tirosina quinasas asociadas a ellos como la familia Syk dando lugar a la señalización intracelular (Wange *et al.*, 1996).

La cadena CD3 ζ (16KDa) existe, normalmente, como homodímero de 32 KDa. Sin embargo, el 10% de la cadena existe como heterodímero con la subunidad η (Baniyash *et al.*, 1988). CD3 η consiste en un procesamiento alternativo de la cadena CD3 ζ al que le falta un residuo de tirosina en su extremo carboxilo terminal. También se ha demostrado la existencia del homodímero η - η (Clayton *et al.*, 1990). La preferencia en el ensamblaje a un TCR estable es CD3 ζ_2 >CD3 $\zeta_1\eta$ >CD3 η_2 . Los dímeros con menos dominios ITAM darían lugar a una disminución en la proliferación, la respuesta de flujo de calcio y la producción de IL-2 (Bauer *et al.*, 1991).

Existen dos formas de la cadena CD3 ζ fosforilada, una de 21KDa y otra de 23KDa (p21 y p23, respectivamente, (Pitcher *et al.*, 2003b). p21 es fosforilada en 4 tirosinas mientras que p23 es fosforilada en 6 tirosinas (van Oers *et al.*, 2000). p21 está constitutivamente fosforilada en timocitos y células T periféricas como consecuencia de la interacción del TCR con los complejos MHC/antígeno propio (Nakayama *et al.*, 1989; Pitcher *et al.*, 2003a).

El gen de la cadena CD3 ζ está localizado en el cromosoma 1 q22-q23 (Weissman *et al.*, 1988). Está constituido por 8 exones y 7 intrones (Figura I.6). El primer exon contiene el extremo 5' no traducido y la mayoría del péptido señal. El segundo exon codifica parte del péptido señal, el dominio extracelular, el dominio transmembrana y los primeros aminoácidos de la región intracitoplasmática. El resto de la región intracitoplasmática está distribuida en los otros 6 exones, separados por intrones de entre 0,8 a 1,6 Kb. El promotor de la cadena CD3 ζ se ha identificado entre las posiciones -307 y la +58 (Rellahan *et al.*, 1994). Esta región incluye al menos dos sitios de iniciación de la transcripción del gen de la cadena CD3 ζ .

Elf-1 (*E-74-like factor*) es un factor de transcripción de la familia Ets (*E-26-specific*) y es crucial para la transcripción de la cadena CD3 ζ . Elf-1 tiene dos sitios de unión en el promotor de la cadena CD3 ζ (-152/-119 y -66/-33, Jensen *et al.*, 1992). Elf-1 existe mayoritariamente en el citoplasma con un peso molecular de 80KDa y tras fosforilación y O-glicosilación se mueve al núcleo adquiriendo un peso molecular de 98 KDa que se une al ADN (Juang *et al.*, 2002). Además está implicado en la regulación de varios genes, tales como lck y lyn quinasas, CD4, la subunidad IL-2R α del receptor de la IL-2, GM-CSF e IL-2. (Figura I.6).

Figura I.6. Esquema del gen de la cadena CD3 ζ 

Las subunidades Fc ϵ R1 γ y CD3 ζ están estructuralmente relacionadas y los genes que las codifican probablemente son genes duplicados (Ravetch *et al.*, 1991). Fc ϵ R1 γ es la cadena γ del receptor Fc ϵ de tipo I, receptor de alta afinidad de la IgE y tiene un dominio ITAM citoplasmático. Está expresado en mastocitos, basófilos, monocitos y células NK (Capron *et al.*, 1995). A diferencia de CD3 ζ , que utiliza ZAP70 en la señalización, Fc ϵ R1 γ se asocia con la proteína quinasa Syk (Shiue *et al.*, 1995a; Shiue *et al.*, 1995b), más potente en su capacidad de señalización que ZAP70 (Taylor *et al.*, 1997).

La expresión de CD3 ζ está disminuida en ciertas enfermedades como el cáncer (colorrectal, colon, renal, ovario, cervical, pulmón, próstata, cabeza y cuello, melanoma, leucemia, páncreas...), infecciones (HIV, Trimble *et al.*, 1998), *Mycobacterium leprae* (Zea *et al.*, 1998) o desórdenes autoinmunes (lupus eritematoso sistémico, (Tsokos *et al.*, 2000), artritis reumatoide (Maurice *et al.*, 1997)), aunque no se sabe cuál puede ser la causa de esta baja expresión (Baniyash, 2004).

En algunos desórdenes autoinmunes, como el lupus eritematoso sistémico, Fc ϵ R1 γ reemplaza funcionalmente a CD3 ζ y transduce señales mediante Syk (Enyedy *et al.*, 2001). Esta sustitución da lugar a anomalías en la señalización mediada por el complejo TCR/CD3, produciendo un aumento en la concentración de calcio intracitoplasmático, en la fosforilación en tirosinas y en la producción de IL-2 (Lioussis *et al.*, 1998; Vassilopoulos *et al.*, 1995; Nambiar *et al.*, 2003a).

Como se ha mencionado anteriormente, se han postulado diferentes hipótesis acerca de las posibles causas de la disminución de expresión de la cadena CD3 ζ . Estas hipótesis se podrían resumir en dos:

1) Entorno inflamatorio o inmunosupresor (secreción de metabolitos, consumo de L-arginina por macrófagos, citoquinas proinflamatorias, secreción de factor tumoral...)

2) Defecto funcional a nivel de células T (degradación en proteasoma, aumento de caspasa 3, splicing del mRNA...)

Varios trabajos han sugerido que la IL-2 restaura los niveles de CD3 ζ en diferentes tipos de cáncer dando lugar a una reparación de los mecanismos de activación celular (De Paola *et al.*, 2003; Bukowski *et al.*, 1998; Rabinowich *et al.*, 1996).

3.2.3. Activación del linfocito T

Dos miembros de la familia de tirosina quinasas Src, p56lck y p59fyn, son críticas en la transducción de señales. Se aproximan a los correceptores CD4 y CD8 tras la unión simultánea TCR/CD3 al complejo MHC/péptido. Esta asociación provoca la fosforilación de los residuos de tirosina conservados en los motivos ITAM que contiene la cadena CD3 ζ en su cola citoplasmática. Esta fosforilación le permite a la cadena ζ unirse a ZAP70, tirosina quinasa de la familia Syk, mediante los dominios SH2 (*Src homology 2*). Tras esta unión, ZAP70 es fosforilada y se activa dando lugar a la señalización a través de tres vías (Figura 1.7):

1) Activación de la fosfolipasa C γ (PLC γ) que a partir del fosfatidil inositol bifosfato (PIP2) de la membrana da lugar a diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). El IP3 provoca la salida de calcio del retículo endoplasmático al citoplasma, activando así la calcineurina que permite que el factor de transcripción NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) se transloque al núcleo. La actividad transcripcional de NFAT requiere de otro factor de transcripción AP-1 (*activator protein-1*), dímero de miembros de la familia Fos y Jun.

2) El DAG, junto con el calcio intracelular, activa la proteína quinasa C (PKC) que a su vez activa a otro factor de transcripción, NF κ B.

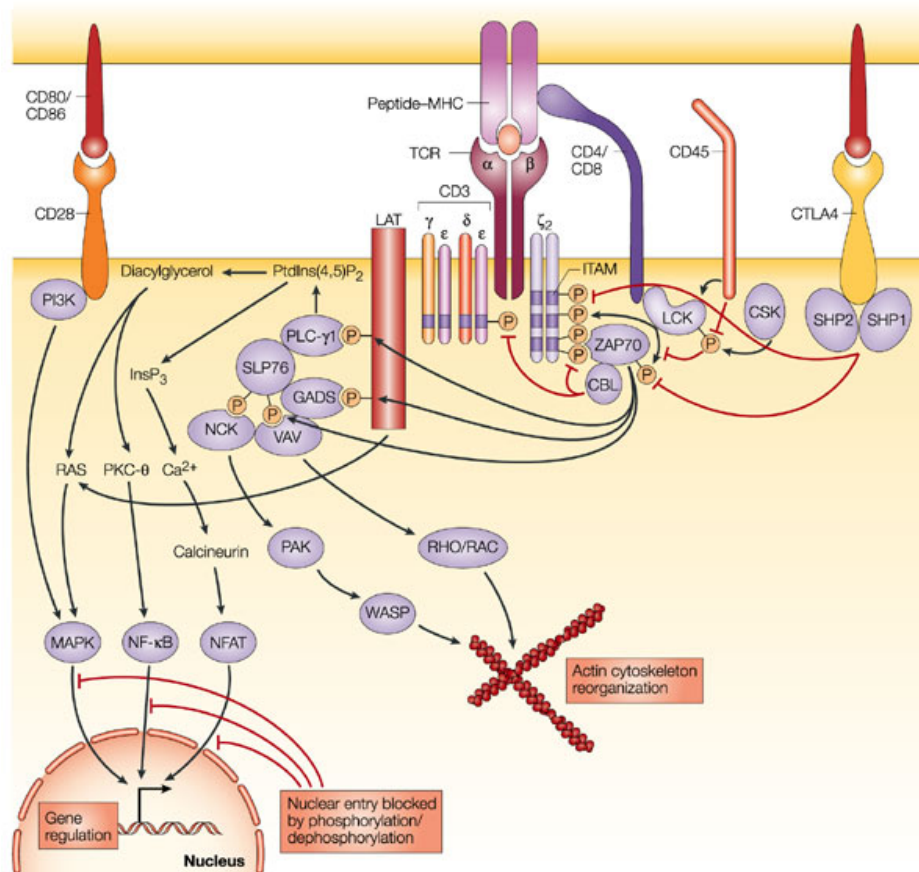
3) Activación de Ras mediante su unión a GTP que depende de las proteínas GEF (*guanine nucleotide exchange proteins*), que son activadas, a su vez, por ZAP70. Ras impulsa la cascada de las MAP quinasas (*mitogen-activated protein kinases*) que culmina con la activación de Fos y, así, del factor de transcripción AP-1. La señalización a través de Ras es esencial para la inducción de genes de citoquinas.

La estimulación del TCR también lleva a la activación de otra proteína implicada en el metabolismo de lípidos de membrana, la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K), que fosforila PIP2 para dar PIP3, que regulan la actividad de la PLC γ o de la proteína quinasa B (PKB), relevantes en el control del ciclo celular y en la inhibición de la exportación de NFAT del núcleo (Acuto *et al.*, 2000).

Finalmente, NFAT y NF κ B inician la correspondiente transcripción génica, que resulta en la diferenciación, proliferación y acción efectora de los linfocitos T (Janeway, 2000).

Durante todas estas etapas de activación celular, además de las proteínas descritas, son necesarias un grupo de proteínas adaptadoras que median de manera constitutiva o inducible la unión proteína-proteína o proteína-lípido. Estos adaptadores no tienen actividad enzimática o transcripcional y se caracterizan por tener dominios de unión modular como SH2, SH3 o PH. Se pueden dividir entre los que ejercen funciones reguladoras positivas como LAT, SLP76, SLP-65, Gads, VAV... y los que ejercen funciones reguladoras negativas como PAG, SLAP, Dok...

Figura I.7. La activación de los linfocitos T a través del TCR/CD3 induce la activación de múltiples vías de transmisión de señales intracitoplasmáticas



3.2.4. Rafts lipídicos

Algunas de las proteínas implicadas en la transducción de señales se encuentran en compartimentos de membrana llamados balsas lipídicas o rafts lipídicos. Son plataformas ricas en colesterol y gangliósidos que facilitan y coordinan las interacciones entre las diferentes moléculas de señalización (Simons *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 2000). Los rafts lipídicos están normalmente dispersos en la membrana celular y son importantes para el ensamblaje de los complejos de señalización.

En las células T normales la unión del TCR al MHC induce la rápida compartimentalización de la máquina de señalización en los rafts dando lugar a la concentración de las proteínas de señalización en el área de contacto del linfocito T con la célula presentadora de antígeno, en lo que se conoce como sinapsis inmunológica (Dustin *et al.*, 2000; Davis, 2002). La formación eficiente de la sinapsis inmunológica es crítica para la amplificación de la señal del TCR y la subsiguiente activación de la célula T (Dustin *et al.*, 2000). La organización peculiar de los rafts restringe el acceso de proteínas, de tal manera que sólo aquéllas ancladas a glicolípidos de la membrana, con dominios transmembrana o proteínas citosólicas aciladas, pueden residir en los rafts. La mayoría de las proteínas integrales de membrana están excluidas de los rafts lipídicos. En células en reposo, los rafts lipídicos son ricos en quinasas de la familia Src (p56lck y p59fyn) y de la proteína adaptadora de membrana LAT (*linker for activation of T cells*) (Zhang *et al.*, 1998). El correceptor CD4 es detectado en fracciones de rafts en una menor proporción y CD3 ζ está también asociado parcialmente a los rafts (Montixi *et al.*, 1998). Cuando se produce la unión del TCR al MHC se produce una rápida activación de las quinasas de la familia Src y una subsiguiente acumulación en los rafts de los sustratos fosforilados (Langlet *et al.*, 2000; Leo *et al.*, 2001), incluyendo todas las moléculas CD3 ζ fosforiladas (Kosugi *et al.*, 1999), las formas activadas de la tirosina quinasa ZAP70, la fosfolipasa PLC γ 1, la fosfoinosítido-3-quinasa (PI3K), Vav y LAT .

LAT fosforilada se une a varias moléculas que contienen el dominio SH2, a las proteínas adaptadoras Grb2 y Gads, y a través de ellas, indirectamente, a otras moléculas de señalización como Sos1, SLP-76, Vav e Itk (*inhibitor tyrosine kinase*) y a PLC γ 1, la cual seguidamente actúa sobre un componente de los rafts, el fosfatidilinositol-4, 5- bifosfato (PIP2). Uno de los productos, el diacilglicerol (DAG) se separa de los rafts para actuar sobre la proteína quinasa C (PKC). Otro producto es el PIP3 que activa la PI3K (Tanimura *et al.*, 2003).

Tras el ensamblaje de la maquinaria de señalización, el citoesqueleto es reorganizado y las cascadas Ras/MAPK y PLC γ 1 son activadas dentro de los rafts y producen las señales para activar el linfocito T.

La actividad de las quinasas de tirosina de la familia Src es esencial para la activación del linfocito T. Esta actividad está regulada negativamente por Csk (*C-terminal Src kinase*), una tirosina quinasa que fosforila a las quinasas de la familia Src en un residuo inhibitorio de tirosina del carbono terminal. Csk es reclutada a los rafts tras la interacción entre su dominio SH2 y el dominio citoplasmático de PAG/Cbp, una proteína adaptadora de membrana presente en los rafts. Esta fosforilación es probablemente mediada por las quinasas de la familia Src.

La tirosina fosfatasa rica en prolina (PEP) se asocia a Csk y desfosforila p56lck y p59fyn (Cloutier *et al.*, 1999) y PAG/Cbp.

La proteína CD45 es una tirosina fosfatasa integral de membrana que está excluida de los rafts, aunque algunos grupos sugieren que temporalmente se colocaliza con LAT en los rafts (Edmonds *et al.*, 2002). CD45 regula positiva y negativamente p56lck en el borde de los rafts por desfosforilación de los sitios del carboxilo terminal y de autofosforilación (Rodgers *et al.*, 1996). Otros posibles sustratos de CD45 son LAT, CD3 ζ y otras subunidades del complejo CD3.

Las tirosinas fosfatasas con dominios SH2, SHP-1 y SHP-2 (*SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase*) también participan en la desfosforilación de sustratos reclutados a los rafts lipídicos por interacción con las proteínas adaptadoras de membrana (Su *et al.*, 2001).

3.2.5. Moléculas coestimuladoras y rafts lipídicos

El linfocito T necesita dos señales para su activación, una procedente del complejo TCR/CD3 y otra generada por moléculas coestimuladoras (Bromley *et al.*, 2001).

CD28 funciona como una de las más importantes moléculas coestimuladoras de la célula T y se colocaliza con el TCR. Se requiere la reorganización del citoesqueleto de actina para producirse el contacto entre moléculas y la posterior activación del linfocito T (Valitutti *et al.*, 1995). Para promover la traslocación de los rafts se necesita la coestimulación a través de CD28 que induce el movimiento de receptores unidos al citoesqueleto de actina a la zona TCR/MHC (Wulfing *et al.*, 1999). Los ligandos de CD28 son B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86). CD28 produce un aumento de la fosforilación de p56lck, p59fyn, Itk y de su propio dominio intracelular. Esto le permite unirse al dominio SH2 de la PI3K dando lugar a un aumento de su actividad. También activa la vía de transporte de moléculas de superficie al lugar de la sinapsis, influye en la transcripción nuclear directamente y bloquea la salida de NFAT del núcleo, aumentando así el efecto de esta familia de factores de transcripción (Davis *et al.*, 2003).

CD2 es otra molécula coestimuladora que promueve la interacción física de la célula T con la APC por la unión a su ligando CD58 (Yang *et al.*, 2001). La traslocación de CD2 a los rafts reorganiza la membrana permitiendo al TCR unirse al MHC/péptido, dando lugar a una estimulación sinérgica del TCR y de CD2. CD2 participa en diferentes vías de señalización, aumenta la respuesta a IL-12 por parte de las células T activadas, revierte la anergia de células T, aumenta la adhesión celular y la respuesta de la célula T tras el reconocimiento antigénico. La estimulación simultánea de dos epítomos de CD2 por anticuerpos monoclonales lleva a la proliferación y secreción de citoquinas, como IL-2, por las células T en ausencia de antígeno y por las células presentadoras de antígeno.

La activación de CD2 y del TCR/CD3 comparte una serie de eventos como la activación de lck, la movilización de calcio y la fosforilación de los mismos patrones de proteínas. Sin embargo, también se han

encontrado algunas diferencias entre las dos vías de activación. La implicación de CD3 ζ y de ZAP-70 en la señal mediada por CD2 es controvertida. Posiblemente, CD2 activa vías dependientes e independientes de ZAP-70 y una de estas vías de activación podría converger con la de CD3 en la activación de ZAP-70 o en eventos anteriores (Meinl *et al.*, 2000).

Otros receptores de reconocimiento multicadena como el receptor para antígeno de la célula B y el receptor de alta afinidad de la IgE de mastocitos (Fc ϵ RI) parece que también usan los rafts lipídicos para la señalización (Langlet *et al.*, 2000; Cherukuri *et al.*, 2001).

Alteraciones de la composición y la dinámica de los rafts lipídicos contribuyen a una respuesta anormal. Por ejemplo, en ciertas enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico, las células T poseen más cantidad de rafts lipídicos y, a diferencia de células T de controles sanos, los rafts lipídicos incluyen la cadena FcR γ y la quinasa Syk activada (Krishnan *et al.*, 2004). La localización de la tirosina fosfatasa CD45 en los rafts lipídicos está también incrementada en las células T de estos pacientes (Jury *et al.*, 2004).

3.2.6. La interleuquina 2 y su receptor

La interleuquina 2 (IL-2) fue descubierta en 1975 como promotor de la proliferación de los linfocitos T derivados de médula ósea (Morgan *et al.*, 1976). Es una glicoproteína monomérica con un tamaño molecular de 15KDa. Ejerce su acción sobre muchos tipos celulares pero su acción más importante es sobre los linfocitos T. Una de las acciones más rápidas tras la activación de la célula T por su TCR es la síntesis *de novo* de la IL-2 que actúa sobre su receptor de alta afinidad y produce una rápida y selectiva expansión clonal de la población de células T efectoras activadas por antígeno. Promueve la proliferación tanto de células T CD4 $^{+}$ como de células T CD8 $^{+}$, el metabolismo celular y la glicolisis, pero puede producir una disminución de la respuesta inmune para prevenir la autoinmunidad cuando hay una ausencia continuada de la estimulación antigénica, para ello utiliza la vía proapoptótica a través de la expresión de Fas ligando en las células T activadas.

IL-2 es secretada principalmente por linfocitos T CD4 $^{+}$ (Th1) pero también puede ser producida por CD8 $^{+}$ tras estimulación por su receptor.

La expresión del gen de la IL-2 está controlada por los factores de transcripción NFAT y NF κ B. Junto con todos estos factores de transcripción actúa constitutivamente el factor de transcripción Oct1 (*Octamer binding protein*). Para que se produzca la secreción de IL-2 se requiere, además de la acción vía TCR, la acción de moléculas coestimuladoras tales como CD28 y algunas otras. La señal inhibitoria viene mediada por el receptor inhibitorio CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4*) el cual antagoniza la acción de CD28 uniéndose a B7.1 y B7.2 en la célula presentadora de antígeno.

El receptor de la interleuquina 2 (IL-2R) es complejo. La IL-2 se puede unir a su receptor con baja, intermedia o alta afinidad. Este receptor está compuesto por tres subunidades: IL-2R α (CD25 o Tac), constituye el receptor de baja afinidad y no contribuye a la transducción de señales, IL-2R β (p75) e IL-2R γ (γ c o p65). Éstas últimas pertenecen a la superfamilia del receptor de citoquinas tipo I y son necesarias para la señalización. Por sí solos IL-2R β e IL-2R γ no unen cantidades detectables de IL-2, pero cuando forman un complejo constituyen la afinidad intermedia, capaz de producir señalización (Gaffen, 2001; Gaffen *et al.*, 2004). La alta afinidad se produce cuando se forma el complejo trimérico por oligomerización tras la unión del ligando. La subunidad IL-2R α está localizada en los rafts lipídicos mientras que IL-2R β e IL-2R γ están localizadas en la fracción soluble. Estas localizaciones regulan la oligomerización (Marmor *et al.*, 2001).

La señalización del receptor de la IL-2 está mediada por tirosina quinasas siendo la subunidad IL-2R β la principal subunidad encargada de esta señalización. Cuando se produce la dimerización, JAK-1 y JAK-3 (*Janus kinases*) se fosforilan en sus residuos de tirosina y fosforilan la cola citoplasmática de la subunidad IL-2R β que contiene 6 dominios tirosina. Esta fosforilación da lugar a la activación de varias vías:

1) Tras la fosforilación de uno de los dominios tirosina, se une la proteína adaptadora Shc que reconoce dominios de unión a fosfotirosina (PTB, *phophotyrosine-binding domains*). Shc conecta con la vía MAPK por el reclutamiento de la proteína adaptadora Grb2 y el factor SOS, que inician la vía Ras-Raf-MAPK. La vía MAPK activa Bcl-2 y Bcl-xL, mediadores antiapoptóticos, y también regula la fosfatasa 1 α que a su vez regula el mediador pro-apoptótico Bad.

2) La subunidad IL-2R β también activa la PI3K la cual da lugar a una respuesta proliferativa y antiapoptótica mediante la regulación de la actividad de E2F, factor de transcripción que regula una variedad de genes envueltos en la progresión del ciclo celular.

La PI3K regula la actividad de p70S6kinase el cual fosforila la subunidad ribosomal 40S que tiene un papel importante en la regulación de la división celular, y promueve la proliferación activando Akt (proteína quinasa B, PKB), que también regula las proteínas de la familia Bcl-2 tales como Bad.

3) Por otro lado STAT es reclutado por sus dominios SH2 y es fosforilado por las JAKs dando lugar a su dimerización. Estos dímeros migran al núcleo donde activan genes

STAT-5 es necesitado para el desarrollo de células NK y de linfocitos intraepiteliales, y actúa también sobre los genes del IL-2R α , FasL, cFLIP y CBP/p300.

La activación de la vía JAK-STAT tiene corta vida existiendo un control negativo mediante la activación de las proteínas de la familia SOCS (*suppressors of cytokine signaling*), principalmente CIS1 que es inducido por STAT o SOCS1. Se han implicado otras moléculas como las tirosina quinasas de la familia Src, p56lyn y p59fyn, la tirosina quinasa Pyk2, STAM (*signal transducing adaptor molecule*), la tirosina fosfatasa SHP-1, el factor de transcripción NF κ B y las moléculas adaptadoras IRS-1 e IRS-2 (*insulin receptor substrate 1*).

Los niveles de IL-2 en suero dan una información muy limitada acerca del estado del paciente, aunque en cáncer gástrico y de pulmón se han relacionado sus niveles con la progresión del tumor (Fornes *et al.*, 2001; Orditura, M. *et al.*, 2000); ya que pacientes con peor pronóstico tienen altos niveles de esta citoquina. Por otra parte, se ha correlacionado la alta expresión de IL-2R α (CD25) con un peor pronóstico en diferentes tipos de tumores (Kuhn *et al.*, 2005)

La IL-2 se ha usado como terapia en numerosos modelos animales de cáncer (melanoma, cáncer de pecho, de ovario, colorrectal, vejiga, estómago, hígado, vejiga, próstata, cabeza y cuello, neuroblastoma y carcinoma celular) (Roth *et al.*, 1994). Aunque no se conoce cómo trabaja en la terapia antitumoral, ha sido aprobada por la FDA (*Food and Drug Administration*) para el tratamiento de carcinoma renal y el melanoma. Se cree que promueve la respuesta mediada por los CTL (Glaspy, 2002).

4. HERPESVIRUS SAIMIRI

Herpesvirus saimiri (*Saimiriine Herpesvirus-2*) (HVS), es un herpesvirus γ -2 (rhadinovirus) (su raíz latina *Herpein* significa deslizarse, por la capacidad de pasar de infección crónica a latente y recurrente). Su hospedador natural es el mono ardilla (*Saimiri sciureus*), al que no causa ningún efecto patogénico. Sin embargo, en primates del nuevo mundo tiene un elevado potencial oncogénico, causando enfermedades linfoproliferativas (Biesinger *et al.*, 1990) y es capaz de transformar linfocitos T humanos y no humanos permitiendo su continuo crecimiento en ausencia de estimulación. Las células T transformadas con HVS mantienen intactas muchas características de los linfocitos T, tales como la sensibilidad a IL-2, las características fenotípicas, respuesta a mitógenos y otros estímulos extracelulares y la habilidad para reconocer los antígenos correspondientes. Como resultado HVS es usado ampliamente en la inmunobiología para la inmortalización de células T difíciles de obtener y/o para mantener estas células T como útiles modelos experimentales.

El genoma del virus es una doble hebra de ADN lineal, y persiste, exclusivamente, en episomas en las células transformadas y sólo se expresa un número limitado de genes virales. Basándose en la transformación *in vivo* e *in vitro* las cepas de HVS se han clasificado en tres subgrupos: A, B y C. Sólo las cepas del subgrupo C son capaces de transformar linfocitos T humanos. En los cultivos celulares obtenidos no se detecta liberación de partículas virales al medio (Biesinger *et al.*, 1992).

Tanto la proteína Tip (*tyrosine kinase-interacting protein*) como la stpC (*saimiri transformation-associated protein of subgroup C virus strains*) son esenciales para la transformación de células T por HVS (Duboise *et al.*, 1998). stpC se une a Ras y eleva la actividad de esta proteína y de Erk. También es capaz de activar el factor de transcripción NF κ B utilizando la vía de señalización TRAF-NIK-IKK. Por otro lado, Tip se une a Lck por la presencia de un motivo SH3 rico en prolinas. Tip también parece estar envuelto en la activación de los factores

de transcripción STAT1, STAT3 y NFAT. A pesar de conocer las proteínas virales expresadas por HVS en las células transformadas no se conoce completamente cómo se produce esta transformación, ya que no se produce por resistencia a la apoptosis sino por la utilización de las vías de activación normales (Kraft *et al.*, 1998).

Este modelo de transformación permite transformar linfocitos T tanto $\alpha\beta$ como $\gamma\delta$ y CD4 o CD8 y mantienen su TCR en superficie tras la infección (Meinl *et al.*, 1995). El receptor no se ha identificado, es muy probable que sea una molécula de superficie altamente conservada y con alta expresión celular.

Esta metodología se ha utilizado para la obtención de líneas de linfocitos T tanto de sangre periférica y de tejidos como de diferentes patologías como el cáncer gástrico, la enfermedad inflamatoria intestinal la ataxia telangiectasia, la inmunodeficiencia común variable o el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Tsygankov, 2005).

4.1. Características fenotípicas y funcionales de las líneas celulares T-HVS

Los linfocitos T transformados tienen un fenotipo de células CD4+ o CD8+ maduras y expresan marcadores característicos como CD2, CD3, CD5, CD7, CD11a/CD18 (LFA1), CD54 (ICAM-1) o CD58 (LFA-3) (Saha *et al.*, 1997). Si se trata de transformación a partir de precursores intratímicos expresarán CD34+ y serán dobles positivos CD4+CD8+ (Pacheco-Castro *et al.*, 1996). También expresan marcadores de activación como CD25, CD26, CD30, CD45RO, CD69, CD80, CD86, CD154 y HLA-DR. Aunque desaparecen otras moléculas de membrana como CD28 (Weber *et al.*, 1993) y aparece una molécula típica de granulocitos CD66a. La transformación de linfocitos T con HVS mantiene la presencia de casi todo el repertorio de regiones V β originales (Weber *et al.*, 1993).

Desde el punto de vista funcional, las líneas de linfocitos T-HVS mantienen intactas las señales por estimulación vía el complejo TCR/CD3, otros receptores de superficie (el receptor de IL-2), estímulos transmembranales (ésteres de forbol, PMA) o ionóforos de calcio, tanto las de activación inmediata (movilización de calcio intracelular o los patrones de fosforilación tras estimulación) como las de activación temprana/tardía como la inducción de proteínas de activación, inducción de citoquinas, citotoxicidad, respuesta proliferativa o apoptosis. No mantienen la actividad tirosina quinasa constitutiva p53/p56lyn. HVS desvía las células transformadas hacia un perfil de secreción de citoquinas de tipo Th1.

El crecimiento estable de las líneas de linfocitos T-HVS se basa en la activación mutua a través de la interacción de CD2 con su ligando CD58 y no necesita estimulación antigénica periódica, aunque depende de la adición de la IL-2 exógena.

4.2. El modelo HVS aplicado al estudio del cáncer gástrico

La transformación de células T con el *Herpesvirus saimiri* ha permitido la obtención de líneas celulares estables de pacientes con adenocarcinoma gástrico y de controles sanos, tanto de sangre periférica como de mucosa. Estas líneas permiten llevar a cabo estudios más amplios, imposibles de realizar con las células obtenidas a partir de 10 ml de sangre y, principalmente, a partir de muestras de tejido de pequeño tamaño, como las biopsias. Además, las líneas obtenidas son una fuente prácticamente inagotable de células con las que realizar estudios funcionales, genéticos o bioquímicos, que pueden llevar a un mayor entendimiento del papel de estas células en el adenocarcinoma gástrico, evitando el problema de la difícil obtención de muestras tisulares de pacientes y de controles, o la continua extracción de sangre a los pacientes. Además estas líneas permiten aislar a las células del efecto de cualquier factor o fármaco presente en el organismo, así como de cualquier efecto procedente de otra población celular.

Los linfocitos T transformados con HVS, como se muestra en este trabajo, son dependientes de IL-2 pero crecen independientes de antígeno y mitógeno. Tienen una normal respuesta funcional a mitógenos de membrana (anti-TCR-CD3) o transmembrana (ionóforos de calcio). Esta metodología ha permitido el cultivo de líneas de linfocitos T procedentes de diferentes tipos de cáncer así como de muestras que contienen poca cantidad de células como las que provienen de tumores sólidos o epitelio intestinal (Tsygankov, 2005).

La infección de células T de sangre periférica o de tejido de pacientes con cáncer gástrico o de controles sanos se lleva a cabo utilizando la cepa del subgrupo C, C488 que genera *in vitro* líneas celulares inmortales de fenotipo CD4 o CD8 de crecimiento continuo y estable. Estas líneas celulares no producen partículas virales y tienen un crecimiento independiente de estimulación antigénica pero son dependientes de la adición de IL-2 y de contactos CD2:CD58. El HVS infecta todas las células del organismo pero sólo transforma linfocitos T. Debido a esta característica, sólo se podrá considerar el cultivo puro tras tres meses, cuando el resto de poblaciones celulares hayan desaparecido.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es analizar el papel del linfocito T en el cáncer gástrico. Para ello se utiliza un modelo de estudio mediante la transformación de linfocitos T de pacientes con adenocarcinoma gástrico procedentes de sangre periférica o de mucosa, con el virus linfotrópico *Herpesvirus saimiri* (HVS). Las líneas celulares de crecimiento estable permiten: 1) realizar estudios más amplios y 2) aislar las células del efecto de cualquier factor o fármaco presente en el organismo, así como de otra población celular y 3) eliminan el problema de la escasez de muestra y 4) la difícil obtención de linfocitos T de mucosa de estos pacientes.

Los objetivos concretos del trabajo son:

1.-Estudio comparativo de los parámetros clínicos y el perfil inmunológico de pacientes con adenocarcinoma gástrico, a nivel fenotípico y funcional.

2.-Obtención y cultivo de líneas procedentes de linfocitos T de sangre periférica y de mucosa de pacientes con adenocarcinoma gástrico y de individuos control obtenidas tras inmortalización con *Herpesvirus saimiri*.

3.-Realización de estudios de expresión de diferentes proteínas importantes en la transducción de señales del linfocito T utilizando líneas de linfocitos T de sangre periférica y de mucosa de pacientes con adenocarcinoma gástrico.

4.-Estudios funcionales de linfocitos T de sangre periférica y de líneas de linfocitos T de sangre periférica y de mucosa de pacientes con adenocarcinoma gástrico.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. CÉLULAS: ORIGEN Y CULTIVO

Este trabajo ha sido realizado con muestras de 48 pacientes con adenocarcinoma gástrico procedentes del Servicio de Cirugía General y Digestivo del Hospital Universitario Príncipe de Asturias (HUPA) de Alcalá de Henares clasificados según el sistema de clasificación de la *Japanese Society for Research of Gastric Cancer* (JRSGC) (Japanese Gastric Cancer Association. Japanese classification of Gastric adenocarcinoma. Gastric Cancer. 1998) o de la *International Union Against Cancer* (U.I.C.C., Sobin LH *et al.* International Union against Cancer 1997). De éstos, 18 son mujeres, de 37 a 90 años, y 30 hombres, de 45 a 87 años. Se excluyeron los pacientes con tumores de estirpe linfoide o estromal, adenocarcinoma de unión esofagogástrica y adenocarcinomas no resecables o inoperables.

Las muestras de sangre o de mucosa procedentes de estos pacientes se destinaron a la realización de estudios fenotípicos y funcionales con células mononucleares de sangre periférica y a la obtención de líneas celulares T-HVS en el primer caso, o sólo a la obtención de líneas en el segundo.

Como control para los ensayos realizados a partir de muestras de sangre se utilizó una población de adultos voluntarios sanos (n=106). En cuanto a los estudios de tejido, se han utilizado como control muestras procedentes de biopsias de intestino delgado de donantes sanos. El hecho de que las líneas de pacientes sean de origen gástrico mientras que las de controles, de origen intestinal no debería limitar la validez del trabajo. Los linfocitos de mucosa de ambos orígenes anatómicos son razonablemente idénticos y no hay diferencias aportadas por la literatura en cuanto a sus características fenotípicas y funcionales (James, 1994).

En la tabla III.1 se detallan los pacientes con sus características clínicas.

Tabla III.1. Lista de los pacientes con adenocarcinoma gástrico con los que se llevaron a cabo los estudios de sangre o tejido

FECHA DE NACIMIENTO	SEXO	PATOLOGÍA	FECHA DE RECEPCIÓN DE LA MUESTRA	SITUACIÓN	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS
1951	H	Adenocarcinoma Difuso Estadio IIIB	19/06/97	VIVO	Gastrectomía total Curabilidad B Resección R0
1952	H	Adenocarcinoma Difuso Estadio IA	9/07/97	VIVO	Gastrectomía total Resección R0
1930	H	Adenocarcinoma Intestinal Estadio IIIA	18/07/97	FALLECIDO MORTALIDAD OPERATORIA	Gastrectomía total Curabilidad B Resección R0
1920	H	Adenocarcinoma Difuso T4N2HOPO. Estadio IV	2/3/00	FALLECIDO MORTALIDAD OPERATORIA	Gastrectomía subtotal Curabilidad C Resección R2
1925	H	Adenocarcinoma Intestinal Estadio IV	30/3/00	VIVO	Gastrectomía total Curabilidad C Resección R1
1916	H	Adenocarcinoma Intestinal Estadio IA	4/4/00	VIVO	Gastrectomía subtotal Curabilidad A Resección R0
1946	H	Adenocarcinoma gástrico intestinal Estadio II	5/4/00	VIVO	Gastrectomía total Resección R0 Curabilidad A
1933	H	Adenocarcinoma gástrico intestinal Estadio II	28/4/00	VIVO	Gastrectomía total Resección R0 Curabilidad A
1944	H	Adenocarcinoma Difuso Estadio IV	1/06/00	VIVO	Gastrectomía total Resección R2 Curabilidad C
1948	H	Adenocarcinoma Difuso Estadio IA	30/6/00	VIVO	Gastrectomía total Resección R0 Curabilidad A
1936	M	Adenocarcinoma Intestinal Estadio IIIB	13/7/00	VIVO	Gastrectomía total Resección R2 Curabilidad C
1917	M	Adenocarcinoma cardías	28/07/00	VIVO	
1931	M	Adenocarcinoma gástrico Difuso Estadio IV	1/08/00	VIVO	Gastrectomía total Resección R2 Curabilidad C
1938	H	Adenocarcinoma Intestinal Estadio IV	4/08/00	FALLECIDO 14/08/00	Gastrectomía. total Resección R1 Curabilidad C
1944	M	Adenocarcinoma Difuso Estadio IIIA	31/08/00	VIVO	Gastrectomía total Resección R0 Curabilidad B

Tabla III.1 (Continuación I)

1925	H	Adenocarcinoma Intestinal Estadio IB	1/09/00	VIVO	Gastrectomía total Resección R0 Curabilidad A
1933	H	Adenocarcinoma gástrico difuso Estadio IA	14/12/00	VIVO	Gastrectomía. total Resección R0 Curabilidad A
1939	M	Adenocarcinoma Intestinal Estadio IB	4/02/01	FALLECIDO MORTALIDAD OPERATORIA	Gastrectomía subtotal Resección R0 Curabilidad A
1927	M	Adenocarcinoma intestinal Estadio IB	28/02/01	VIVO	Gastrectomía subtotal resección R0 Curabilidad A
1931	H	Adenocarcinoma Intestinal Estadio IIIB	28/03/01	VIVO	Gastrectomía subtotal resección R1 Curabilidad C
1930	H	Adenocarcinoma gástrico intestinal Estadio IIIB	2/07/01	VIVO	Gastrectomía subtotal resección R1 Curabilidad C
1947	H	Adenocarcinoma. Intestinal Estadio I	30/10/01	VIVO	Gastrectomía subtotal Resección R0 Curabilidad A
1921	H	Adenocarcinoma Difuso Estadio IV	5/02/02	FALLECIDO AGOSTO 2002	Gastrectomía subtotal resección R2 Curabilidad C
1912	M	Adenocarcinoma Intestinal Estadio II	6/02/02	VIVO	Gastrectomía subtotal resección R0 Curabilidad A
1934	M	Adenocarcinoma. No clasificable Estadio IV	27/02/02	FALLECIDA 30/10/2002	Tumor no resecable
1930	H	Adenocarcinoma gástrico intestinal Estadio IIIA	20/03/02	VIVO	Gastrectomía subtotal resección R0 Curabilidad B
1931	H	Adenocarcinoma gástrico no clasificable Estadio IV	9/04/02	VIVO	Irresecable
1932	M	Adenocarcinoma gástrico Estadio IV	12/04/02	VIVO	Gastrectomía subtotal Resección R2 Curabilidad C
1926	H	Adenocarcinoma gástrico intestinal Estadio IIIA	17/04/02	VIVO	Gastrectomía subtotal Resección R0 Curabilidad B
1964	M	Adenocarcinoma Difuso Estadio I	23/04/02	VIVO	Gastrectomía total resección R0 Curabilidad A
1939	M	Adenocarcinoma Difuso Estadio IV	17/05/02	FALLECIDA 24/01/2003	Gastrectomía total Resección R2 Curabilidad C
1961	M	Adenocarcinoma Intestinal Estadio IV	20/05/02	VIVO	Gastrectomía total resección R2 Curabilidad C

Tabla III.1 (Fin)

1923	M	Adenocarcinoma gástrico Estadio III	29/05/02	VIVO	Gastrectomía subtotal Resección R0 Curabilidad A
1954	M	Adenocarcinoma gástrico Estadio II	25/03/04	VIVO	Gastrectomía total Resección R0 Curabilidad A
1925	M	Adenocarcinoma gástrico Estadio IV	17/04/04	FALLECIDO	Laparotomía exploradora
1961	M	Adenocarcinoma gástrico Estadio I	27/04/04	VIVO	Gastrectomía total Resección R0 Curabilidad A
1926	H	Adenocarcinoma gástrico Estadio III	04/05/04	VIVO	Gastrectomía total Resección R0 Curabilidad B
1913	H	Adenocarcinoma gástrico Estadio IV	04/05/04	FALLECIDO	Gastrectomía subtotal Resección R2 Curabilidad C
1945	H	Adenocarcinoma gástrico Estadio IV	04/05/04	VIVO	Gastrectomía total Resección R1 Curabilidad B
1922	H	Adenocarcinoma gástrico	11/05/04	MORTALIDAD OPERATORIA 13/05/2004	Irresecable
1944	M	Adenocarcinoma gástrico Estadio IV	01/06/04	VIVO	Gastrectomía total Resección R2 Curabilidad C
1947	H	Adenocarcinoma gástrico	06/07/04	FALLECIDO 21/02/2005	Irresecable
1934	H	Adenocarcinoma gástrico Estadio IV T4N3H0P1	21/10/04	VIVO	Gastrectomía total Resección R2 Curabilidad C
1937	H	Adenocarcinoma gástrico intestinal Estadio IIIB	29/10/04	VIVO	Gastrectomía total Curabilidad B Resección R0
1948	H	Adenocarcinoma gástrico difuso Estadio II	03/11/04	VIVO	Gastrectomía total Curabilidad A Resección R0
1947	H	Cáncer Gástrico intestinal Estadio IV	17/11/04	VIVO	Gastrectomía total Curabilidad C Resección R1
1926	M	Cáncer Gástrico	15/09/05	VIVO	
1940	H	Cáncer Gástrico	28/09/05	VIVO	

H: Hombre
M: Mujer

1.1. Obtención de células

1.1.1. Células mononucleares de sangre periférica

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) fueron aisladas mediante centrifugación por gradiente de densidad utilizando Lymphoprep (Axis Shield PoC AS, Oslo, Noruega). La sangre diluida 1:1 con PBS (Phosphate buffered saline, Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Reino Unido) se añade sobre el lymphoprep en proporción 2:1. Tras centrifugación a 900g durante 45 minutos a temperatura ambiente se recoge la “nube” que contiene las CMSP. Se lavan las células dos veces con PBS centrifugando 10 minutos a 300g. Finalmente, se resuspenden las células en el medio adecuado para su cultivo o para el experimento que se desee realizar. Una parte de las células así obtenidas se utiliza para realizar el estudio fenotípico y funcional y otra parte se destina a la obtención de líneas estables T-HVS con las que realizar los estudios posteriores.

1.1.2. Linfocitos T de sangre periférica

Los linfocitos T de sangre periférica fueron aislados utilizando un cocktail de anticuerpos (RosetteSep, StemCell technologies, Cleveland, Ohio, Estados Unidos) para enriquecer la sangre con estas células. Para ello se añaden 30µl de este cocktail de anticuerpos por cada ml de sangre de la muestra, una vez mezclado se incubaba 20 minutos a temperatura ambiente. Luego se diluye la sangre 1:1 con PBS y se procede al aislamiento con lymphoprep siguiendo el protocolo previamente descrito y así se consiguen recoger los linfocitos T de la “nube” ya que el resto de CMSP han pasado a formar parte de la fase inferior tras la incubación con el cocktail de anticuerpos.

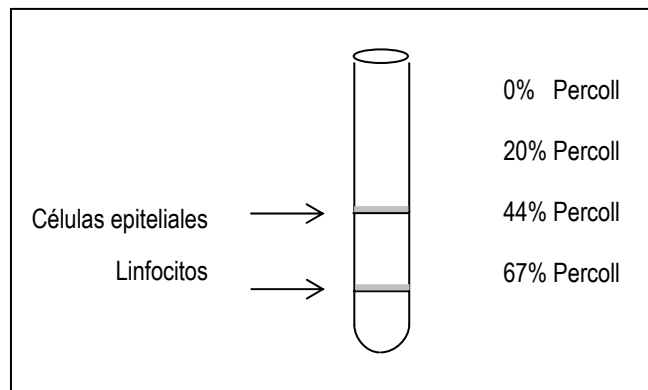
1.1.3. Células mononucleares de lamina propia intestinal

El procesamiento de biopsias de estómago o de intestino es destinado únicamente a la obtención de líneas T-HVS debido a la dificultad de conseguir suficiente cantidad de células frescas para realizar los diferentes estudios previos a la transformación. Primeramente se digieren con solución que contiene 1,2U/ml de dispasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) y 50U/ml de colagenasa (Sigma) en medio Hank's (Gibco) tamponado con bicarbonato sódico (NaHCO₃, Panreac, Castellar del Vallès, Barcelona, España, a pH=7,2) durante 90 minutos a 37° C en rotación. Pasado este tiempo se filtra por un cedazo de 30 µm y se centrifuga a 300 g durante 10 min. La suspensión obtenida se somete a un gradiente de Percoll (Sigma-Aldrich) (0 %, 20 %, 44 % y 67 %) en medio Hank's centrifugando a 500 g durante 35 minutos a 4°C. Los linfocitos se

separan en una interfase bien definida entre el 44 % y el 67 %, mientras que las células epiteliales migran entre el 20 % y 44 % (Figura 6).

Los linfocitos se utilizarán para su transformación con el virus HVS. Una vez obtenidas líneas estables, se utilizarán para llevar a cabo los diferentes ensayos del presente trabajo.

Figura III.1.- Gradiente de Percoll



1.2. Obtención y cultivo de líneas celulares T-HVS

Las células aisladas (de sangre o de mucosa) se resuspenden a una concentración de $1-3 \times 10^6$ células/ml en una mezcla de dos medios de cultivo en proporción 1:1 RPMI 1640 (Gibco BRL) y Panserin 401 (Pan, Hamburgo, Alemania), con 10% FCS (Bio Whittaker, Verviers, Bélgica), 1% antibiótico (mezcla de gentamicina 4 mg/ml, cloxacilina 12 mg/ml, ampicilina 12.5 mg/ml y fungizona 25 μ g/ml) y 1% L-glutamina (Gibco BRL), suplementados con 100 U/ml de IL-2 humana recombinante (rhIL-2, TECIN, cedida por Hoffmann-La Roche, Nutley, Nueva Jersey, Estados Unidos).

Los cultivos se exponen una vez a dosis infecciosas de HVS, cepa C-488, en presencia de rhIL-2 y PHA 2 μ g/ml. Los cultivos control se tratan de manera idéntica, omitiendo el HVS.

Después de la infección, las células se suplementan regularmente con medio completo, incluyendo 50 U/ml de rhIL-2. La muerte de los cultivos control frente al crecimiento sostenido y la morfología linfoblastoide, sugiere la inmortalización de los cultivos. Tres meses después de la inoculación del HVS, las líneas celulares están establecidas, con una morfología y un fenotipo de superficie estables (Biesinger B *et al.* Proc Natl Acad Sci 1992).

A partir de biopsias de estómago de pacientes con adenocarcinoma gástrico se han obtenido 6 líneas T-HVS, de ellas 5 líneas T-HVS CD4+ y 1 líneas T-HVS CD8+. Se han inmortalizado células T de mucosa de intestino delgado de 2 controles sanos y se obtuvieron dos líneas, una CD4+ y otra CD8+.

Por otra parte, a partir de sangre periférica de pacientes se han obtenido 7 líneas T-HVS, todas ellas CD8+. Inmortalizando células T de sangre periférica de controles sanos se obtuvieron 8 líneas, una CD4+ y 7 CD8+.

2. EVALUACIÓN FENOTÍPICA

2.1. Evaluación de marcadores de superficie por citometría de flujo

Para realizar el estudio de marcadores de superficie se incuban al menos 10^5 células, recién extraídas de sangre o, bien, procedentes de las líneas celulares T-HVS en cultivo, y tras dos lavados por centrifugación a 300g durante 5 minutos con PBS con 0,4% de FCS y 1 g/l de azida sódica (Sigma-Aldrich) se incuban durante 30 minutos a 4°C usando los diferentes anticuerpos monoclonales. Todos los anticuerpos estaban marcados directamente con Isocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) o cianina 5R ficoeritrina (Cy5-PE). Se usó como control negativo un anticuerpo monoclonal irrelevante (Opticlone, Immunotech, Fullerton, California, Estados Unidos) conteniendo una mezcla de IgG1-FITC, IgG1-PE y IgG1Cy5-PE. Las células fueron lavadas dos veces con PBS con 0,4% de FCS y 1g/l de azida sódica, y se analizaron en un citómetro de flujo Coulter EPICS Elite ESP (Coulter, Luton, Reino Unido). Un mínimo de 5.000 células fue analizado por muestra, excluyendo las células muertas.

La tabla III.2 recoge un listado de los anticuerpos monoclonales utilizados en los experimentos de citometría de flujo de este trabajo.

Tabla III.2. Anticuerpos utilizados en los diferentes experimentos

ANTICUERPO	CONJUGADO	ISOTIPO/ ORIGEN	CLON	CASA COMERCIAL	EXPERIMENTOS	DILUCIÓN
α -CD2	FITC	IgG1/ratón	T11	Coulter Miami, Florida, EEUU	CMF	1:40
α -CD3	FITC	IgG1/ratón	UCTH1	Immunotech Marsella Francia	CMF, IFI	1:40
α -CD3	R-PE	IgG1/ratón	UCHT1	Dako Glostrup, Dinamarca	CMF	1:40
α -CD3 ϵ	----	IgG1/cabra	UCHT1	Santa Cruz Biotechnology California, EEUU	WB	1:2000

Tabla III.2 (Continuación)

α -CD4	PE	IgG1/ratón	13B8.2	Immunotech	CMF	1:40
α -CD3 ζ	----	IgG2a/ratón	G3	Serotec	CMF, IFI	1:40
α -CD3 ζ	----	IgG/ratón	6B10.2	Santa Cruz Biotechnology	WB	1:1000
α -CD4	R-PE	IgG1/ratón	MT310	Dako	CMF	1:40
α -CD8	Cy5-PE	IgG1/ratón	B9.11	Immunotech	CMF	1:40
α -CD8	FITC	IgG1/ratón	SK1	Becton Dickinson San José, California, EEUU	CMF	1:40
α - CD4/CD8/CD3	FITC / PE / Cy5-PE	IgG1/ratón	13B.8 / B9.11 / UCHT1	Immunotech	CMF	1:40
α -CD14	R-PE	IgG1/ratón	TÜK4	Dako	CMF	1:40
α -CD16	PE	IgG1/ratón	Leu-11a- NKP15	Becton Dickinson	CMF	1:40
α -CD16	PE	IgG2a/ratón	B-E16	Diaclone SAS Besancon, Francia	CMF	1:40
α -CD19	PE	IgG1/ratón	SJ25-C1	Caltag Laboratories Burlingame, California, EEUU	CMF	1:40
α -CD19	PE	IgG1/ratón	4G7	Becton Dickinson	CMF	1:40
α -CD25	PE	IgG1/ratón	CD25- 3G10	Caltag Laboratories	CMF	1:40
α -CD28	PE	IgG1/ratón	IOT28	Immunotech	CMF	1:40
α -CD45	PE-Cy5	IgG1/ratón	J33	Immunotech	CMF	1:40
α -CD45	FITC	IgG1/ratón	T29/33	Dako	CMF	1:40
α -CD45RA	FITC	IgG1/ratón	ALB11	Immunotech	CMF	1:40
α -CD45RA	FITC	IgG1/ratón	B-C15	Diaclone SAS	CMF	1:40
α -CD45RO	PE	IgG1/ratón	UCHL-1	Becton Dickinson	CMF	1:40
α -CD45RO	R-PE	IgG2a/ratón	UCHL1	Diaclone SAS	CMF	1:40
α -CD56	PE	IgG1/ratón	N901- NKH-1	Immunotech	CMF	1:40
α -CD80	PE	IgG1/ratón	L307.4	Becton Dickinson	CMF	1:40
α -CD86	PE	IgG1/ratón	BU63	Caltag Laboratories	CMF	1:40
α -HLA-DR	PE	IgG1/ratón	Immu-357	Immunotech	CMF	1:40

Tabla III.2 (Fin)

α -Actina	---	IgG/cabra	I-19	Santa Cruz Biotechnology	WB	1:1000
α -Elf-1	---	IgG/conejo	C-20	Santa Cruz Biotechnology	WB	1:1000
α -Fc ϵ R γ	---	IgG/conejo	---	Upstate Waltham, Massachussets, EEUU	WB, IP	1:2000
α -Lat	---	IgG/conejo	FL-233	Santa Cruz Biotechnology	WB	1:1000
α -Lck	---	IgG/conejo	2102	Santa Cruz Biotechnology	WB	1:1000
α -Syk	---	IgG/ratón	4D10	Santa Cruz Biotechnology	WB	1:1000
α -ZAP70	---	IgG/conejo	LR	Santa Cruz Biotechnology	WB	1:1000
α goat	---	IgG/mono	---	Santa Cruz Biotechnology	WB	1:3000
α mouse	---	IgG/cabra	---	Santa Cruz Biotechnology	WB	1:3000
α rabbit	---	IgG/cabra	---	Santa Cruz Biotechnology	WB	1:3000
α mouse	---	IgG/oveja	---	Amersham Biosciences Piscataway, New Jersey, EEUU	WB	1:10000
α -Ig G mouse	FITC	Policlonal	---	Serotec	CMF	1:40
Control	PE	IgG2a/ratón	B-Z2	Diaclone SAS	CMF	1:40
Control	PE	IgG1/ratón	X40	Becton Dickinson	CMF	1:40
Control	PE	IgG1/ratón	DAK-GO1	Dako	CMF	1:40
Control	PerCP	IgG2a/ratón	X39	Becton Dickinson	CMF	1:40
Control	FITC	IgG1/ratón	DAK-GO1	Dako	CMF, IFI	1:40
Control	FITC / PE / Cy5-PE	IgG1/ratón	679.1Mc7	Inmunotech	CMF	1:40

FITC -Isotiocianato de fluoresceína, PE - Ficoeritrina, R-PE - R-ficoeritrina, Cy5-PE - Cianina 5-R-ficoeritrina.

CMF- Citometría de flujo, IFI-Inmunofluorescencia indirecta, WB- Western-blot, IP-Inmunoprecipitación.

2.2. Evaluación de marcadores intracelulares por citometría de flujo

Para el estudio de marcadores intracelulares, las células recién extraídas de sangre o, bien, de las líneas celulares T-HVS en cultivo, se lavan dos veces, por centrifugación a 300g durante 5 minutos con buffer de lavado (PBS+ 0,4% FCS +0,01% de azida sódica). Seguidamente se dispensan 10^5 células por marcador a estudiar. A continuación, se fijan añadiendo al buffer de lavado el 1% de p-formaldehído (Panreac) y se incuban durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, se lavan centrifugando a 300g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se permeabilizan mediante el buffer de lavado con 0,1% de saponina (Sigma-Aldrich) (buffer de permeabilización) y se vuelve a centrifugar 300g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se decanta y se añade el anticuerpo primario. Se incuba 30 minutos a temperatura ambiente y después se realiza un lavado con buffer de permeabilización centrifugando a 300g durante 5 minutos a temperatura ambiente dos veces. Tras la segunda centrifugación se decanta y se añade el anticuerpo secundario marcado con un fluoróforo, y se incuban 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se realizan dos lavados, el primero añadiendo 500 μ l de buffer de permeabilización y el segundo con buffer de lavado. Finalmente, se analizan en un citómetro de flujo Coulter EPICS Elite ESP. Como control negativo se utiliza el anticuerpo secundario sólo.

La tabla III.2 recoge un listado de los anticuerpos monoclonales utilizados en los experimentos de citometría de flujo de este trabajo.

2.3. Evaluación intra y extracelular por microscopía confocal o inmunofluorescencia indirecta

Las células se lavan en PBS y se resuspenden en PBS +0,4%FCS + 0,01% azida sódica a una concentración de 500.000 células/ml y 100 μ l se citocentrifugan (Servicio del Centro de Apoyo a la investigación de citometría de la UCM) a 250 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, los portas, con las células pegadas, se secan al aire y se sumergen 5 minutos en acetona fría (Panreac) con la que se consigue fijar y permeabilizar. Tras dejar secar se procede al marcaje. Se incuba con 40 μ l del anticuerpo primario 1/40 durante 30 minutos a temperatura ambiente y en humedad, se lava el porta 3 veces con PBS durante 5 minutos y tras dejarlo secar se incuba con el anticuerpo secundario marcado con un fluoróforo y se incuba igualmente 30 minutos a temperatura ambiente, en humedad y en oscuridad. Tras la incubación se lava tres veces con PBS 5 minutos y se añade una gota de líquido de montaje (Incstar, Stilwater, Maine, Estados Unidos (EEUU)) para, por último, colocar el porta fijándolo con laca de uñas. Finalmente, se observa mediante un microscopio confocal (Servicio del Centro de Apoyo a la investigación de citometría de la UCM) o un microscopio de fluorescencia (Nikon II5, Chiyoda-ku, Tokio, Japón).

3. ESTUDIO DE EXPRESIÓN PROTEICA

3.1. Aislamiento de rafts lipídicos

Se utilizan entre 5 y 10 millones de células procedentes de líneas T-HVS, tras dos lavados con RPMI se resuspenden en 1 ml de solución de lisis (25mM de ácido morfolino etanosulfónico, MES) (Sigma-Aldrich), 150mM cloruro sódico (NaCl, Panreac), 1%Brij 58 (Fluka, St. Louis, Missouri, EEUU), 1mM ortovanadato de sodio (Sigma-Aldrich), 2mM Ácido Etileno Diamino Tetracético (EDTA) (Ambion, Austin, Texas, EEUU), 1mM PMSF (*Phenylmethylsulphonylfluoride*, Sigma-Aldrich) y 1 μ g/ml aprotinina (Sigma-Aldrich)). Se homogeneiza con un homogeneizador Douncer y se incuba 30 minutos en hielo. Posteriormente, se añade igual volumen de sacarosa (Biorad, Hercules, California, EEUU) al 85% en MBS (25mM MES, 150mM NaCl pH=6,5) y se traspasa a un tubo de ultracentrífuga. Luego se realiza un gradiente con 6 ml de sacarosa al 35% en MBS y 4 ml de sacarosa al 5% en MBS. Se centrifuga de 18-20 horas a 200.000g a 4°C en una ultracentrífuga (Beckman Instruments, Fullerton, CA, EEUU). Se recolectan 12 fracciones de 1 ml cada una, empezando desde la parte superior. Los rafts lipídicos se encuentran en las fracciones 4 y 5 y la fracción citosólica en la 11 (Krishnan *et al.* J Immunol 2004).

3.2. Precipitación de proteínas

Se añaden 250 μ l de ácido tricloroacético (Panreac) a cada fracción a estudiar. Se incuba 10 minutos a 4°C y se centrifuga a 14.000 rpm 5 minutos a 4°C con lo que se consigue la precipitación de las proteínas. Luego se realizan dos lavados con 200 μ l de acetona fría y se deja secar el pellet.

Para realizar el estudio de proteínas por western blot se añade solución de muestra desnaturizante 1x (Nupage, Invitrogen, San Diego, California, EEUU) y se hierve durante 5 minutos. Antes de cargar el gel se añaden 2 μ l de DTT 1M (Ditiotreitol, Sigma-Aldrich), un agente reductor.

3.3. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo midiendo su absorción a 595 nm en un espectrofotómetro THERMOMAX (Molecular Devices, Sunnyvale, California, EEUU), frente a una curva estándar con concentraciones conocidas de BSA.

3.4. Preparación muestras para su carga en el gel

Al pellet celular obtenido directamente del cultivo o tras el protocolo seguido en el punto 3.1. y 3.2. se le añaden 30 μ l de solución de lisis 1x (20mM TrisHCl (Panreac), pH=7,4, 100mM NaCl (Biofluids, Camarillo,

California, EEUU), 5 mM EDTA, 50 mM de fluoruro sódico (NaF, Sigma-Aldrich), 1mM ortovanadato de sodio, 1mM PMSF y 1µg/ml aprotinina)) y se procede a la cuantificación de proteínas. Luego se prepara la muestra a cargar en el gel con solución desnaturalizante 1X (Nupage, Invitrogen) y se hierve durante 5 minutos. Antes de cargar el gel se añaden 2µl de DTT 1M.

3.5. Estudio de expresión proteica por western-blot

Se utiliza un gel 4-12% Bis-Tris (Nupage, Invitrogen). Se cargan las muestras (5 a 30 µg según experimento) y se corre a 125 V durante 2 horas en condiciones reductoras utilizando el buffer MES (NuPage, Invitrogen). Se utiliza un marcador de peso molecular preteñido (SeeBlue Plus2, Invitrogen).

Posteriormente, se transfiere a una membrana PVDF de 0,45µm de tamaño de poro (Biorad) mediante transferencia húmeda (30 V durante 1 hora a 4°C) utilizando el buffer de transferencia 1x (20% de 20x buffer de transferencia (NuPage, Invitrogen), 10% metanol (Panreac), 0,1% agente antioxidante (NuPage, Invitrogen)). Terminada la transferencia se lava la membrana con agua 5 minutos y se bloquea con 4% de leche desnatada (Blotto, non-fat milk, Santa Cruz Biotechnology) en PBS con 0,1% tween-20 (Promega, Madison, Wisconsin, EEUU) durante 40 minutos en agitación a temperatura ambiente. Luego se procede a la incubación con el primer anticuerpo (diluido según el tipo de anticuerpo) en una solución con el 4% de leche desnatada en PBS y 0,1% tween-20 en agitación toda la noche (aprox. 20 horas) a 4°C. Tras la incubación se lava con PBS y 0,1% tween-20 3 veces, 10 minutos cada una y con PBS, 10 minutos una vez. Seguidamente se procede a la incubación con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano a una dilución 1:3000 en una solución con el 4% de leche desnatada en PBS y 0,1% tween-20 en agitación durante 45 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación se realizan 4 lavados de 10 minutos cada uno con PBS+ 0,1% Tween-20 y un último lavado con PBS. Finalmente, se incuba 1 minuto y medio con ECL (Amersham biosciences, Piscataway, Nueva Jersey, EEUU) y se revela en un revelador (Kodak X-Omat 2000A).

3.6. Inmunoprecipitación

Al pellet celular de 10 millones de células se añaden 150µl de buffer de lisis: 1% Digitonina (Sigma-Aldrich), 0,15 M NaCl (Biofluids), 10mM Hepes (Sigma-Aldrich), 1 mM EDTA, 0,1% azida sódica (Sigma-Aldrich), 0,1% Tritón X-100 (Sigma-Aldrich), 1mM ortovanadato sódico, 2mM PMSF, 34µg/ml leupeptina y 68 µg/ml aprotinina). Se incuba 1 hora a 4°C en agitación.

Luego se procede a la cuantificación de proteínas como se describe en el punto 3.3. Se utilizan 100 µg de proteína por muestra.

Al mismo tiempo se lleva a cabo la conjugación del anticuerpo contra la proteína a inmunoprecipitar, con las bolas de proteína A/G agarosa (Santa Cruz Biotechnology). Para ello, se lavan 30 μ l de bolas de proteína A/G agarosa con 250 μ l de buffer de lisis a 15.000 rpm 15 segundos a 4°C. Tras los lavados las bolas se incuban, con 200 μ l de buffer de lisis y 3 μ l de anticuerpo, 2 horas en un agitador orbital a 4°C. Finalmente, se elimina el sobrenadante y se lavan las bolas unidas ya al anticuerpo con buffer de lisis, 15.000 rpm 10 minutos a 4°C, 4 veces.

Por otro lado, al lisado proteico se le añaden 2 μ l de IgG de conejo, para eliminar posibles uniones inespecíficas, y buffer de lisis hasta un volumen total de 200 μ l y se incuba 90 minutos a 4°C en un agitador orbital. Se centrifuga 15.000 rpm durante 10 minutos para obtener el sobrenadante de interés.

Se añade el sobrenadante del lisado proteico a las bolas de proteína A/G agarosa unidas al anticuerpo y se incuba aproximadamente 20 horas en un agitador orbital a 4°C.

A continuación, se procede al lavado del inmunoprecipitado centrifugando en tres ocasiones a 15.000 rpm con 400 μ l de buffer de lisis durante 5 minutos a 4°C.

Finalmente, se prepara la muestra para cargar en el gel añadiendo al inmunoprecipitado 25 μ l de buffer de lisis y 7,5 μ l de buffer de carga. Se calienta a 95°C 5 minutos y se añaden 4 μ l de DTT 1M. Luego se procede a realizar la electroforesis y el western-blot como se explica anteriormente en el punto 3.5 .

4. FUNCIÓN CELULAR

4.1. Proliferación celular

Las células se lavan dos veces con PBS por centrifugación a 300g durante 10 minutos y, posteriormente, se resuspenden (5x10⁵ células/ml) en medio RPMI 1640 suplementado con 10% FCS, 1% antibiótico (mezcla de gentamicina 4 mg/ml, cloxacilina 12 mg/ml, ampicilina 12.5 mg/ml y fungizona 25 μ g/ml) y 1% glutamina.

Se añaden 9x10⁴ células/pocillo (200 μ l/pocillo) por triplicado en una placa de 96 pocillos (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) y se estimulan durante 72 horas (CMSP) a 37°C, 5% CO₂ y 99% de humedad relativa con los siguientes mitógenos: leucinas (PHA), anticuerpos monoclonales frente a CD3 (α CD3), frente a CD2 (α CD2) o frente a CD28 (α CD28), ionóforos (ionomicina), esteres de forbol (PMA) usado sólo o combinado con ionomicina o citoquinas (IL-2), según las siguientes combinaciones: α CD3, α CD3+IL2, α CD3+PMA, α CD3+ α CD28, α CD2, α CD2+IL2, α CD2+PMA, α CD2+ α CD28, α CD28, α CD28+PMA, Ionomicina, Ionomicina+PMA, PMA+IL2, PHA, PHA+IL2, PHA+PMA, PHA+ α CD28 (Tabla III.3)

Finalmente, se añade 1 μ Ci/pocillo de ³H-timidina (Moravek, Biochemicals, Brea, California, EEUU) y se incuba durante 18 horas en las mismas condiciones. Tras filtración en un harvester (Filtermate 196. Packard instruments. Canberra, Australia) se recogen las células pasándolas a una membrana de fibra de vidrio para evaluar la incorporación de timidina tritiada al DNA celular mediante un contador β (Matrix 96 TM, Packard, Canberra, Australia). Los resultados se expresan como cuentas por minuto (cpm).

Tabla III.3. Mitógenos y concentraciones utilizados en los experimentos de proliferación celular

MITÓGENO	CASA COMERCIAL	CONCENTRACIÓN
PHA (PHA-L)	Sigma-Aldrich	0.5 μ g/ml
α -CD3 (Orthoclon OKT3)	Ortho Biotech Products, Raritan, Nueva Jersey, EEUU	12.5 ng/ml (soluble)
α -CD3 (Orthoclon OKT3)	Ortho Biotech Products	1 μ g/ml (pegado a plástico)
α -CD2 (T11 1/1 clon 6G4)	CLB, Amsterdam, The Netherlands	2.5 μ g/ml
α -CD2 (T11 2/1 clon 4B2)	CLB	2.5 μ g/ml
α -CD28 (KOLT-2)	CLB	50 ng/ml
PMA	Sigma-Aldrich	10 ng /ml (usado individualmente)
PMA	Sigma-Aldrich	1.2 ng/ml (usado en combinación con Ionomicina)
Ionomicina	Calbiochem, La Jolla, California, EEUU	1 μ M
IL-2	TECIN, Hoffman-La Roche Inc	50 U/ml

4.2. Movilización de calcio intracelular

Se lavan las células mediante 10 minutos de centrifugación a 300g y temperatura ambiente, con el tampón de lavado, que contiene 5mM de cloruro de potasio (KCl) (Panreac), 147 mM de cloruro sódico (NaCl) (Panreac), 0,22 mM de fosfato de potasio (KH₂PO₄) (Sigma-Aldrich), 1,1mM de fosfato diácido de sodio (Na₂HPO₄) (Panreac), 5,5 mM de glucosa (Panreac), 0,3 mM de sulfato de magnesio (MgSO₄) (Panreac), 1,1 mM cloruro de magnesio (MgCl₂) (Panreac) y 10 mM de N-[2-hydroxymethyl]piperazine-N' -[ethanesulfonic acid] (HEPES) (Sigma-Aldrich). Se resuspenden las células en el mismo tampón a una concentración de 2x10⁶ células/ml y se

incuban con 2 μ M de Fluo-3AM (Molecular Probes. Oregon, EEUU, cedido por la Dra. Paloma Sánchez- Mateos. Servicio de Inmuno-oncología. Hospital Gregorio Marañón) durante 30 minutos a 30°C, para que entre el Fluo-3AM en el citoplasma celular. Posteriormente, se lavan las células dos veces con tampón de lavado, centrifugando a 300g, 5 minutos, a 4°C. Se añade Ca²⁺ a una concentración de 1 μ M y se incuba a 4°C durante 10 minutos, así se observarán mejor los cambios de movilización de calcio intracelular. Una vez transcurrida la incubación se atempera el tubo a 37°C y se pasa por el citómetro de flujo durante 10 minutos durante los cuales se van añadiendo los diferentes estímulos. De este modo se puede observar el calcio intracelular basal; tras la estimulación con anticuerpo anti-CD3 (sobrenadante del hibridoma T3b, cedido por la Dra. Paloma Sánchez- Mateos. Servicio de Inmuno-oncología. Hospital Gregorio Marañón); tras añadir anticuerpo frente a IgG de ratón 0,02 mg/ml (Sigma-Aldrich), que actúa como entrecruzador; y la liberación total del calcio intracelular tras la adición de ionomicina 2 μ M. Los tiempos seleccionados para añadir cada estímulo son aquellos que permitían observar el efecto del estímulo de forma más clara.

4.3. Apoptosis y necrosis

La apoptosis y necrosis celular fue llevada a cabo tanto en CMSP como en las líneas T-HVS, fueran procedentes de sangre periférica como de mucosa.

Se dispensan 200 μ l por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo en U en ausencia (control negativo) o en presencia (ensayo) de anti-CD3 (1 μ g/ml), PMA (10n μ g/ml) + Ionomicina (Sigma-Aldrich) y PHA (1 μ g/ml) y se incubaron durante 18, 24 y 48 h. Se midió también la apoptosis y necrosis a tiempo 0.

Tras la estimulación, se transfieren las células a tubos de citómetro y se lavan con PBS a 300g 5 minutos dos veces. El pellet se resuspende en 100 μ l de solución de marcaje (10mM Hepes/NaOH pH=7,4, 140mM NaCl y 2,5mM de cloruro de calcio (CaCl₂)) y se añaden 2,5 μ l de Anexina V-FITC (BD Pharmingen, San Diego, California, EEUU) incubándose 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, se añaden 2 μ l de yoduro de propidio (BD Pharmingen) y 400 μ l de solución de marcaje y se analizan en el citómetro. Las células necróticas (N) serían las dobles positivas (anexina V e yoduro de propidio) mientras que las células apoptóticas serían las anexina V positivas, yoduro de propidio negativas. Como controles negativos se utilizan las células sin anexina V ni yoduro de propidio, con anexina V sola o con yoduro de propidio sólo.

4.4. Medición de niveles de interleuquina 2

Se midió por enzoinmunoensayo la cantidad de IL-2 del sobrenadante de cultivo de líneas celulares de linfocitos T intraepiteliales de pacientes con cáncer gástrico y de controles sanos tras siete días sin IL-2 exógena.

Todas las medidas se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del kit (Human IL-2 ELISA set, BD biosciences Pharmingen). Brevemente, se añaden 100 μ l de anticuerpo anti-IL-2 por pocillo y se incuba a 4°C toda la noche. Se lavan los pocillos tres veces con solución de lavado (PBS con 0,05% Tween-20), posteriormente se bloquean los pocillos añadiendo 200 μ l por pocillo de la solución de bloqueo (PBS con 10% de FCS) y se incuba 1 hora a temperatura ambiente. Se lavan tres veces con la solución de lavado y se añaden 100 μ l por pocillo de los patrones y de las muestras y se incuba 2 horas a temperatura ambiente. Tras la incubación se lavan 5 veces con solución de lavado y se añaden 100 μ l por pocillo de la solución de detección (anticuerpo anti-IL-2 biotilado unido a avidina-peroxidasa de rábano) y se incuba 1 hora a temperatura ambiente. Tras la incubación se lavan 7 veces con solución de lavado y finalmente se añaden 100 μ l por pocillo del sustrato y tras una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad se para la reacción con 50 μ l por pocillo de la solución de parada. Se lee la absorbancia antes de 30 minutos a 450 nm.

4.5. Efecto de la interleuquina 2 en la expresión de la cadena CD3 ζ

Este estudio se llevó a cabo en CMSP y en linfocitos T de sangre periférica de controles sanos.

Se prepara una placa con α CD3+ α CD28 (Becton-Dickinson, San José, California EEUU) pegado. Para ello se disuelve α CD3 a una concentración de 20 μ g/ml y α CD28 a una concentración de 10 μ g/ml en Tris-HCl 50 mM pH=9,0. Se añaden 200 μ l/pocillo de la disolución en una placa de 24 pocillos y se deja incubar a 37°C 2 horas. Finalmente se lavan los pocillos con 200 μ l de RPMI dos veces y se procede a añadir las células a una concentración de 3x10⁶ células/ml.

Los CMSP y los linfocitos T se aíslan según apartados 1.1.1. y 1.1.2., respectivamente, y se ponen en cultivo por separado a una concentración de 3x10⁶ células/ml en RPMI+10%FCS+ 0,0004% de β -mercaptoetanol (Sigma)+ 1%PenStrep (Penicilina-Streptomina, Gibco)+ 1%L-glutamina (quality biological, Gaithersburg, Maryland, EEUU)+ 1M Hepes (Sigma) en la placa previamente preparada con los mitógenos abajo reseñados durante 24, 48 y 72 horas a 37°C, 5%CO₂ y 99% de humedad relativa:

- 1) Sin tratar
- 2) α CD3+ α CD28 (pegado a placa)
- 3) α CD3+ α CD28+IFN γ (1.000U/ml, Peprotech Rocky Hill, Nueva Jersey, EEUU)
- 4) α CD3+ α CD28+IFN γ (1.000U/ml)+IL2 (300U/ml, Boehringer Mannheim, Ingelheim, Alemania)

5) α CD3+ α CD28+IL2 (300U/ml)

6) IFN γ (1.000U/ml)

El IFN- γ se usa porque es capaz de disminuir la expresión de la cadena CD3 ζ en ratones (Bronstein-Sitton *et al.*, 2003; Boehm *et al.*, 1997). Tras pasar el tiempo establecido se lavan las células con RPMI a 300g 5 minutos dos veces y se procede al estudio de la expresión cadena CD3 ζ por citometría de flujo según los apartados 2.1 y 2.2. utilizando como proteína control la cadena CD3 ϵ y por western blot según los apartados 3.2., 3.3., 3.4. y 3.5. utilizando la actina como proteína control.

5. SECUENCIA GÉNICA DEL PROMOTOR DE LA CADENA CD3 ζ

5.1. Extracción de DNA genómico

El DNA genómico se extrajo de sangre periférica o de líneas celulares de linfocitos T transformados con *Herpesvirus saimiri* mediante el siguiente protocolo:

A partir de sangre periférica, tras la extracción de unos 10 ml de sangre en tubos con EDTA se centrifuga a 2700 g durante 5 minutos y se coge la interfase (leucocitos) que se transfiere a otro tubo donde se añaden 50 ml de buffer de lisis de eritrocitos (Tris 10mM, Cl₂Mg 5mM, NaCl 10mM a pH 7,6) y se centrifuga a 1800 g durante 10 minutos. Se decanta el sobrenadante y se obtiene un pellet (éste puede proceder de cultivos celulares únicamente tras dos lavados con PBS) al que se le añaden unos 600-800 μ l de DNAzol (Invitrogen) y se resuspende por inversión durante 5 minutos. Posteriormente, se precipita el DNA mediante la adición de etanol 100% (Panreac) en la mitad del volumen añadido de DNAzol. Se mezcla por inversión. La medusa obtenida se lava con etanol 75% (2 veces) y tras eliminar el etanol se deja secar 5-15 segundos. Finalmente, se resuspende en hidróxido sódico (NaOH) (Panreac) 8mM y se mide a 260 nm y 280 nm para conocer su concentración (absorbancia 260nm x factor de dilución x 50) (μ g/ml) y su pureza (ratio absorbancia a 260nm/absorbancia a 280nm=1,6-1,8) en un espectrofotómetro.

5.2. Amplificación del promotor de la cadena CD3 ζ

Las condiciones de amplificación son las siguientes: 94°C 6 min, 33 ciclos 94°C 1 min, 50°C 1 min y 72°C 2 min y un paso de elongación final 72°C 7 min. Se lleva a cabo en un volumen final de 50 μ l que contiene:

tampón tuning 1x (Eppendorf, Hamburg, Alemania), primer 5' (0,1 μ M), primer 3' (0,1 μ M), dNTPs (0,2 mM) (Invitrogen), 1 μ g de DNA genómico y 0,075 U/ml Taq-polimerasa (Eppendorf).

Los cebadores (Diagnostica longwood, Biosynthesis, Lewisville, Texas, EEUU) utilizados para amplificar el promotor del gen de la cadena zeta ya descritos en la bibliografía (Nambiar *et al.*, 2001a):

Primer 5' (-307-288) CCA TCG AGA ACT TGT ATT TG

Primer 3'(+129+113) GCC CTA CCT GTA ATC GG

Como control se utilizaron los siguientes primers de la GAPDH:

Primer 5' AAG GTC GGA GTC AAC GGA TTT

Primer 3' GGG CCA TGA GGT CCA CCA C

Una vez obtenido el amplificado se carga en un gel de agarosa al 1 % (1 g de agarosa (FMC, Houston, Texas, EEUU), 5 ml de TAE 10X (48,4 g Tris+ 11,42 ml de ácido acético glacial (Panreac)+ 20 ml EDTA 5M pH=8,0)), 2,5 μ l de bromuro de Etidio (Sigma) y 45 ml de agua destilada). Las muestras se preparan con 10 μ l de amplificado y 4 μ l de azul de bromofenol (Biorad).

Se utiliza un marcador de peso molecular entre 100-1500 pares de bases (DNA molecular weight marker XIV, Roche Diagnostics, Penzberg, Germany).

El gel se corre a 90V unos 30 minutos y se revela utilizando una lámpara UV (Gel-Doc, Biorad).

5.3. Purificación de ADN del gel

Se recorta la banda de interés y se disuelve en 2,5 volúmenes de yoduro sódico (INa) 5M (Sigma-Aldrich) con una pequeña cantidad de sulfito sódico (Merck, Whitehouse Station, Nueva Jersey, EEUU) como antioxidante en un baño a 50°C, agitando con frecuencia para facilitar dicha disolución. Posteriormente, se añaden 5 μ l de bolas de vidrio bien resuspendidas y se deja 5 minutos en hielo con las bolas de vidrio bien homogeneizadas (vortex). Se homogeneiza con el vortex cada 2 minutos. Luego se lavan las bolas, donde se ha adherido el DNA, con 500 μ l de solución de lavado (50% etanol, 0,1 M NaCl, 10mM Tris (pH=7.5), 1mM EDTA en agua destilada). Este paso se repite tres veces. El pellet final se resuspende en unos 10-20 μ l de agua y se

calienta a 50°C durante 3 minutos, con lo que el ADN se desprende del vidrio y queda disuelto en el agua, se centrifuga 2 minutos y se retira el agua con el máximo cuidado posible para no recoger bolas. Este paso es repetible para retirar todo el ADN posible.

5.4. Secuenciación

Las muestras amplificadas y purificadas se secuenciaron por métodos fluorescentes no radiactivos, utilizando las facilidades del Servicio Central de Secuenciación (C.A.I. de Secuenciación) existente en la UCM. Para ello se utilizan los mismos primers a 5 μ M.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el análisis de los resultados se han aplicado las pruebas estadísticas de comparación de media aritmética, Kruskal-Wallis, U de Mann-Whitney o T-test, según las características de las poblaciones comparadas. Los resultados significativos se alcanzaron cuando la p obtenida fue menor que 0,05.

Para la realización de estos análisis se han utilizado los programas informáticos SIGMA (Horus Hardware), Graphpad Instat (Graphpad Software 1.15), Statgraphics, SPSS y Microsoft Excel (Microsoft).

7. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los experimentos se han llevado a cabo con la aprobación del Comité Ético de la institución. Las muestras de sangre se recogieron durante el seguimiento de rutina de los pacientes o en el momento de la intervención quirúrgica. Las muestras de tejido procedieron de las biopsias de estómago obtenidas con intervención quirúrgica.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. Estudio comparativo de los parámetros clínicos y del perfil inmunológico de pacientes con adenocarcinoma gástrico

Los defectos funcionales de los linfocitos T circulantes y de los linfocitos T infiltrantes de tumor en pacientes con cáncer han sido frecuentemente definidos en la bibliografía. Un reciente trabajo de nuestro grupo (Valeri *et al.*, 2003) reveló que en líneas celulares, cultivadas *in vitro*, obtenidas por transformación con un virus linfotrópico, *Herpesvirus saimiri*, de linfocitos T de sangre periférica procedentes de pacientes con adenocarcinoma gástrico se mantenían los mismos defectos encontrados *in vivo*. Este dato sugería que las alteraciones encontradas no eran debidas a ningún factor secretado por el tumor e indicaba, más bien, que el sistema inmune de estos pacientes era disfuncional con anterioridad a la manifestación clínica y que, por tanto, pudiera no ser adecuado para poder controlar la expansión del tumor.

Basándose en este encuentro se investigó el perfil inmunológico de un grupo de 25 pacientes españoles con adenocarcinoma gástrico resecable (10 mujeres y 15 hombres con una edad comprendida entre los 37 y los 90 años). No fueron incluidos los pacientes con tumor estromal gastrointestinal (GISTs), con linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa gástrica, con adenocarcinoma de unión esofagástrica o con adenocarcinoma gástrico irresecable. Los pacientes estudiados fueron subdivididos de acuerdo con la ausencia o presencia de enfermedad neoplásica residual (ENR– o ENR+) basándose en los criterios de la J.R.S.G.C. y de la U.I.C.C.; A, B o C atendiendo a su curabilidad y R0, R1 o R2 según su resección. El grupo ENR– incluiría los pacientes con curabilidad A o B o resección R0, mientras que el grupo ENR+ incluiría los pacientes con curabilidad C o resección R1 o R2. Los análisis llevados a cabo fueron realizados el día de la intervención quirúrgica. Antes de la extracción de la muestra, el paciente no había recibido quimioterapia o radioterapia. Los pacientes tienen unas historias clínicas (infecciones y edad) comparables.

1.1. Análisis fenotípico

Se realizó un barrido de la superficie de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) analizando las siguientes moléculas por citometría de flujo: CD2, CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD25, CD26, CD28, CD45, CD45RA, CD45RO, CD80, CD86 y HLA-DR. A su vez se subdividieron los resultados obtenidos según las características clínicas de los pacientes (curabilidad y resección).

Tabla 1. Expresión del porcentaje de los marcadores CD3+, CD4+, CD8+ y CD45+ en CMSP de pacientes con adenocarcinoma gástrico clasificados según la ausencia o presencia de enfermedad neoplásica residual (ENR– o ENR+) comparados con controles sanos.

MOLÉCULAS DE SUPERFICIE	CONTROLES	ENR–	ENR+
CD3	75±2 (n=32)	48±6 (n=12)***	39±6 (n=10)***
CD4	47±2 (n=31)	32±5 (n=10)*	24±6 (n=7)***
CD8	31±1 (n=31)	26±3 (n=10)	18±5 (n=7)**
CD45	96±1 (n=27)	89±5 (n=10)	72±11 (n=9)***.#

n muestra el número de individuos testados. Los resultados se muestran como media ± error estándar de la media

*p<0,05/ **p<0,01/**p<0,0001 respecto a los controles

p=0,035 respecto a ENR–

Las principales diferencias encontradas se muestran en la tabla 1. El test de Kruskal-Wallis detecta diferencias para CD3 entre el grupo control (75±2%), el grupo ENR– (48±6%) y el grupo ENR+ (39±6%) (p=0,0001). El test de Mann-Whitney concluye que, por un lado, el grupo ENR– y, por otro, el grupo ENR+ difieren estadísticamente del grupo control (p<0,0001 en todos los casos). Si comparamos el grupo ENR– y el grupo ENR+ no se encuentran diferencias significativas. Este decremento afecta tanto a la población CD4+ como a la CD8+ (según el test de Kruskal-Wallis, p<0,01 y p<0,05, respectivamente) aunque la diferencia es extremadamente significativa cuando se compara el grupo ENR+ con el grupo control (24±6% vs. 47±2%, p=0,000954 para CD4+ y 18±5% vs. 31±1%, p=0,00544 para CD8+).

La expresión de CD45 está presente en el 72±11% de las células de los pacientes del grupo ENR+, en el 89±5% de las células de los pacientes del grupo ENR– y en el 96±1% de las células del grupo control. Estas diferencias son estadísticamente significativas según el test de Kruskal-Wallis (p=0,0011). Cuando se comparan los resultados de los grupos dos a dos utilizando el test de Mann-Whitney, el valor del grupo ENR+ difiere significativamente del grupo control (p<0,0001) y del grupo ENR– (p=0,035) mientras que éste último no difiere del grupo control (p=0,229).

El porcentaje de células CD45– de los pacientes también son CD3– como se puede observar en la figura IV.1 donde se muestran experimentos representativos de los pacientes del grupo ENR+ (A) y del grupo ENR– (B).

Figura IV.1. Dot-blot representativo del porcentaje de CD3 y CD45 de las células mononucleares de sangre periférica de pacientes pertenecientes al grupo ENR+ (A) y ENR–(B)

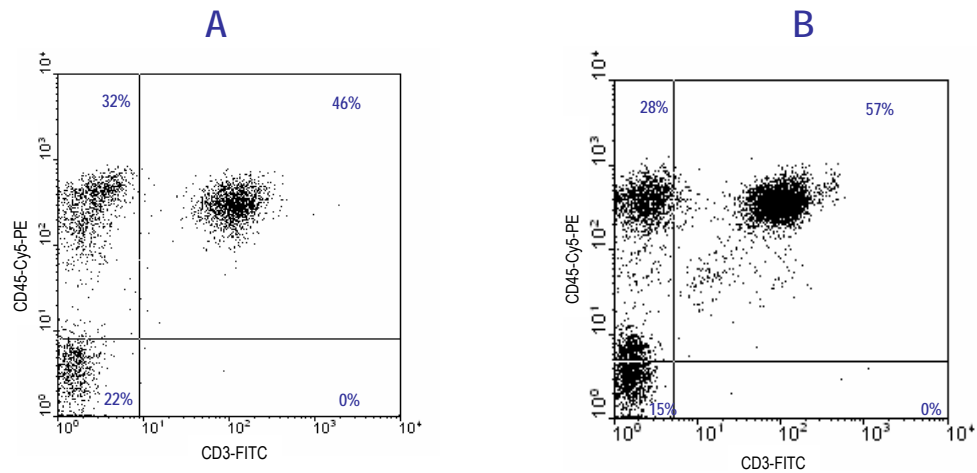


Tabla 2. Análisis de expresión (%) mediante citometría de flujo de diferentes moléculas de superficie de CMSP de pacientes con adenocarcinoma gástrico clasificados según la ausencia o presencia de enfermedad neoplásica residual (ENR– o ENR+, respectivamente) comparados con controles sanos.

MOLÉCULAS DE SUPERFICIE	CONTROLES	ENR–	ENR+
CD2	82±2 (n=21)	67±7 (n=5)**	36±22 (n=3)***
CD16	15±4 (n=12)	20±7 (n=6)	15±8(n=4)
CD19	5±1 (n=20)	5±2 (n=8)	7±2(n=4)
CD25	8±3 (n=28)	4±1 (n=8)	5±3(n=6)
CD26	8±3 (n=12)	29±14 (n=3)*	2(n=1)
CD28	52±4 (n=27)	38±7 (n=8)	26±8(n=6)**
CD45RA	70±5 (n=15)	69±10 (n=4)	34±17(n=3)*
CD45RO	20±4 (n=15)	31±21 (n=4)	11±4(n=4)
CD56	10±2 (n=26)	12±4 (n=6)	5±2(n=5)
CD80	1±0 (n=21)	2±2 (n=8)	1±1(n=6)
CD86	3±0 (n=23)	11±8 (n=7)	10±5(n=6)
DR	9±1 (n=27)	16±6 (n=8)	7±3(n=5)

n muestra el número de individuos testados. Los resultados se muestran como media ± error estándar de la media

*p<0,05/**p<0,01/**p<0,0001 respecto a los controles

Al analizar el resto de marcadores se podrían resaltar las diferencias encontradas en CD2, CD28 y CD45RA.

Cuando se analiza CD2, el test de Mann-Whitney concluye que, por un lado, el grupo ENR- ($67\pm 7\%$) y, por otro, el grupo ENR+ ($36\pm 22\%$) difieren estadísticamente del grupo control ($82\pm 2\%$), ($p < 0,01$ y $p < 0,0001$, respectivamente). Si comparamos el grupo ENR- y el grupo ENR+ no se encuentran diferencias significativas.

La expresión de CD28 está presente en el $26\pm 8\%$ de las células de los pacientes del grupo ENR+, en el $38\pm 7\%$ de las células de los pacientes del grupo ENR- y en el $52\pm 4\%$ de las células del grupo control. Cuando se comparan los resultados de los grupos dos a dos utilizando el test de Mann-Whitney se encuentran diferencias significativas al comparar el valor del grupo ENR+ con el grupo control ($p < 0,01$). El grupo ENR- no difiere del grupo control ni del grupo ENR+.

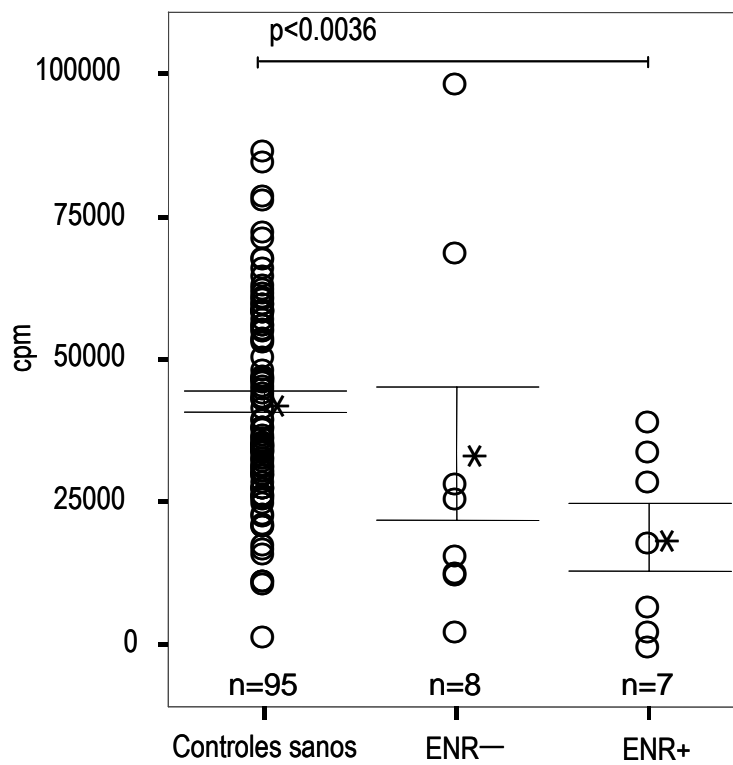
CD45RA se expresa en el $70\pm 5\%$ de las células del grupo control, $69\pm 10\%$ del grupo ENR- y $34\pm 17\%$ del grupo ENR+. Se observa que hay diferencias significativas entre el grupo control y el grupo ENR+ ($p < 0,05$), diferencias que no se observan entre el grupo control y el grupo ENR- (aunque si disminuye su valor considerablemente), ni entre éste y el grupo ENR+.

1.2. Análisis funcional

Se realizó un estudio de la respuesta proliferativa a diferentes estímulos mitogénicos, que activan al linfocito T, para analizar diferentes vías de señalización, tanto en las que se habían descrito defectos como en las que no. Los resultados obtenidos se subdividieron según las características clínicas de los pacientes (curabilidad y resección).

Las diferencias más notables fueron encontradas en la respuesta proliferativa a CD3 (figura IV.2). Las células del grupo control alcanzaron 42.697 ± 1.798 cpm tras estimulación, mientras que el valor para los pacientes del grupo ENR- alcanzó 33.619 ± 11.733 y 18.920 ± 6.019 cpm para los pacientes del grupo ENR+. El test de Kruskal-Wallis detectó diferencias significativas entre los grupos ($p = 0,0038$) y la comparación utilizando el test de Mann-Whitney indicó que estas diferencias no eran entre el grupo control y el grupo de pacientes ENR-, sino que era el grupo ENR+ el que proliferaba significativamente menos que el grupo control ($p = 0,0036$).

Figura IV.2. Box-plot que representa la respuesta proliferativa a CD3 (cpm) de CMSP de pacientes con adenocarcinoma gástrico, clasificados de acuerdo a la ausencia o presencia de enfermedad neoplásica residual (ENR- o ENR+, respectivamente), comparada con el grupo control.



n muestra el número de individuos testados. Se muestra la media (*) y el error estándar de la media.

En la tabla IV.3 se pueden observar el resto de resultados obtenidos para todas las combinaciones de mitógenos utilizadas.

Tabla IV.3. Análisis de la respuesta proliferativa (en cpm) de CMSP de pacientes con adenocarcinoma gástrico clasificados según la ausencia o presencia de enfermedad neoplásica residual (ENR- o ENR+) y de controles sanos, a diferentes combinaciones de mitógenos.

	CONTROLES		ENR-		ENR+	
	MEDIA±SEM	n	MEDIA±SEM	n	MEDIA±SEM	n
BASAL	907±106	106	775±385↓	9	700±325↓↓	7
PHA	86780±2982	88	67657±24093	5	73921±37143	4
PHA-IL2	128099±19615	76	78805±27141	4	91730±24136	4
PHA-PMA	89538±4914	58	65167±26109	5	80470±18576	3
PHA-CD28	129228±11339	23	105430±37067	4	100975±5905	2
IL2	7894±418	100	12410±8110	5	4854±2085	6
PMA	6576±755	92	9330±4488	7	3985±2807	4
CD28	4487±2865	26	399±142↓	2	59±22↓↓	2
CD3-IL2	71720±2713	95	63464±12571	8	72725±16633	8
CD3-PMA	77000±4235	79	57947±15466	9	89990±17630	5
CD3-CD28	68521±4658	40	75752±15440	7	44626±14325	7
CD2	1606±392	40	4580±3419↑	5	15399±14949↑**	4
CD2-IL2	50909±2997	44	33223±14004↓	6	16817±11824↓**	5
CD2-PMA	83957±8606	46	53337±22515	7	85115±18610	2
CD2-CD28	38552±3512	29	35166±16518↓	7	28657±10903↓	5
PMA-ION	87241±6047	47	64953±27498	4	85651±46001	4
P24	2029±443	46	569±249	3	664±94	2
ION	1477±203	42	443±240	4	451±152	2
PMA-I-CD28	97782±10033	27	42705±10515	2	81545±17145	2
PMA-IL2	47079±3463	35	31195±12429↓	5	25044±12590↓↓	4
PMA-CD28	53037±5541	31	32542±14276	3	46728±15733	2
CD2-CD3	9430±3640	3	6023±2654↓	5	1823±370↓↓	3

n muestra el número de individuos testados. Se indican la media y el error estándar de la media (SEM)
**p<0,01 respecto a los controles

En la tabla IV.3 se muestran en negrita y mediante flechas el mayor o menor descenso en los resultados de respuesta proliferativa que son diferentes según los grupos: Basal, αCD28, αCD2+αCD28, PMA+IL-2 y

α CD2+ α CD3. De tal manera que la respuesta proliferativa es menor en los pacientes del grupo ENR- y mucho más baja en los pacientes del grupo ENR+. Estas diferencias no son estadísticamente significativas.

La respuesta a α CD2+IL-2 es estadísticamente diferente ($p < 0,01$) entre el grupo ENR+ y el grupo control pero no se diferencia significativamente del grupo ENR-.

También se observa diferencias significativas ($p < 0,01$) en la respuesta a α CD2, entre el grupo ENR+ y el grupo control, diferencia que no se encuentra con respecto al grupo ENR- y tampoco entre éste y el grupo control. En este caso los grupos de pacientes tienen una respuesta proliferativa mayor que el grupo control.

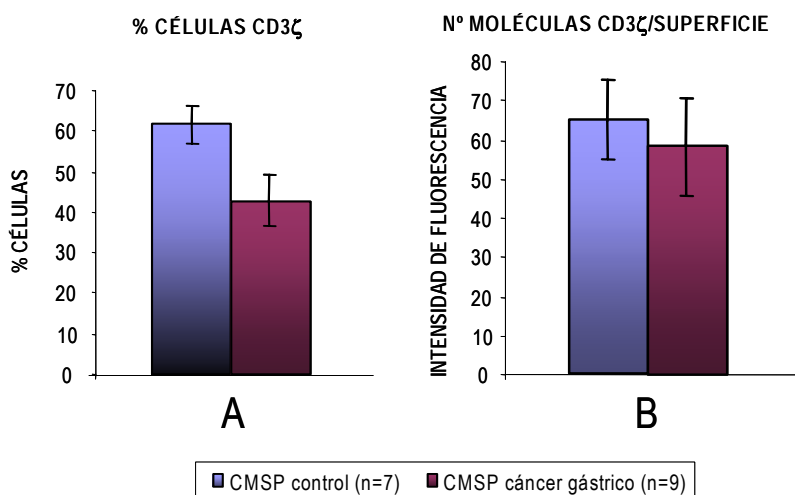
Como se observa en la tabla no se muestra ningún resultado estadísticamente reseñable con el resto de mitógenos utilizados, pudiéndose concluir que no existe correlación entre la respuesta proliferativa a estas combinaciones de mitógenos utilizadas y el estado clínico de los pacientes. Tampoco se encuentran estas diferencias entre las diferentes combinaciones con α CD3.

2. Estudios de linfocitos T de sangre periférica en pacientes con adenocarcinoma gástrico

2.1. Expresión de CD3 ζ

Basándose en datos ya publicados (de Grujil *et al.*, 1999; Dworacki *et al.*, 2001; Nakagomi *et al.*, 1993; Whiteside, 2004; Baniyash, 2004; Kim *et al.*, 1999) se analizó la disminución en el porcentaje y la intensidad de fluorescencia de CD3 ζ en CMSP de pacientes con adenocarcinoma gástrico.

Figura IV.3. A) Porcentaje de células CD3 ζ + B) Intensidad de fluorescencia de células CD3 ζ + en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma gástrico.



n es el número de individuos testados. Los resultados se muestran como media \pm error estándar de la media

Además de existir una disminución en el porcentaje de células CD3 ζ ⁺ en los pacientes con adenocarcinoma gástrico con respecto a los controles (Figura IV.3A), se observa también una disminución en la intensidad de fluorescencia, parámetro que indica el número de moléculas que expresa cada célula por superficie (Figura IV.3B). Estas disminuciones no son significativas, quizás por el bajo tamaño muestral de individuos analizados.

Como los resultados obtenidos concuerdan con la bibliografía podríamos usar esta metodología para realizar los estudios de la expresión de la cadena CD3 ζ .

2.2. Realización de estudios de apoptosis y necrosis celular

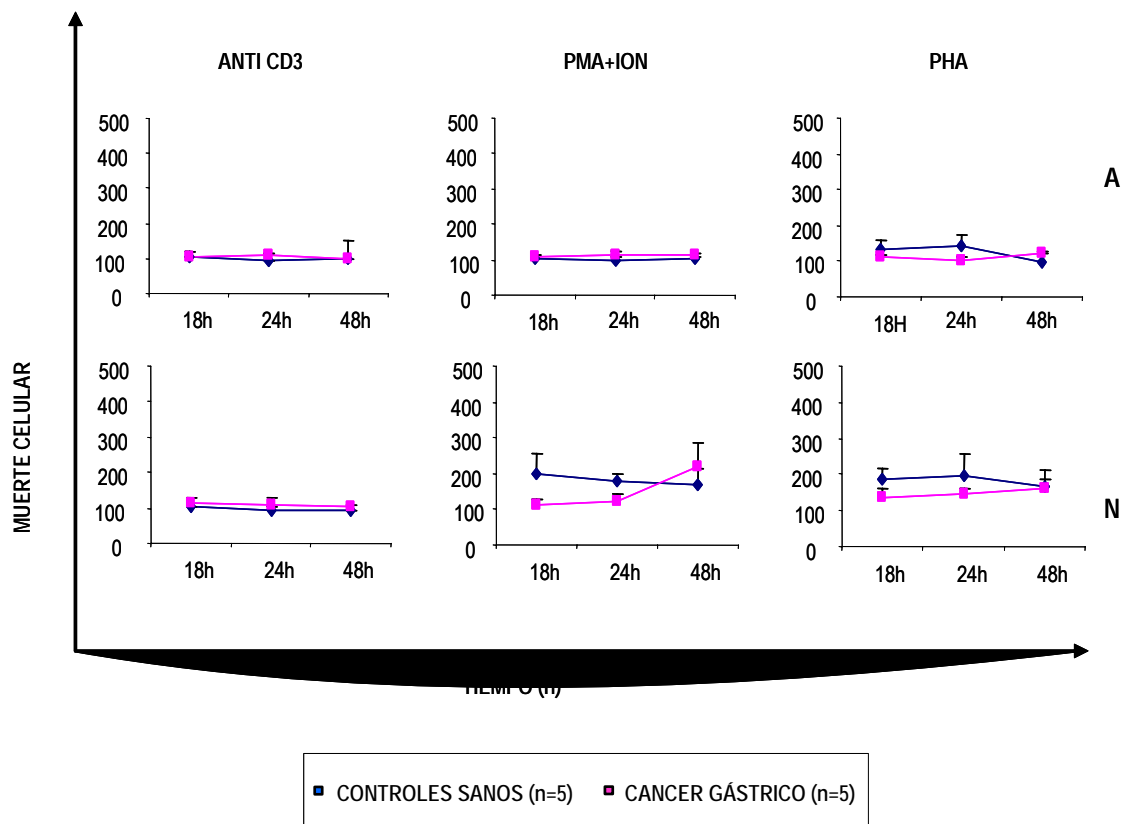
Existen datos contradictorios acerca de la existencia de una mayor tasa de apoptosis en linfocitos T de sangre periférica de pacientes con cáncer. Muchos de esos trabajos relacionan este incremento con el mal funcionamiento del linfocito T debido a su baja expresión de CD3 ζ (Takahashi *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 1999).

En trabajos previos del grupo se hizo un estudio de proliferación celular de CMSP de pacientes con adenocarcinoma gástrico y se comparó con un grupo control. Se observó una disminución de la proliferación en los pacientes con respecto a los controles sanos cuando se estimulaban vía CD3 o CD2 (Valeri *et al.*, 2003). Estos resultados se confirmaron realizando los mismos estudios en líneas de linfocitos T procedentes de sangre periférica obtenidas tras transformación con HVS. Si las tasas de crecimiento de las líneas procedentes de los pacientes son comparables a las tasas de crecimiento de las líneas procedentes de los controles se puede concluir que los defectos observados no son debidos a una mayor tasa de apoptosis.

Para descartar que el defecto, en la respuesta a determinados estímulos, fuera debido a mayor índice de apoptosis se realizó un estudio más concreto mediante citometría de flujo utilizando anexina V conjugada con fluoresceína e yoduro de propidio. La anexina V se une a la fosfatidilserina de la membrana utilizando calcio, que queda así expuesta al exterior cuando la célula ha entrado en apoptosis. El yoduro de propidio, que se intercala entre las bases del DNA, sólo tendrá acceso al DNA en situación de necrosis celular, en la que se forman poros en la membrana citoplasmática y en la membrana nuclear. Las células apoptóticas serán aquellas anexina V+yoduro de propidio– mientras que las células necróticas serán positivas para ambos marcadores.

Las células se incubaron a diferentes tiempos (18, 24 y 48 h) utilizando distintos estímulos (α CD3, PMA+ION y PHA). Los defectos de proliferación se veían cuando se activaba a través de TCR-CD3, de ahí la utilización de anticuerpos α CD3 y PHA. Como control positivo de estimulación se usó la combinación PMA+ION, independiente de TCR/CD3.

Figura IV.4. Análisis de apoptosis y de necrosis celular mediada por diferentes mitógenos y medida a distintos tiempos de CMSP.



Los resultados son mostrados como el porcentaje de células estimuladas respecto a las células no estimuladas para cada tiempo. Se representa la media \pm error estándar de la media.

Se calculó el porcentaje de células estimuladas respecto a las células no estimuladas para cada tiempo. Esto se realizó debido a la diferente tasa de apoptosis y necrosis celular en el estado basal, es decir sin estimular, a los distintos tiempos.

La cinética de la apoptosis inducida por estímulos vía TCR-CD3 usando α CD3 o PHA fue como era de esperar, es decir, no se observaron diferencias en el porcentaje de apoptosis entre CMSP de pacientes con adenocarcinoma gástrico y controles sanos en respuesta a los diferentes estímulos.

Si observamos la tasa de necrosis celular los resultados son similares a los anteriores, al comparar células procedentes de pacientes y de controles no se observan diferencias en respuesta a los distintos estímulos utilizados en los diferentes tiempos analizados.

3. Obtención y cultivo de líneas procedentes de linfocitos T de sangre periférica y de mucosa gástrica de pacientes con adenocarcinoma gástrico y de individuos control tras inmortalización con *Herpesvirus saimiri* (HVS).

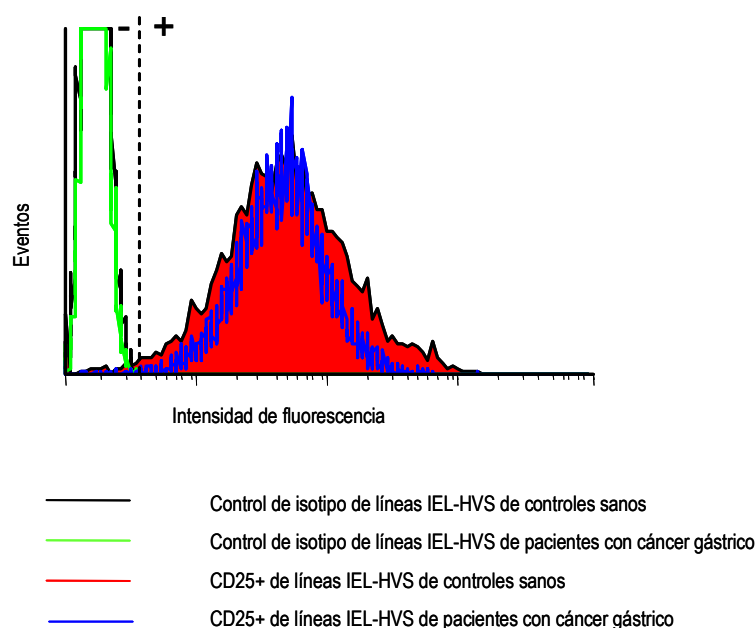
Para realizar más a fondo el estudio del linfocito T de sangre periférica o de mucosa gástrica se procedió a utilizar líneas de linfocitos T obtenidas tras la inmortalización con HVS procedentes de pacientes con adenocarcinoma gástrico y de individuos control. Como ya se ha comentado, estos estudios permiten solucionar la dificultad de obtener suficiente cantidad de células para realizar los diferentes estudios, en especial células procedentes de mucosa, ya que mantienen los defectos observados en fresco y permiten el cultivo de células en ausencia de cualquier tipo de factor del organismo (por ejemplo, factor tumoral) o fármacos, así como de otras poblaciones celulares.

Mediante la inmortalización con HVS de CMSP se obtuvieron 7 líneas PBL-HVS, todas ellas CD8+ de pacientes y 8 líneas, una línea CD4+ y 7 líneas PBL-HVS CD8+ de controles sanos.

A partir de biopsias de estómago de pacientes con adenocarcinoma gástrico se obtuvieron 6 líneas IEL-HVS, de ellas 5 IEL-HVS CD4+ y 1 IEL-HVS CD8+. Además, se han inmortalizado células T de mucosa de intestino delgado de 2 controles sanos y se obtuvieron dos líneas, una línea IEL-HVS CD4+ y una línea IEL-HVS CD8+.

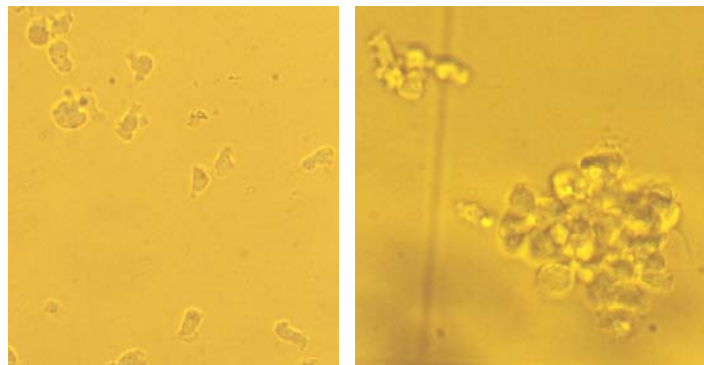
Las líneas de células IEL-HVS CD4+ obtenidas de mucosa tanto de intestino delgado de controles sanos como de estómago de pacientes con cáncer gástrico son CD25+ como se puede ver en la figura IV.5.

Figura IV.5. Experimento representativo de la expresión de CD25 en líneas de linfocitos T de mucosa de controles sanos y de pacientes con adenocarcinoma gástrico



En la figura IV.6 se puede observar la forma linfoblastoide que adquieren los linfocitos T tras su inmortalización (foto de la izquierda). También se observa el crecimiento característico de estas células (foto de la derecha).

Figura IV.6. Líneas de linfocitos T obtenidas tras inmortalización con HVS



Los resultados que se describen a continuación fueron realizados en líneas de linfocitos T de sangre periférica de linaje CD8+ y en líneas de linfocitos T de mucosa de linaje CD4+, tanto de controles como de pacientes. Como control para los ensayos realizados a partir de muestras de sangre se utilizó una población de adultos voluntarios sanos. En cuanto a los estudios de tejido, se han utilizado como control muestras procedentes de biopsias de intestino delgado de donantes sanos. El hecho de que las líneas de pacientes sean de origen gástrico, mientras que las de controles de origen intestinal, no debería limitar la validez del trabajo. Los linfocitos de mucosa de ambos orígenes anatómicos son razonablemente idénticos y no hay diferencias aportadas por la literatura en cuanto a sus características fenotípicas y funcionales (James, 1994).

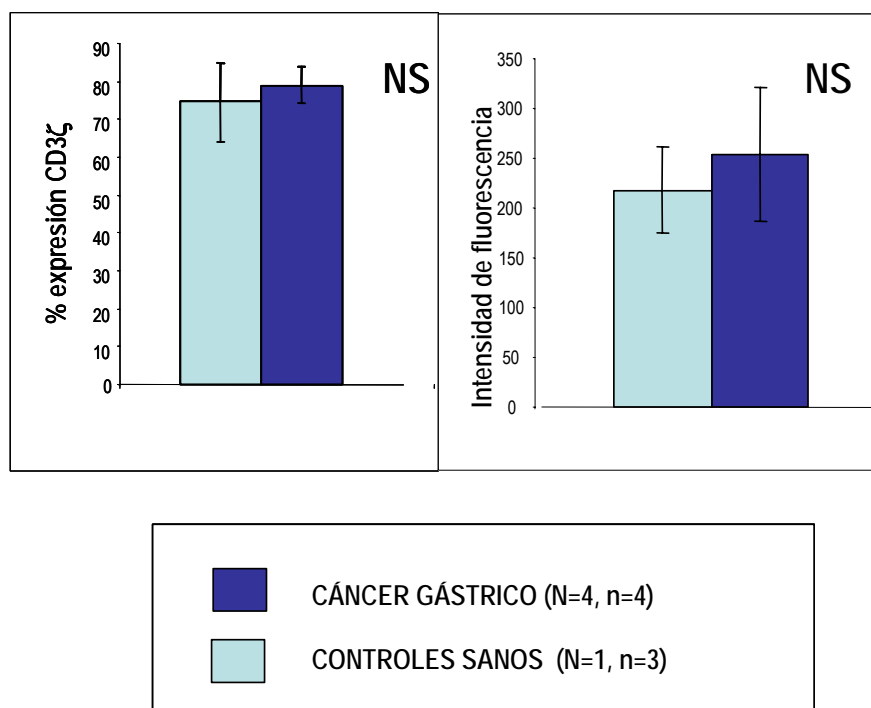
4. Análisis de la expresión y patrón de expresión de la cadena CD3 ζ y CD3 ϵ

4.1. Líneas HVS de linfocitos T de mucosa

Dado el defecto de proliferación encontrado en líneas de linfocitos T-HVS nos propusimos estudiar los defectos proteicos en linfocitos T infiltrantes de tumor, concretamente, la expresión de la cadena CD3 ζ , tanto por citometría de flujo como por western-blot, en líneas de linfocitos T de mucosa de pacientes con adenocarcinoma gástrico y de controles sanos. Esta proteína es una de las primeras en la cascada de transducción de señales tras la estimulación del linfocito T.

4.1.1. Citometría de flujo

Figura IV.7. Porcentaje de células CD3 ζ + (izquierda) e intensidad de fluorescencia de CD3 ζ (derecha) en líneas T-HVS de mucosa de pacientes con adenocarcinoma gástrico con IL-2 en el medio de cultivo.

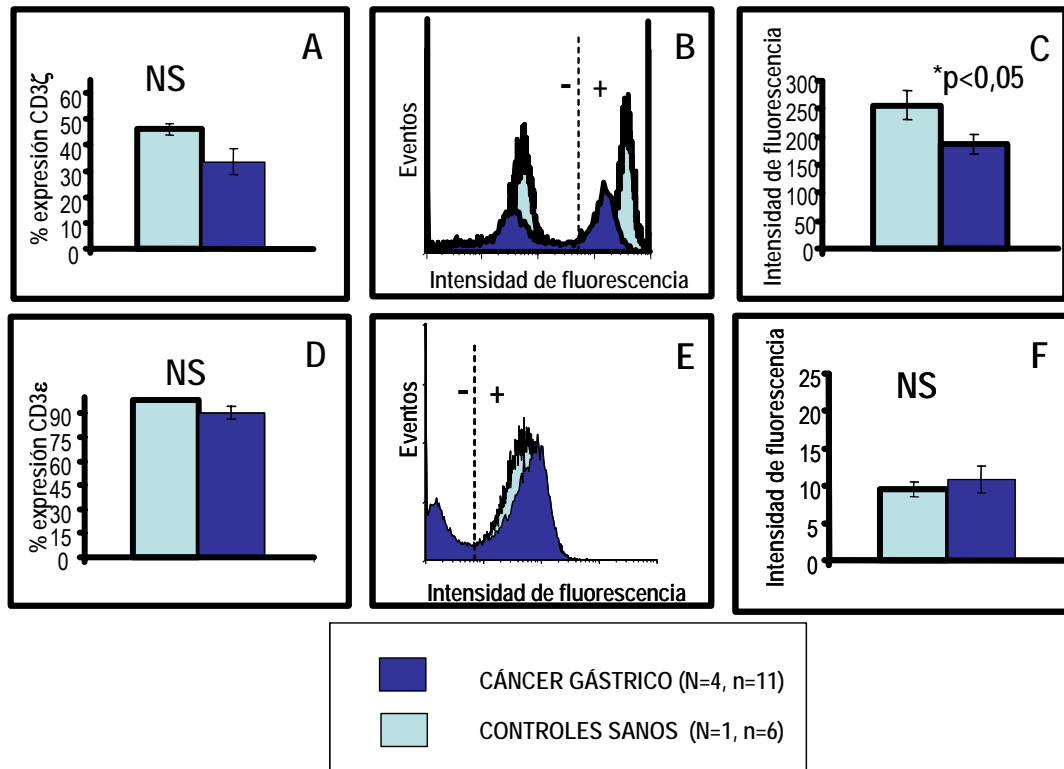


N, número de líneas testadas. n, número de experimentos.
NS no significativo.

No se observa disminución en el porcentaje de células CD3 ζ + al comparar líneas de linfocitos T procedentes de mucosa de pacientes con adenocarcinoma gástrico y controles (Figura IV.7).

La expresión de la cadena CD3 ζ parece que está regulada por la IL-2 (Rabinowich *et al.*, 1996; De Paola *et al.*, 2003). Esta citoquina está presente en el medio de cultivo, ya que para el crecimiento estable de estas líneas de linfocitos T-HVS se necesita de la adición de la IL-2 exógena, con lo que nos propusimos repetir los experimentos privando de esta citoquina a los cultivos celulares durante varios días. Finalmente se escogió llevar a cabo los experimentos en líneas privadas durante siete días de esta citoquina y se midió el porcentaje de expresión y la intensidad de fluorescencia de CD3 ζ . Como molécula control se utilizó el análisis de la expresión de CD3 ϵ .

Figura IV.8. Expresión de CD3 ζ y CD3 ϵ en líneas de linfocitos T por citometría (A) Porcentaje de células CD3 ζ + (B) Intensidad de fluorescencia de CD3 ζ de un experimento representativo, (C) Intensidad de fluorescencia de CD3 ζ (D) Porcentaje de células CD3 ϵ +, (E) Intensidad de fluorescencia de CD3 ϵ de un experimento representativo, (F) Intensidad de fluorescencia de CD3 ϵ .



N, número de líneas testadas. n, número de experimentos.
NS no significativo.

La eliminación de la IL-2 redujo la expresión de CD3 ζ , pero no de CD3 ϵ , en líneas de pacientes y de controles pero de manera más pronunciada en los pacientes. El análisis de fluorescencia reveló que el porcentaje de células CD3 ζ +, pero no CD3 ϵ +, estaba disminuido en las líneas de los pacientes con cáncer (33,5±5%) cuando se comparó con las líneas procedentes de los controles (45,9±2,2%), aunque no de manera significativa, (Figuras IV.8A). Sin embargo, analizando el valor de la intensidad de fluorescencia (Figuras IV.8B, IV.8C) se observaron diferencias significativas (257±25 vs. 187±16, p<0,05). Las líneas de los pacientes tienen una menor intensidad de fluorescencia de CD3 ζ con respecto a los controles. Esto indica una menor expresión de esta proteína en superficie.

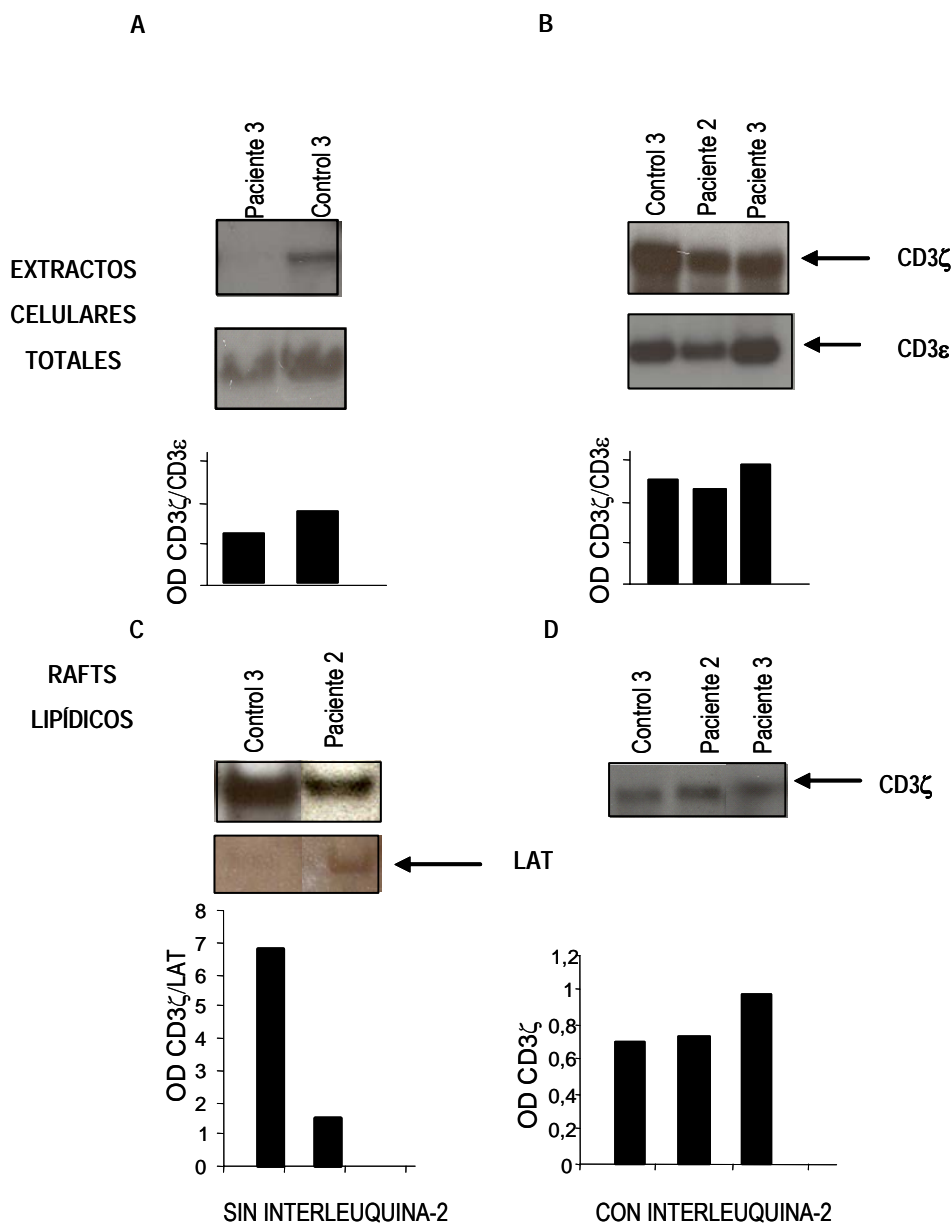
4.1.2. Western-blot

Posteriormente, para confirmar los estudios de citometría se estudió la expresión de esta proteína por western-blot.

Cuando se produce la unión del TCR al MHC se produce una rápida activación de las quinasas de la familia Src y una subsiguiente acumulación en los rafts lipídicos de los sustratos fosforilados, incluyendo todas

las moléculas CD3 ζ fosforiladas, dando lugar a la llamada sinapsis inmunológica. La formación eficiente de la sinapsis inmunológica es crítica para la amplificación de la señal del TCR y la subsiguiente activación de la célula T. Dada la importancia de la acumulación de CD3 ζ en los rafts lipídicos nos planteamos, no sólo estudiar la expresión de esta cadena en los extractos celulares totales, sino también en estos rafts lipídicos. Como proteínas control se utilizaron CD3 ϵ para el estudio de los extractos celulares totales y LAT como proteína que se acumula en los rafts lipídicos.

Figura IV.9. Expresión de CD3 ζ , CD3 ϵ y LAT por western-blot en líneas de linfocitos T de mucosa (A) CD3 ζ y CD3 ϵ en extracto total tras siete días sin IL-2 en el medio de cultivo, (B) CD3 ζ y CD3 ϵ en extracto total sin eliminar IL-2 del medio de cultivo, (C) CD3 ζ y LAT en rafts lipídicos tras siete días sin IL-2 en el medio de cultivo (D) CD3 ζ en rafts lipídicos sin eliminar IL-2 del medio de cultivo.



El análisis del densitometrado de las bandas de CD3 ζ de los cultivos tras siete días sin IL-2 se muestra debajo de sus respectivos gels.

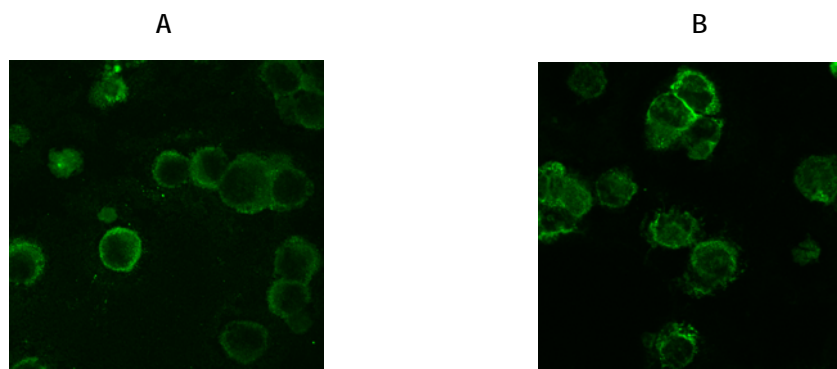
El análisis por western-blot confirmó los resultados obtenidos por citometría. CD3 ζ está disminuido en los extractos de líneas de linfocitos T procedentes de mucosa de pacientes con adenocarcinoma gástrico crecidas en ausencia de IL-2, tanto en extractos totales (Figura IV.9A), como en rafts lipídicos (Figura IV.9C). Este defecto no fue encontrado en líneas de linfocitos T procedentes de controles sanos.

Sin embargo, la expresión de CD3 ϵ , medida como control, no mostró diferencias entre pacientes y controles (Figura IV.9A y IV.9B). La eliminación de IL-2 del medio de cultivo no redujo la expresión de la cadena CD3 ϵ en las líneas.

4.1.3. Microscopía confocal

La disminución encontrada en la expresión de la cadena CD3 ζ puede ser debida a muchas causas, entre ellas la acumulación de la proteína en compartimentos celulares. Por ello, nos propusimos estudiar el patrón de expresión de la cadena CD3 ζ por microscopía confocal (Figura IV.10).

Figura IV.10. Imágenes realizadas por microscopía confocal de líneas de linfocitos T de mucosa. A) Control sano B) Paciente con adenocarcinoma gástrico



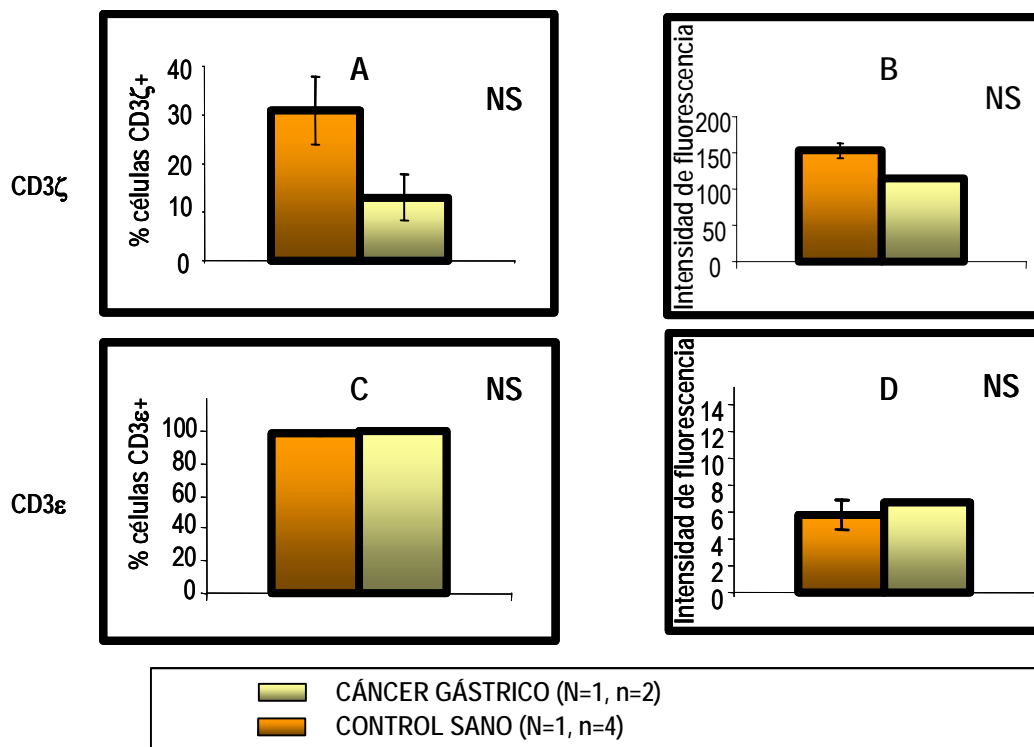
Se observó que la disminución de expresión de la cadena CD3 ζ es homogénea a lo largo de toda la superficie celular y no parece quedarse retenida en ningún orgánulo intracelular, no encontrándose, además, diferencias en el patrón de expresión entre líneas de linfocitos T de pacientes con adenocarcinoma gástrico y de controles sanos.

4.2. Líneas HVS de linfocitos T de sangre periférica

Tras los estudios de CD3 ζ realizados en líneas HVS de linfocitos T procedentes de mucosa nos propusimos estudiar esta proteína en líneas de linfocitos T procedentes de sangre periférica cultivadas siete días en ausencia de IL-2. Como moléculas control se utilizaron CD3 ϵ y LAT.

4.2.1. Citometría de flujo

Figura IV.11. Expresión de CD3 ζ y CD3 ϵ en líneas de linfocitos T por citometría de flujo (A) Porcentaje de células CD3 ζ + (B) Intensidad de fluorescencia de CD3 ζ (C) Porcentaje de células CD3 ϵ + (D) Intensidad de fluorescencia de CD3 ϵ



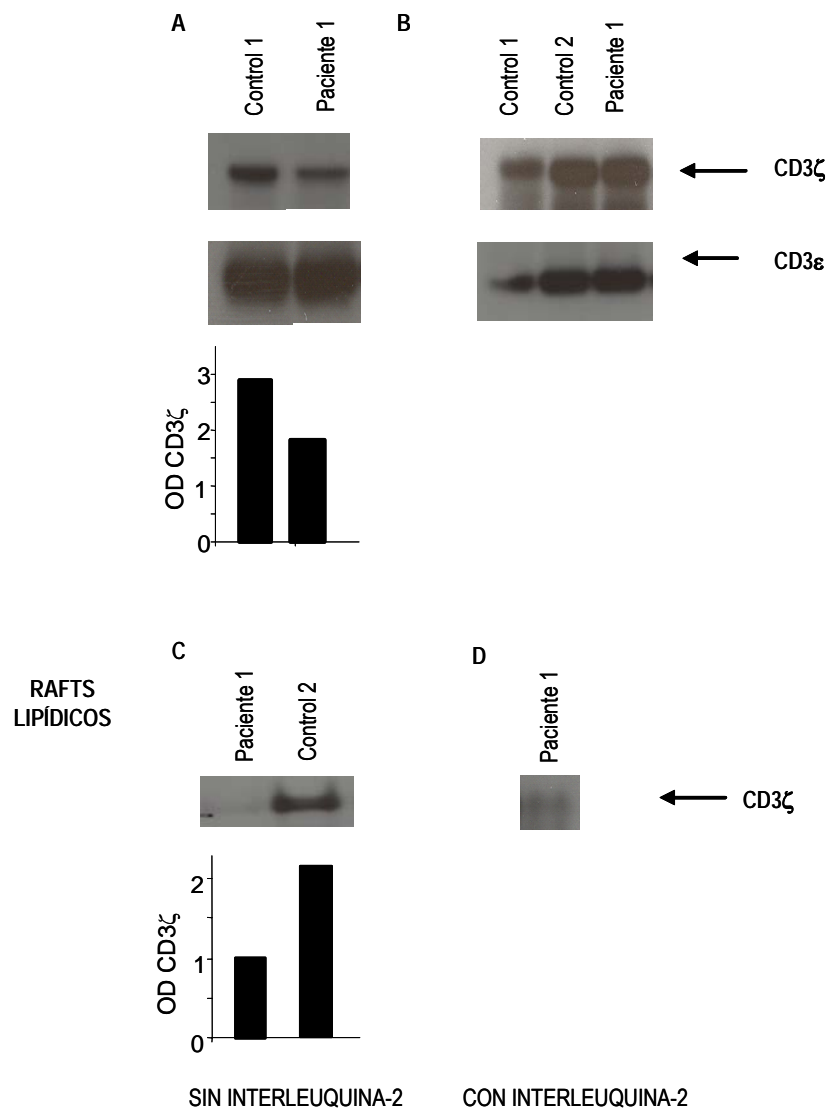
N, número de líneas testadas. n, número de experimentos.
 NS no significativo.

La ausencia de IL-2 en el medio de cultivo da lugar a una disminución de la expresión de CD3 ζ tanto en líneas procedentes de pacientes como en líneas procedentes de controles. Con el análisis por citometría de flujo (Figura IV.11) se observa una disminución en el porcentaje de células CD3 ζ + de las líneas de pacientes de cáncer (12,9±4,9%) en comparación con las líneas procedentes de controles sanos (30,9±7%) así como en la intensidad de fluorescencia en líneas T HVS de pacientes (186±71) al comparar con líneas procedentes de controles sanos (153±9) (Figura IV.11). Esta disminución no es estadísticamente significativa, seguramente debido al poco número de líneas testadas. Estas diferencias no fueron encontradas en CD3 ϵ , cuya expresión no disminuye con la ausencia de IL-2.

4.2.2. Western-blot

Para confirmar estos resultados se realizó el estudio de la expresión de CD3 ζ por western-blot en extractos celulares totales y en rafts lipídicos, como se había realizado para líneas de linfocitos T procedentes de mucosa. Estos experimentos fueron realizados en líneas T HVS de sangre periférica en presencia o ausencia de IL-2. Como proteínas control se utilizaron CD3 ϵ para el estudio de los extractos celulares totales y LAT como proteína que se acumula en los rafts lipídicos.

Figura IV.12. Expresión de CD3 ζ , CD3 ϵ y LAT por western-blot en líneas de linfocitos T de sangre periférica (A) CD3 ζ y CD3 ϵ en extracto total tras siete días sin IL-2 en el medio de cultivo, (B) CD3 ζ y CD3 ϵ en extracto total sin eliminar IL-2 del medio de cultivo, (C) CD3 ζ y LAT en rafts lipídicos tras siete días sin IL-2 en el medio de cultivo (D) CD3 ζ en rafts lipídicos sin eliminar IL-2 del medio de cultivo.



El análisis del densitometrado de las bandas de CD3 ζ se muestra debajo de sus respectivos gels.

Mediante el análisis por western-blot se confirmaron los resultados obtenidos por citometría. CD3 ζ está disminuido en los extractos de líneas de linfocitos T procedentes de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma gástrico crecidas en ausencia de IL-2, tanto en extractos totales (Figura IV.12A), como en rafts lipídicos (Figura IV.12C). Este defecto no fue encontrado en líneas de linfocitos T procedentes de controles sanos.

Sin embargo, la expresión de CD3 ϵ , medida como control, no mostró diferencias entre pacientes y controles (Figura IV.12A y IV.12B).

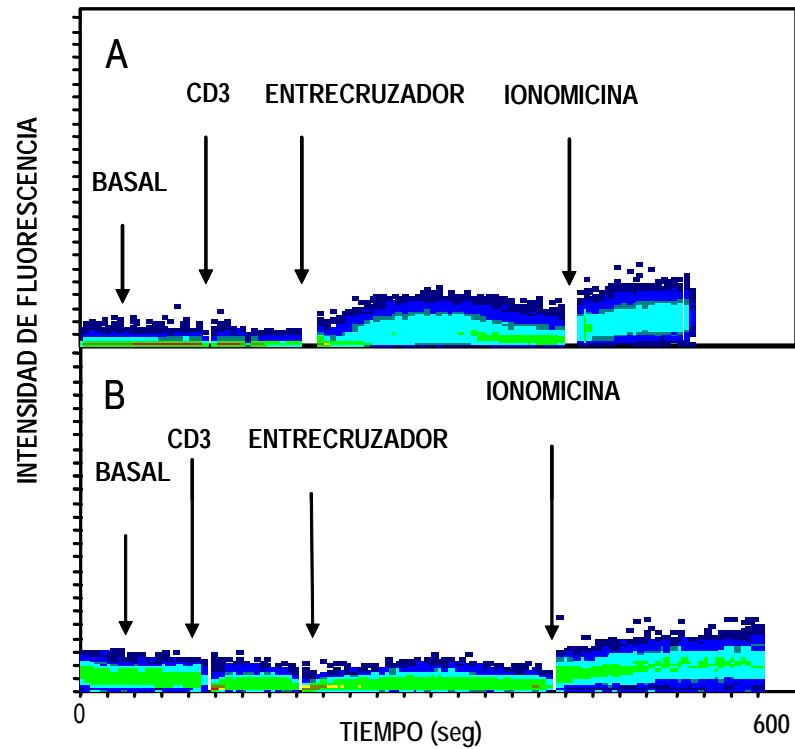
5. Realización de estudios de movilización de calcio tras estimulación con mitógenos en adenocarcinoma gástrico

5.1. Líneas celulares HVS procedentes de linfocitos T de mucosa

Dado el papel que CD3 ζ desempeña en la transducción de señales hacia el núcleo celular, medimos la movilización de calcio tras la estimulación de las líneas celulares con diferentes estímulos tales como anticuerpos frente a α CD3 y un entrecruzador, así como ionóforos tales como la ionomicina. La medida de la liberación de calcio al citoplasma se realiza por citometría de flujo utilizando el Fluo3AM, una sustancia que emite fluorescencia al unirse al calcio en el citoplasma celular. Mediante la utilización de α CD3 y de un entrecruzador medimos la liberación de calcio al citoplasma a través de TCR-CD3, vía donde habíamos descrito previamente un defecto de proliferación celular (Valeri *et al.*, 2003). La utilización de ionomicina, ionóforo utilizado como control, sirve para observar la cantidad de calcio que es almacenada en el retículo endoplasmático, ya que la ionomicina crea un canal en la membrana del retículo liberándose todo el calcio que se encuentra en él almacenado. Los tiempos empleados para añadir los estímulos fueron elegidos, tras previas pruebas, por ser aquellos en los que se producía la máxima liberación de calcio.

Como la liberación de calcio al estimular a través de CD3 es similar en líneas de linfocitos T de mucosa de controles sanos de ambos linajes, tanto CD4 como CD8, se usaron ambas líneas de linfocitos T como control.

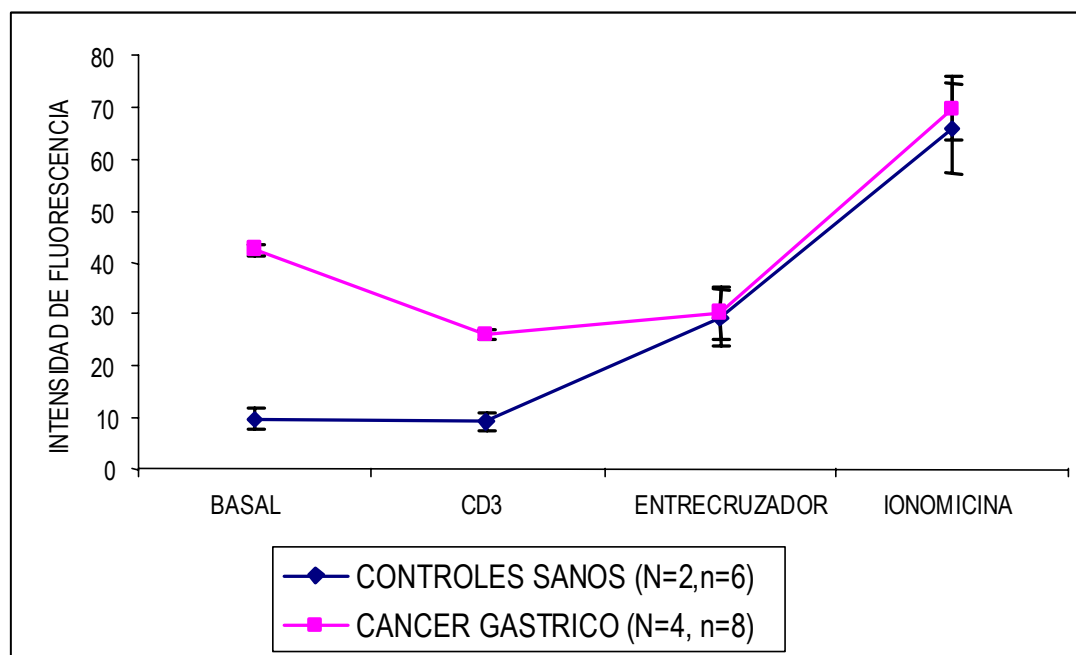
Figura IV.13. Liberación de calcio en línea de linfocitos T procedentes de mucosa de controles (A) o de pacientes con adenocarcinoma gástrico (B) de experimentos representativos. Los niveles de calcio fueron medidos consecutivamente: (i) Basal (ii) tras adición de α -CD3 (iii) tras añadir un anticuerpo entrecruzador y (iv) tras adición de ionomicina.



A) CONTROL SANO B) CÁNCER GÁSTRICO

La figura IV.13 muestra un experimento representativo donde se observa claramente como las líneas de linfocitos T procedentes de mucosa de los pacientes con adenocarcinoma gástrico tienen un defecto en la movilización de calcio si se comparan con las de los controles. Esto se detecta porque al añadir el entrecruzador hay un incremento en la intensidad de fluorescencia en los controles que no es visto en los pacientes.

Figura IV.14. Liberación de calcio en línea de linfocitos T procedentes de mucosa de controles y de pacientes con adenocarcinoma gástrico. Los niveles de calcio fueron medidos consecutivamente: (i) Basal (ii) tras adición de α -CD3 (iii) tras añadir un anticuerpo entrecruzador y (iv) tras adición de ionomicina.



Se representa la media y el error estándar de la media
N, número de líneas testadas. n, número de experimentos.

Los resultados de liberación de calcio a cada estímulo revelan que las líneas de linfocitos T procedentes de pacientes con adenocarcinoma gástrico están basalmente más activadas que las de los controles, como se muestra en la figura IV.14, ya que mientras que el valor de intensidad de fluorescencia para los controles a nivel basal es de 10 ± 2 el mismo valor para los pacientes es de 43 ± 1 .

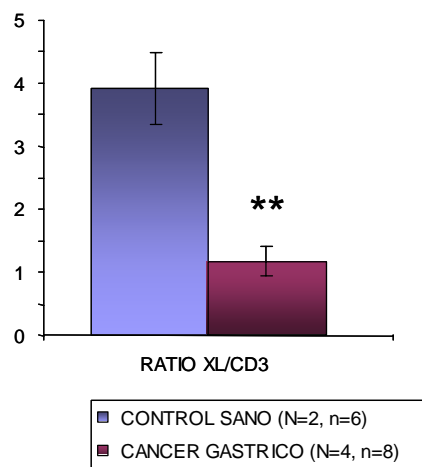
Los resultados de liberación de calcio al estimular a través del TCR-CD3, es decir, tras añadir el entrecruzador revelan que mientras que las líneas de linfocitos T procedentes de controles son capaces de liberar calcio al citoplasma aumentando la intensidad de fluorescencia de 9 ± 2 a 29 ± 6 , las líneas de linfocitos T procedentes de pacientes no liberan calcio al estimular a través del TCR-CD3, no aumentando, por tanto, la intensidad de fluorescencia (de 26 ± 1 a 30 ± 5).

La estimulación con ionomicina muestra cantidades similares de calcio en el retículo en ambos tipos celulares como se observa al comparar las intensidades de fluorescencia (66 ± 9 para los controles y 70 ± 6 para los pacientes) lo que indica que el defecto es en algún paso de la transducción de señales tras la estimulación celular y no en la capacidad de liberar calcio al citoplasma.

Debido al diferente estado basal entre las líneas de linfocitos T de controles sanos y de pacientes con adenocarcinoma gástrico para medir cuantitativamente el defecto de liberación de calcio se comparó la

proporción obtenida entre la liberación de calcio producida al añadir el entrecruzador y la liberación de calcio al añadir el anticuerpo frente a α CD3, prácticamente la misma que el encontrado basalmente.

Figura IV.15. Ratio entre la liberación de calcio producida al añadir el entrecruzador (XL) y la producida al añadir el α -CD3 en línea de linfocitos T procedentes de mucosa de controles y de pacientes con adenocarcinoma gástrico.



Se representa la media y el error estándar de la media

** $p < 0,01$

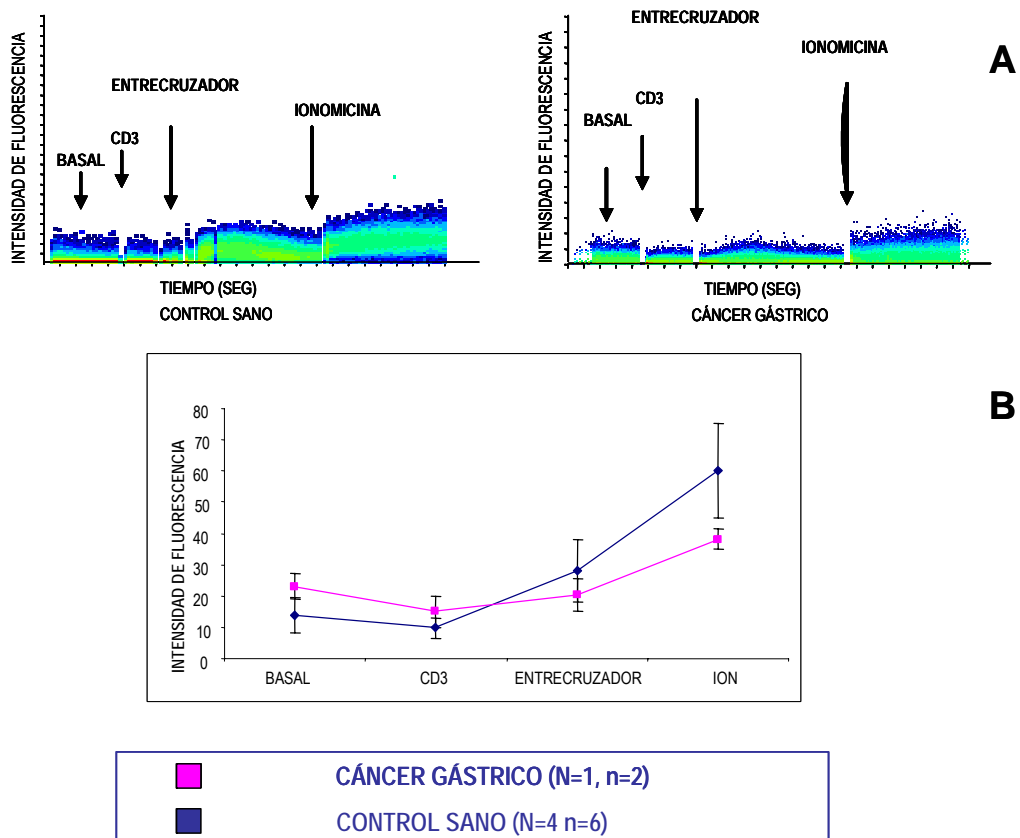
N, número de líneas testadas. n, número de experimentos.

La figura IV.15 muestra la proporción entre la liberación de calcio producida al añadir el entrecruzador y la liberación de calcio al añadir el anticuerpo frente a α CD3. Se observa que mientras las líneas de linfocitos T de controles sanos liberan $3,9 \pm 0,6$ veces más de calcio que el encontrado basalmente, las líneas de linfocitos T de pacientes con adenocarcinoma gástrico sólo liberan $1,2 \pm 0,2$ veces ($p < 0,01$).

5.2. Líneas celulares HVS procedentes de linfocitos T de sangre periférica

Como el defecto en CD3 ζ también se encuentra en líneas de linfocitos T de sangre periférica se propuso estudiar la movilización de calcio en estas líneas.

Figura IV.16. A) Movilización de calcio de un experimento representativo de la línea de linfocitos T procedentes de sangre periférica de un paciente con adenocarcinoma gástrico y de la línea de un control sano
 B) Liberación de calcio de un grupo de líneas de linfocitos T procedentes de sangre periférica de controles y de pacientes con adenocarcinoma gástrico.



Los niveles de calcio fueron medidos consecutivamente: (i) Basal (ii) tras adición de α -CD3 (iii) tras añadir un anticuerpo entrecruzador y (iv) tras adición de ionomicina.

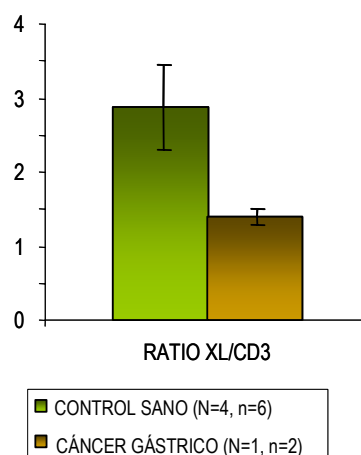
Se representa la media y el error estándar de la media
 N, número de líneas. n, número de experimentos.

La figura IV.16A indica que las líneas de linfocitos T procedentes de sangre periférica de los pacientes con adenocarcinoma gástrico tienen un defecto en la movilización de calcio si se compara con las de los controles. Esto se observa porque al añadir el entrecruzador se detecta un incremento en la intensidad de fluorescencia, es decir, un incremento en la movilización de calcio en los controles (de 10 ± 3 a 28 ± 10) que no se ve en los pacientes (de 15 ± 5 a 20 ± 5).

En la figura IV.16B se revela también que las líneas de linfocitos T procedentes de pacientes están basalmente más activadas (23 ± 4) que las líneas procedentes de los controles (14 ± 4).

Como también se observa una diferencia en la cantidad de calcio en el citoplasma a nivel basal se llevó a cabo la cuantificación del defecto de liberación observada tras activación con el entrecruzador. Para ello se hizo un cálculo del ratio entre la liberación de calcio al añadir entrecruzador y la liberación al añadir α CD3 tanto en líneas de linfocitos T de controles como de pacientes.

Figura IV.17. Ratio entre la liberación de calcio producida al añadir el entrecruzador (XL) y la producida al añadir el α -CD3 en línea de linfocitos T procedentes de sangre periférica de controles y de pacientes con adenocarcinoma gástrico.



Se representa la media y el error estándar de la media
N, número de líneas. n, número de experimentos.

La figura IV.17 revela que mientras que las líneas de linfocitos T de controles sanos liberan $2,9\pm 0,6$ veces más de calcio que el nivel basal, las líneas de linfocitos T de pacientes sólo liberan $1,4\pm 0,1$ veces. Los ratios son diferentes pero no significativamente, quizás por el bajo tamaño muestral.

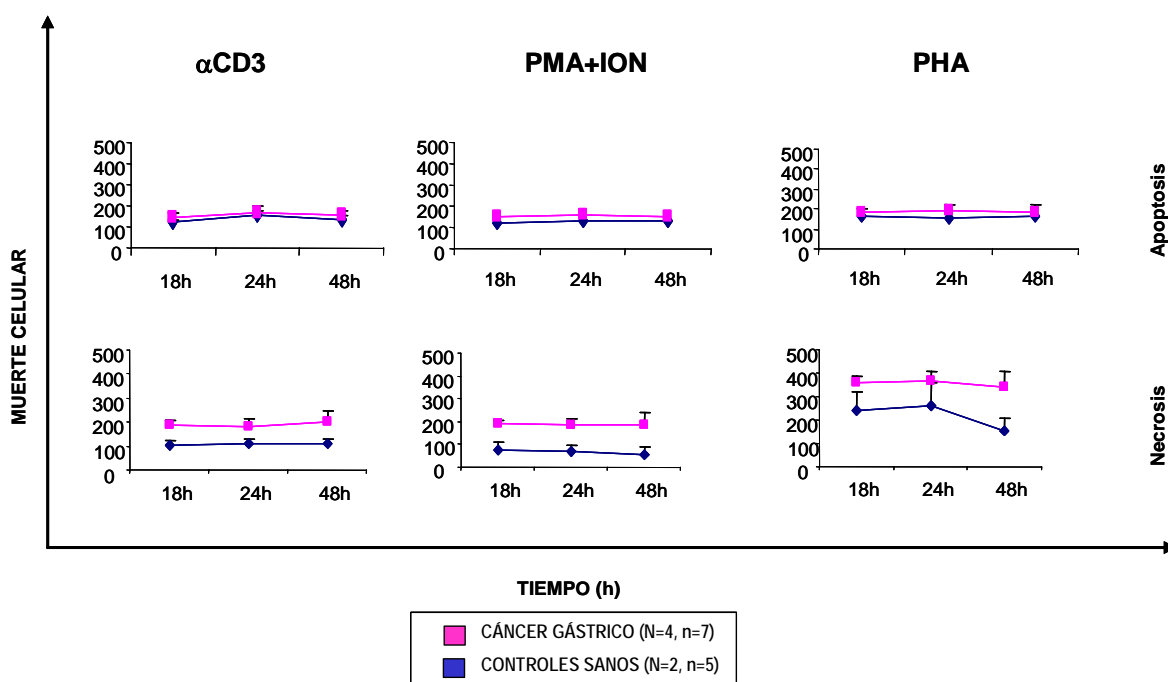
6. Realización de estudios de apoptosis

6.1. Líneas celulares HVS procedentes de linfocitos T de mucosa

Para asegurar que el defecto en la movilización de calcio no es debido a un incremento en la tasa de apoptosis o necrosis celular en pacientes con respecto a controles se realizaron los estudios de citometría de

flujo adecuados, utilizando anexina V e ioduro de propidio, al igual que fueron realizados para las células mononucleares de sangre periférica.

Figura IV.18. Análisis de apoptosis y de necrosis celular mediada por diferentes mitógenos y medida a distintos tiempos de líneas de linfocitos T de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma gástrico y de controles sanos.



Los resultados son mostrados como el porcentaje de células estimuladas respecto a las células no estimuladas para cada tiempo. Se representa la media \pm error estándar de la media. N, número de líneas. n, número de experimentos.

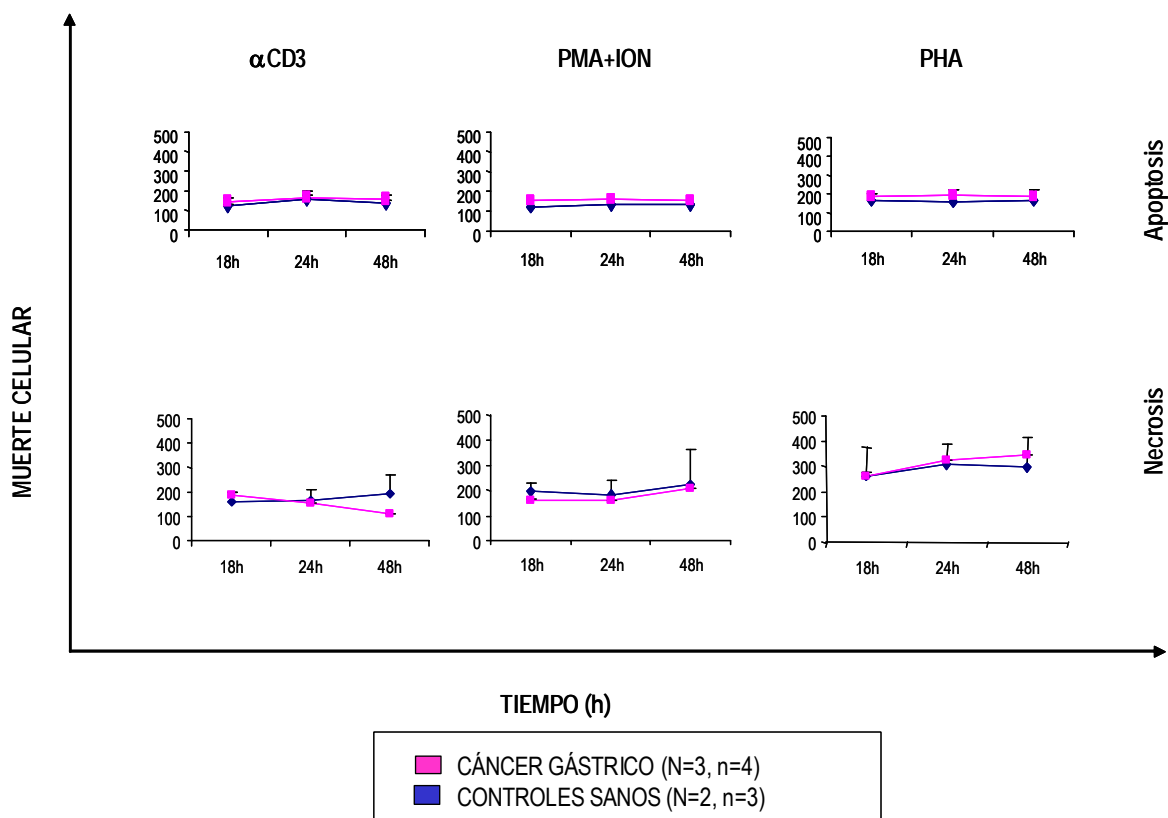
Se calculó el porcentaje de células estimuladas respecto a las células no estimuladas para cada tiempo. Esto se realizó debido a la diferente tasa de apoptosis y necrosis celular en el estado basal, es decir sin estimular, a los distintos tiempos.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura IV.18. No se observaron diferencias en la tasa de apoptosis entre pacientes y controles con las diferentes combinaciones de mitógenos en los distintos tiempos utilizados. Se encontraron ciertas diferencias, aunque no significativas en las tasas de necrosis celular para líneas de pacientes y de controles. Al no encontrar diferencias significativas en las tasas de apoptosis y necrosis celular entre controles y pacientes parece factible decir que los defectos en la movilización de calcio pueden ser debidos a la expresión alterada de la cadena CD3 ζ .

6.2. Líneas celulares HVS procedentes de linfocitos T de sangre periférica

Como los defectos encontrados también se encuentran en líneas de linfocitos T de sangre periférica se propuso estudiar la apoptosis y necrosis celular en líneas de linfocitos T de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma gástrico y de individuos controles con la misma metodología utilizada para las líneas de linfocitos T procedentes de mucosa.

Figura IV.19. Análisis de apoptosis y de necrosis celular mediada por diferentes mitógenos y medida a distintos tiempos de líneas de linfocitos T de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma gástrico y de controles sanos.



Los resultados son mostrados como el porcentaje de células estimuladas respecto a las células no estimuladas para cada tiempo. Se representa la media \pm error estándar de la media. N, número de líneas. n, número de experimentos.

En la figura IV.19 se muestran los resultados obtenidos y se revela que no hay diferencias entre pacientes y controles cuando se estimularon las células a diferentes tiempos (18, 24 y 48 horas) y con distintos estímulos (CD3, PMA+Ionomicina y PHA). Tampoco se encontraron diferencias en las tasas de necrosis celular entre líneas de pacientes y de controles. Al no encontrar diferencias en la tasa de apoptosis y necrosis celular entre controles y pacientes se puede concluir que los defectos en proliferación celular y, por tanto, en la movilización de calcio pueden ser debidos a la expresión alterada de la cadena CD3 ζ , como se había concluido con los resultados obtenidos para las líneas de linfocitos T procedentes de mucosa.

7. Estudio de la producción de interleuquina 2 por las líneas de linfocitos T de mucosa de pacientes y de controles

El hecho de que los niveles de IL-2 afecten a la expresión en la superficie de la cadena CD3 ζ , nos hizo pensar en la posibilidad de que las líneas produjeran IL-2 que, al actuar de una manera paracrina o autocrina, pudiera enmascarar los resultados obtenidos. De esta manera, las diferencias en la expresión de la cadena CD3 ζ encontradas entre líneas de linfocitos T de pacientes y de controles pudieran ser debidas a un defecto de secreción de IL-2 por parte de las líneas de linfocitos T de los pacientes.

Se midió la cantidad de IL-2 en el sobrenadante de los cultivos celulares procedentes de mucosa de pacientes y de controles tras 7 días sin IL-2 utilizando un kit de ELISA. No se detectó IL-2 en el sobrenadante de ninguna de las muestras, lo que permite afirmar que no secretan IL-2 al medio. Con ello podría concluirse que el defecto en la expresión de CD3 ζ no es debido a una diferencia de secreción de IL-2 entre las líneas de linfocitos T de pacientes y de controles sanos.

8. Análisis de la secuencia del promotor del gen de la cadena CD3 ζ de pacientes con adenocarcinoma gástrico

Dados los defectos en los niveles de expresión de la cadena CD3 ζ entre pacientes y controles, nos propusimos estudiar la secuencia del promotor del gen de la cadena CD3 ζ . El factor de transcripción que regula la expresión de CD3 ζ es Elf-1, el cual se une a esta región promotora. Se estudió la secuencia de 8 pacientes con adenocarcinoma gástrico y las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias obtenidas de 8 controles sanos así como las secuencias depositadas en el Genbank.

Figura IV.20. Secuencia del promotor del gen de la cadena CD3 ζ obtenido tras secuenciar el DNA genómico de 16 individuos españoles, 8 controles sanos y 8 pacientes con adenocarcinoma gástrico

```

-307                                                    -219
catcgagaactgtattgcctagagatggactttaccaatcaagataggaattagataagaattatTTTTTAAAAAaggagcat
-212                                                    -138
taaaacaatggTcaaatgagagaaaaagcaaaattcagacagacagatacacacaccccaaacctcaaacctccag
                                                    -54
ggcttctgcctgtgaaccgaaagggggagtgcaatttctggccctgctggcaggtgcttctcaaaaggccccacagtcctc
                                                    +1
cacttctggggaggtagctgcagaataaaaccagcagagactccttttctct/aaccgtcccggccaccgctgcctcagcct
                                                    +64
ctgcctccagccttctgagggaaaggacaagatgaag

```

Los resultados obtenidos revelaron que no hay diferencias en la secuencia del promotor del gen de la cadena CD3 ζ entre el grupo de controles sanos y de pacientes (Figura IV.20). En la posición -77 (*) se encontró una inserción de una T en todas las secuencias obtenidas, cuando se comparó con la secuencia depositada en el Genbank. Un hallazgo similar fue previamente descrito en la literatura (Nambiar *et al.*, 2001a). La secuencia por nosotros obtenida, dada su diferencia con la existente en el Genbank, fue depositada en el mismo y se le asignó el número de acceso AY839629.

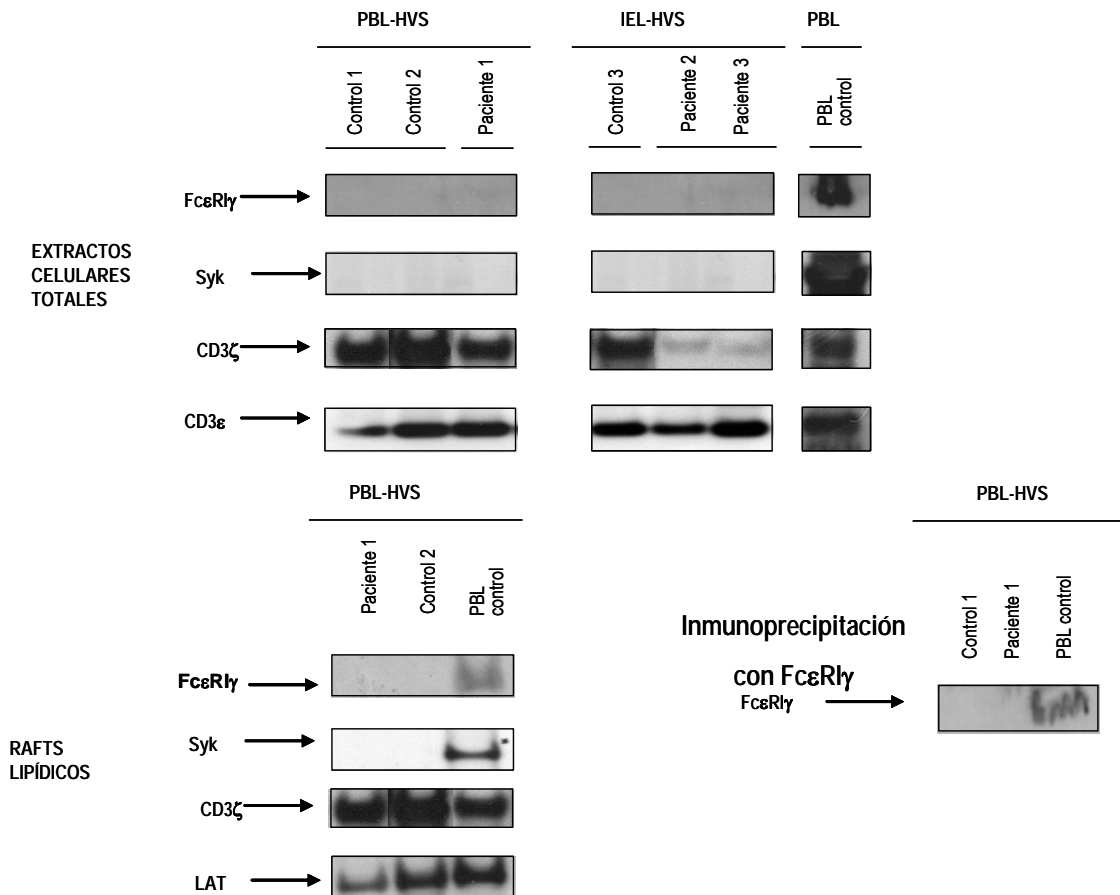
9. Estudio de la expresión de Fc ϵ R γ y Syk de líneas de linfocitos T procedentes de sangre periférica y de mucosa de pacientes con adenocarcinoma gástrico y de individuos controles.

Como se puede constatar en la bibliografía, la pérdida de expresión de la cadena CD3 ζ no sólo se produce en linfocitos T de personas con cáncer o, concretamente, en personas con adenocarcinoma gástrico. Existen otras enfermedades en las que también se produce esta pérdida, como son las enfermedades autoinmunes y ciertas infecciones. Dentro de las enfermedades autoinmunes en el LES se ha observado, a diferencia del cáncer, que los linfocitos T presentan una hiperproliferación y se ha demostrado que es debido a la aparición de la cadena γ del receptor de la fracción constante de la IgE, con estructura similar a CD3 ζ , y que sustituye la pérdida de CD3 ζ (Enyedy *et al.*, 2001). Esta cadena, en vez de utilizar ZAP70 para la transducción de señales, utiliza Syk (Shiue *et al.*, 1995a), más potente que ZAP70, lo que explica la hiperproliferación en las células de estos pacientes (Taylor *et al.*, 1997).

En la literatura no está muy claro si esta sustitución, de CD3 ζ por Fc ϵ R γ , se da también en cáncer (Mizoguchi *et al.*, 1992; Aoe *et al.*, 1995). Por ello, nos propusimos estudiar por western-blot e inmunoprecipitación si las líneas de linfocitos T procedentes de mucosa y de sangre periférica de pacientes con

adenocarcinoma gástrico presentan estas dos proteínas en ausencia de IL-2. Como control se utilizaron linfocitos de sangre periférica donde están incluidas las células NK y NKT, que sí expresan Syk y FcεRγ.

Figura IV.21. Expresión de CD3ζ, Syk y FcεRγ por western-blot e inmunoprecipitación en líneas de linfocitos T de sangre periférica y de mucosa tras siete días sin IL-2 en el medio de cultivo.



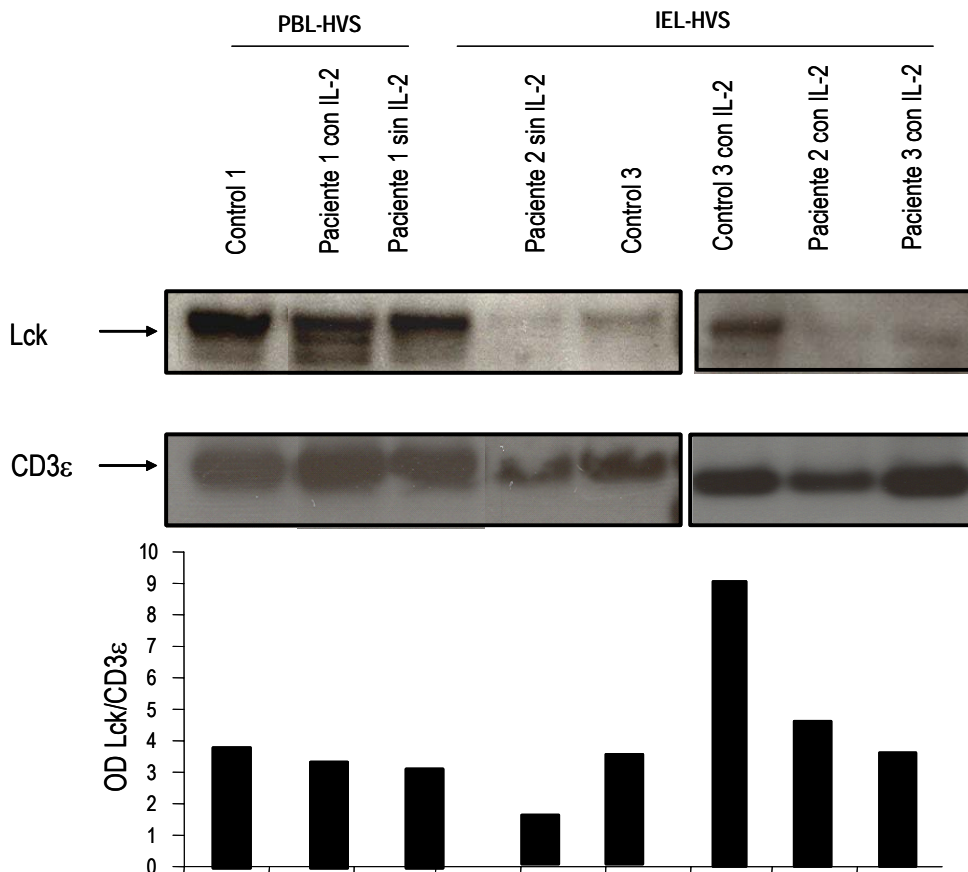
PBL-HVS líneas de linfocitos T procedentes de sangre periférica
 IEL-HVS líneas de linfocitos T procedentes de mucosa

En la figura IV.21 se observa que en las líneas de linfocitos T tanto procedentes de mucosa como de sangre periférica tras siete días sin IL-2 que presentan una disminución en la expresión de CD3ζ no expresan ni la cadena γ del receptor para la IgE ni la proteína quinasa Syk. El estudio de la presencia de la cadena γ y de la proteína Syk se realizó tanto en extractos celulares totales como en rafts lipídicos. Como proteínas control se utilizaron CD3ε para el estudio de los extractos celulares totales y LAT como proteína que se acumula en los rafts lipídicos.

10.-Estudio de la expresión de Lck y ZAP70 en líneas HVS procedentes de sangre periférica y de mucosa de pacientes con adenocarcinoma gástrico y de individuos controles.

Además del defecto de expresión de la cadena CD3 ζ , pudieran existir defectos en otras proteínas importantes en la transducción de señales. En la bibliografía se encuentran referencias sobre el defecto de expresión de proteínas como Lck. Por ello nos propusimos estudiar la expresión de Lck en líneas de linfocitos T, ya sea procedentes de tejido como de sangre periférica, de pacientes con adenocarcinoma gástrico y compararlos con controles sanos. Además de CD3 ϵ , usamos ZAP70 como control.

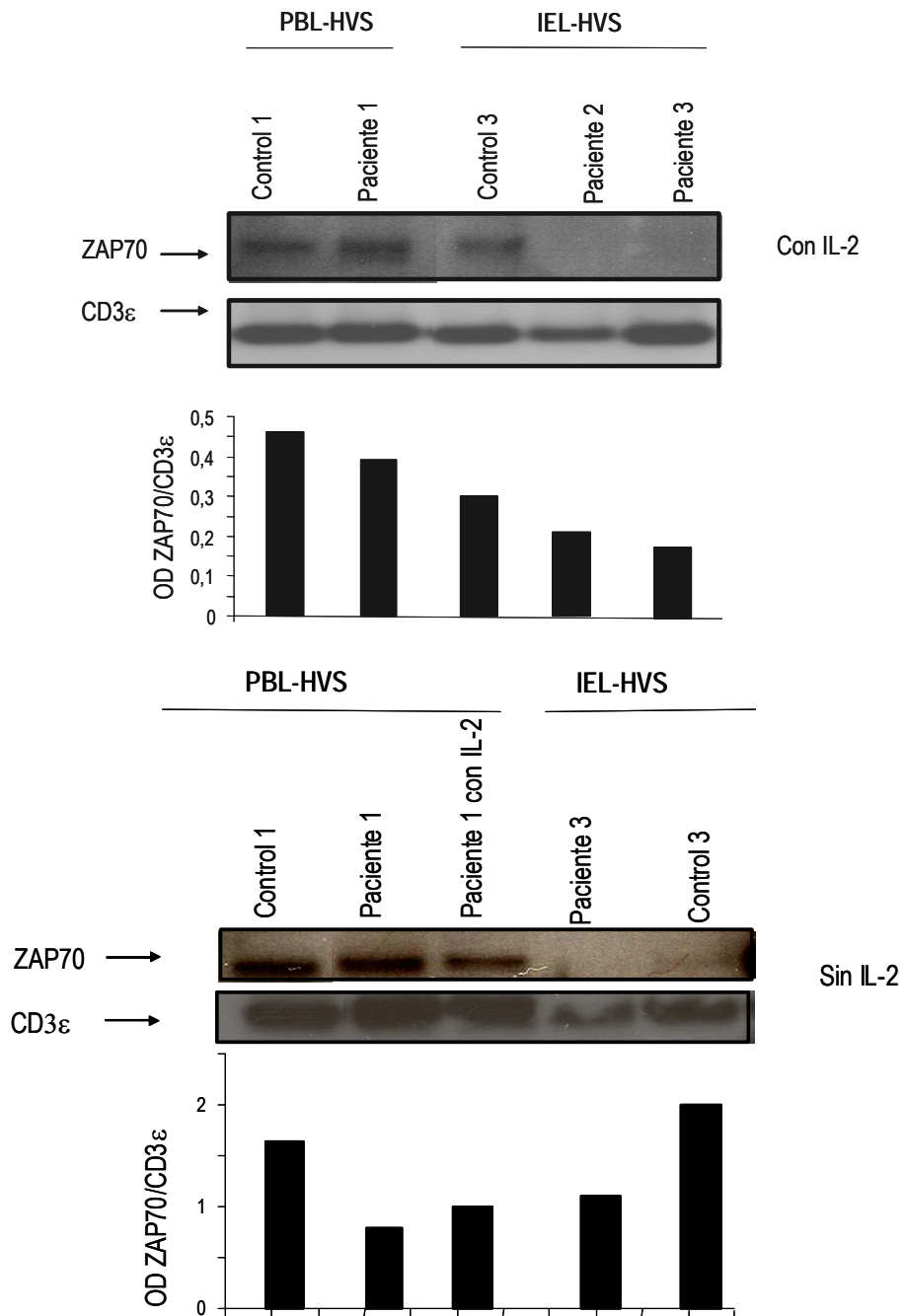
Figura IV.22. Expresión de Lck y CD3 ϵ por western-blot en líneas de linfocitos T de mucosa y de sangre periférica con y sin IL-2 en el medio de cultivo.



El análisis del densitometrado de las bandas de Lck de los cultivos se muestra debajo de sus respectivos geles.

La figura IV.22 muestra una disminución de expresión de Lck en las líneas de linfocitos T procedentes de tejido de pacientes con respecto a las líneas de controles, y en las líneas de linfocitos T procedentes de sangre periférica fijándose en el análisis por densitometrado. Las diferencias encontradas parecen ser independientes de IL-2 ya que tanto en ausencia o en presencia de IL-2 se observa el defecto de expresión.

Figura IV.23. Expresión de ZAP70 y CD3ε por western-blot en líneas de linfocitos T de mucosa y de sangre periférica con y sin IL-2 en el medio de cultivo.



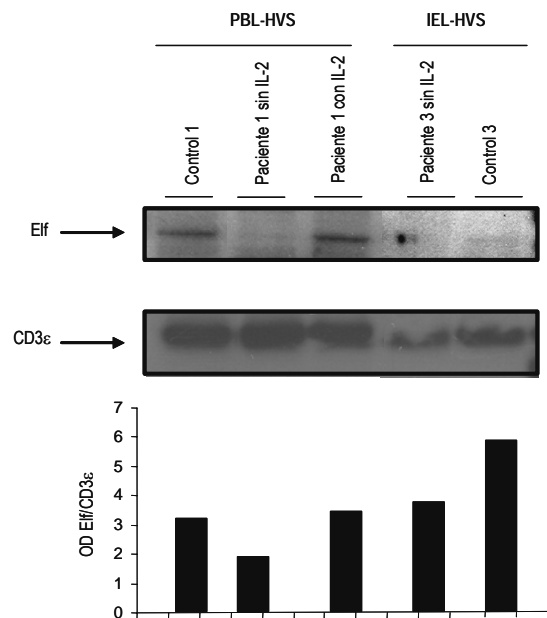
El análisis del densitometrado de las bandas de ZAP70 de los cultivos se muestra debajo de sus respectivos gels.

Al analizar ZAP70 se observa (Figura IV.23) que su expresión está disminuida en líneas de linfocitos T procedentes de tejido y en líneas de linfocitos T de sangre periférica, en comparación con líneas procedentes de controles. Así que, a diferencia de lo referido a la bibliografía (Torelli *et al.*, 2003) su expresión está disminuida en linfocitos T de tejido de pacientes con adenocarcinoma gástrico no pudiéndose, por tanto, utilizar como proteína de control de carga. Además su expresión es independiente de la IL-2, ya que tanto en presencia o en ausencia de esta citoquina existe un defecto de expresión.

11. Estudio de la expresión de Eif en líneas HVS procedentes de sangre periférica y de mucosa de pacientes con adenocarcinoma gástrico y de individuos controles.

Eif es el factor de transcripción que regula la expresión del gen de CD3 ζ . Pudiera ocurrir que el defecto de expresión de CD3 ζ fuera debido a un defecto de expresión de este factor de transcripción, así que nos propusimos estudiar su expresión por western-blot. Dada la dependencia de la cadena CD3 ζ con la IL-2 no parece descabellado pensar que el factor de transcripción que regula la expresión de su gen también dependa de esta interleuquina así que realizamos los experimentos en presencia y en ausencia de IL-2.

Figura IV.24. Expresión de Eif por western-blot en líneas de linfocitos T de mucosa y de sangre periférica con y sin IL-2 en el medio de cultivo.



El análisis del densitometrado de las bandas de Eif de los cultivos se muestra debajo de sus respectivos geles.

Al analizar la figura IV.24, parece que se observa una dependencia del factor Elf de la presencia de la IL-2 ya que no se encuentran diferencias en su expresión entre líneas de linfocitos T de controles y de pacientes con adenocarcinoma gástrico en presencia de IL-2, que sí se ven en ausencia de IL-2, encontrándose una menor expresión en las líneas de linfocitos T de pacientes con adenocarcinoma gástrico, tanto de mucosa como de sangre periférica, con respecto a los controles sanos.

12. Estudio de la relación de la expresión de la cadena CD3 ζ y la interleuquina 2

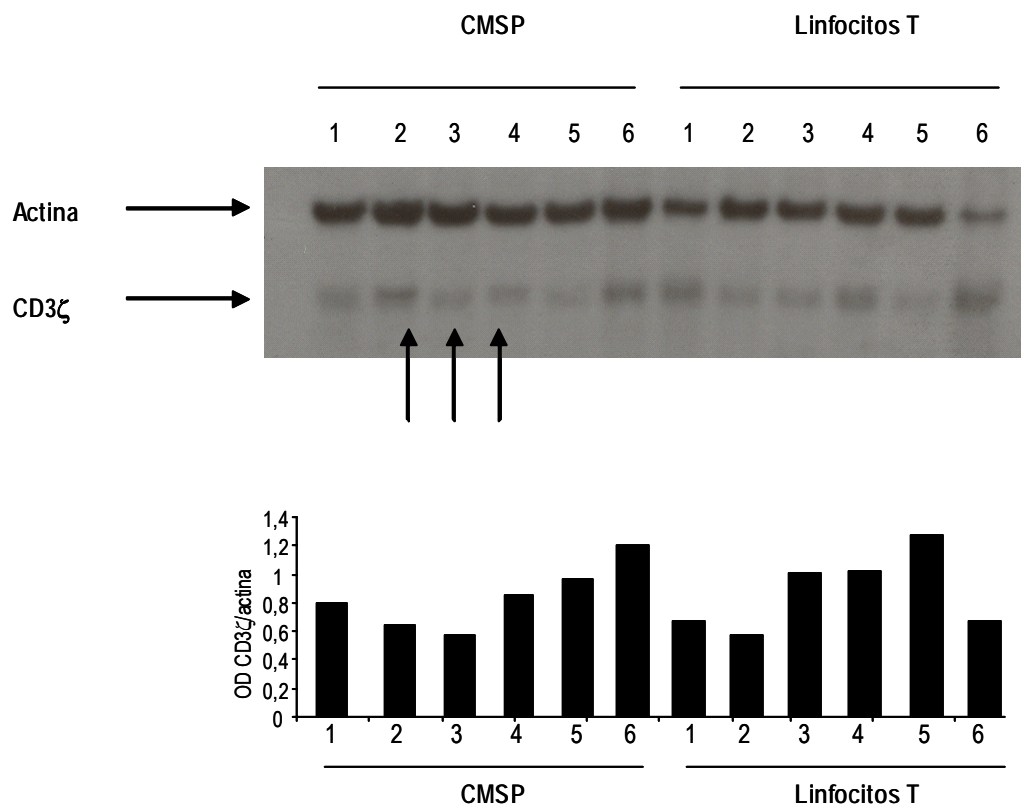
Por lo poco publicado en la bibliografía, en la que se observa como la administración de IL-2 restaura, no sólo la expresión de CD3 ζ , sino también ciertas funciones celulares, y los resultados obtenidos, parece claro que la IL-2 regula la expresión de CD3 ζ , así que nos propusimos estudiar este efecto sobre linfocitos T de controles sanos, según el protocolo de estimulación mostrado en materiales y métodos (apartado 4.5.). El IFN- γ se usa porque es capaz de disminuir la expresión de la cadena CD3 ζ en ratones (Bronstein-Sitton *et al.*, 2003). Este estudio se llevó a cabo por western-blot y por citometría de flujo.

12.1. Western-blot

Para ello se estimularon CMSP y linfocitos T purificados de sangre periférica de controles sanos con α CD3 y α CD28. Estas mismas células se incubaron con IFN γ sólo o en combinación con IL-2, durante 24, 48 y 72 horas. Como control se utilizó la actina cuya expresión no varía con los diferentes estímulos utilizados.

El efecto producido por el IFN γ y la IL-2 era más notable a las 72 horas aunque ya se percibía a las 24 horas. Por western-blot observamos que el IFN γ disminuye la expresión de CD3 ζ (Figura IV.25, n^o3) en CMSP pero no en linfocitos T purificados y que la IL-2 es capaz de revertir el efecto del IFN- γ , de tal manera que el nivel de expresión de CD3 ζ es mayor que sólo con IFN γ (Figura IV.25, n^o4). El IFN γ no disminuye la expresión de CD3 ζ en linfocitos T purificados, seguramente porque el efecto no es directo sobre linfocitos T sino sobre otra población celular, aunque este efecto se observe, finalmente, en linfocitos T.

Figura IV.25. Expresión de CD3 ζ y actina en CMSP y linfocitos T purificados de sangre periférica de un control sano tras 72 horas de estimulación.

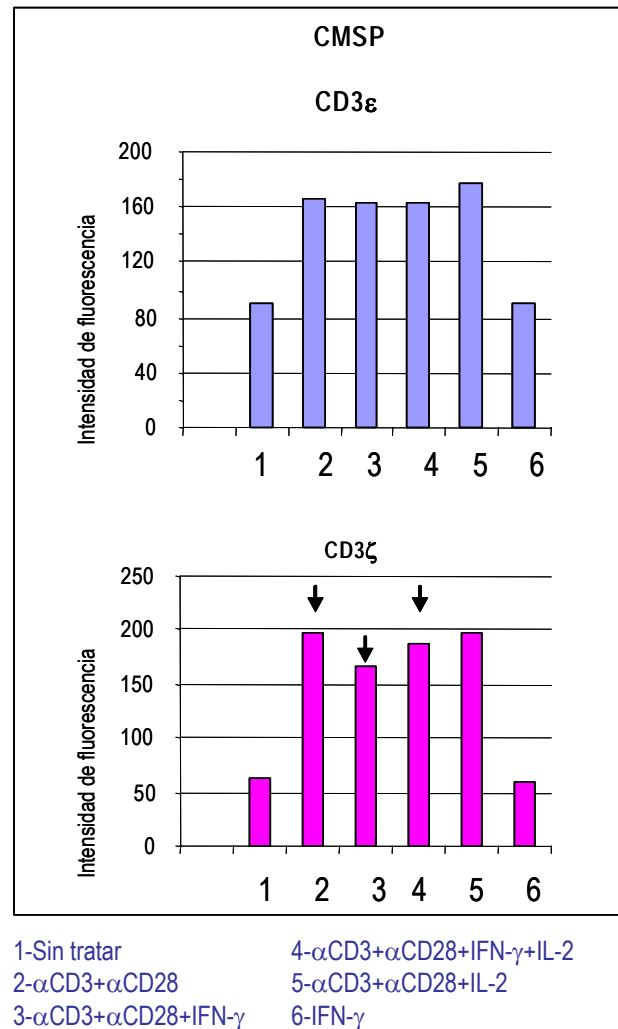


1-Sin tratar
 2- α CD3+ α CD28
 3- α CD3+ α CD28+IFN- γ
 4- α CD3+ α CD28+IFN- γ +IL-2
 5- α CD3+ α CD28+IL-2
 6-IFN- γ

Las flechas indican el efecto del IFN- γ y de la IL-2 en la expresión de CD3 ζ

12.2. Citometría de flujo

Figura IV.26. Intensidad de fluorescencia de CD3 ζ y de CD3 ϵ en CMSP de un control sano tras 72 horas de estimulación.



Las flechas indican el efecto del IFN- γ y de la IL-2 en la expresión de CD3 ζ

La citometría de flujo confirma lo obtenido por western-blot. El IFN γ disminuye la expresión en superficie de CD3 ζ en CMSP (Figura IV.26 n°3) y la IL-2 es capaz de revertir el efecto del IFN γ , dando lugar a una mayor expresión de CD3 ζ (Figura IV.26 n°4). Como control se utilizó CD3 ϵ que no se ve influido por el IFN γ ni la IL-2. Tal como ocurría con western-blot, el mayor efecto se ve a las 72 horas.

VI. DISCUSIÓN

V. DISCUSION

Este trabajo intenta esclarecer la causa de la expansión de la masa tumoral analizando el perfil inmunológico de pacientes con adenocarcinoma gástrico y, más concretamente, realizando el estudio en células T de sangre periférica y de mucosa utilizando líneas de linfocitos T obtenidas tras transformación con *Herpesvirus saimiri*.

1. Estudio de los parámetros clínicos y su asociación con el perfil inmunológico (fenotípico y funcional) en pacientes con adenocarcinoma gástrico.

Los pacientes con cáncer gástrico son clasificados de acuerdo con sus características clínicas (estadio, curabilidad), quirúrgicas (tipo de resección, gastrectomía) y anatomopatológicas. Estos parámetros muestran una estrecha relación con el pronóstico de los pacientes.

La capacidad del sistema inmune para dar lugar a una respuesta puede estar afectada en los pacientes que sufren un proceso tumoral y se han implicado factores derivados del tumor en este evento (Rodríguez *et al.*, 2003b; Mizoguchi *et al.*, 1992; Lockhart *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2001). Sin embargo, datos recientes de nuestro grupo, usando líneas de linfocitos T estables durante largo tiempo (Valeri *et al.*, 2003), han mostrado que el defecto es inherente a los linfocitos T de pacientes con adenocarcinoma gástrico, lo cual explicaría la falta de respuesta del sistema inmune.

Esto sugiere que si el evento tumorigénico ocurre en un individuo con un defectuoso sistema inmune, las células tumorales progresarían más libremente y la enfermedad, finalmente, se manifestaría clínicamente. Por el contrario, si este evento ocurre en un individuo con un correcto funcionamiento de su sistema inmune, las células tumorales verían limitada su posibilidad de diseminación y el individuo estaría libre de enfermedad. Si esto fuera así, los pacientes con una peor condición clínica (ENR+) podrían presentar algún parámetro característico que determine su perfil inmunológico: una disminución de la cantidad de células inmunes competentes o una pobre respuesta proliferativa.

1.1. Análisis fenotípico

CD3, un marcador presente en la superficie de los linfocitos T, es encontrado en el $48\pm 6\%$ de las células de los pacientes incluidos en el grupo ENR- y en un $39\pm 6\%$ de las células del grupo de pacientes ENR+. Esto es significativamente menor, en ambos casos, que lo obtenido para el grupo control ($75\pm 2\%$) (Tabla IV.1). Este descenso en la expresión es a expensas de células CD4+ y CD8+, cuyos porcentajes son significativamente menores en pacientes con respecto a controles. Este decremento de células CD3+ es relevante y debe reflejar la existencia de una población de células T alterada en pacientes con cáncer, un hallazgo que explicaría la baja respuesta proliferativa encontrada tras la estimulación por esta vía.

No está claro qué representa la población CD3-. Asumiendo que son linfocitos T (células no linfoides, tales como células epiteliales o fibroblastos están claramente descartados), éstos pueden representar células que expresan una forma inusual del complejo CD3 no reconocido eficientemente por los anticuerpos usados para su detección.

Más relevantes son los resultados respecto al marcador CD45. La población de células CD45+ está selectivamente disminuida en el grupo de pacientes pertenecientes al grupo ENR+ ($72\pm 11\%$), significativamente diferente al valor obtenido para el grupo ENR- ($89\pm 5\%$, $p=0,035$) o para el grupo control ($96\pm 1\%$ $p<0,0001$), mientras que estos dos grupos no difieren entre sí (tabla IV.1). Este marcador, por tanto, es capaz de identificar al grupo de pacientes con peor pronóstico.

CD45 es una glicoproteína de la superficie celular expresada exclusivamente en células del sistema hematopoyético. Identificada como uno de los primeros miembros de las fosfatasa de tirosinas (*protein tyrosine phosphatases*, PTPs), es un componente crucial en la maquinaria de transducción de señales de linfocitos ya que juega un papel primordial en la proliferación de linfocitos T tras la estimulación por antígeno (antígeno tumoral). No está claro qué representan las células CD45-. Pueden ser leucocitos con una expresión alterada o ausente de CD45, células tumorales circulantes (*circulating tumor cells*, CTC), carentes de CD45 y detectadas en algunos tipos de cáncer (Moreno *et al.*, 2005), o ambos tipos celulares.

Existen otros marcadores de superficie como CD2, CD28 y CD45RA que presentan diferencias de expresión según el grupo de pacientes. Los resultados obtenidos para estas moléculas no son tan contundentes como para poder utilizarlos como marcadores de clasificación (tabla IV.2).

La disminución de la población CD2, molécula de adhesión en la superficie de linfocitos T, es encontrado en el $67\pm 7\%$ de las células de los pacientes incluidos en el grupo ENR- y en un $36\pm 22\%$ de las células del grupo

de pacientes ENR+. Ambos son significativamente menores que lo obtenido para el grupo control ($82\pm 2\%$), siendo el valor para ENR+ menor que para el grupo ENR-. CD2 es una molécula coestimuladora que promueve la interacción física de la célula T con la célula presentadora de antígeno (APC) por la unión a su ligando CD58. La traslocación de CD2 a los rafts reorganiza la membrana permitiendo al TCR unirse al complejo MHC/péptido, dando lugar a una estimulación sinérgica del TCR y de CD2. CD2 participa en diferentes vías de señalización: aumenta la respuesta a IL-12 por parte de las células T activadas, revierte la anergia de células T, aumenta la adhesión celular y la respuesta de la célula T tras el reconocimiento antigénico. Si su expresión está disminuida en pacientes, y en mayor o menor grado según su situación clínica, esto daría lugar a que no se establecieran las interacciones adecuadas TCR-MHC para una correcta transducción de señales, lo que generaría un defecto de activación del linfocito T que, por tanto, no actuaría correctamente para intentar frenar la diseminación del tumor.

La disminución de la población CD28+, molécula coestimuladora en la superficie de linfocitos T, es encontrado en el $38\pm 7\%$ de las células de los pacientes incluidos en el grupo ENR- y en un $26\pm 8\%$ de las células del grupo de pacientes ENR+. Está descrito que existe una disminución de la expresión de CD28 en linfocitos T infiltrantes de tumor de pacientes con cáncer (Lopez *et al.*, 1998) pero no se ha estudiado la relación con la situación clínica. En este trabajo se ha observado que ambos grupos de pacientes presentan una menor expresión que lo obtenido para el grupo control ($52\pm 4\%$), pero sólo es significativo para el grupo ENR+. CD28 es una molécula de coestimulación requerida para la activación de células T. Se sabe que las células del epitelio gástrico expresan B7.1 y B7.2, los receptores de CD28, y que se requieren para la activación de la célula T. Si su expresión está disminuida en pacientes, y en mayor o menor grado según su situación clínica, no tendrían lugar las interacciones adecuadas entre los linfocitos T y las células gástricas tumorales, unión requerida para bloquear su crecimiento y, por tanto, permitiendo la diseminación del tumor.

El porcentaje de células CD45RA es marcadamente menor en el grupo de pacientes ENR+ ($34\pm 17\%$) al compararlo con el porcentaje de células del grupo de pacientes ENR- ($69\pm 10\%$) y del grupo control ($70\pm 5\%$). El valor de CD45RA en el grupo de pacientes ENR+ es significativamente menor que el grupo control, siendo la diferencia no significativa al compararlo con los pacientes del grupo ENR-. La disminución del porcentaje de células CD45RA debería concordar con un aumento de la población CD45RO. Sin embargo, no se observa así quizás por el bajo número de pacientes analizados para este marcador y los errores inherentes al experimento.

CD45RA es una isoforma de CD45 expresada por las células T vírgenes, que cuando se activan pasan a expresar CD45RO. La disminución en CD45RA y el aumento en CD45RO, en CMSP de pacientes en una peor situación clínica, puede reflejar un estado de activación de las células.

Juntos, estos resultados (principalmente, el porcentaje de células CD45+) indican claramente una alteración en el perfil de las células inmunes competentes de los pacientes, y sugieren que la pérdida de los niveles adecuados de estas células limita la capacidad del sistema inmune para crear una respuesta efectiva contra las células tumorales. El hecho de que los pacientes en una peor situación clínica muestren niveles más bajos de expresión de las poblaciones CD3+, CD4+, CD8+, CD28+ o CD45+, no es fortuito. Es precisamente en estos pacientes donde el sistema inmune está profundamente comprometido y el cáncer puede progresar más rápidamente.

1.2. Análisis de la respuesta proliferativa

Son interesantes los datos obtenidos tras estimulación con anticuerpos monoclonales frente a CD3 (un estímulo de membrana), de CMSP de individuos incluidos en el grupo ENR+, y que mostró claros defectos en la respuesta cuando se comparó con el grupo control (figura IV.1) o con el grupo de pacientes del grupo ENR-. Una vez más, como con CD45, la estimulación a través de CD3 es capaz de identificar el grupo de pacientes con peor estado clínico.

El hecho de que el número de células CD3+ esté reducido en los pacientes con cáncer (independientemente del grupo al que pertenezcan) cuando se compara con individuos control, y que la respuesta proliferativa a CD3 esté significativamente reducida sólo en el grupo ENR+ cuando se compara con el grupo de individuos control, revela que el defecto encontrado no es debido al bajo número de células. Este hallazgo nos demuestra que la incapacidad para proliferar es inherente a las células de estos pacientes.

Existen otras combinaciones de mitógenos que permiten distinguir los pacientes según el grupo al que pertenezcan. Como ya se ha comentado, existe un defecto de expresión de ciertas moléculas de membrana que concuerda con defectos encontrados en la proliferación celular utilizando combinaciones de mitógenos que utilizan estas moléculas para generar la activación del linfocito T (CD28, CD2, CD2-IL2, CD2-CD28 y CD2-CD3, tabla 3). En todas ellas, excepto en la estimulación a través de CD2, se observa una menor respuesta, aunque no estadísticamente significativa en todos, en los pacientes con peor pronóstico (ENR+) con respecto a los de mejor pronóstico (ENR-) y éstos, a su vez, con respecto al grupo control. Todas las combinaciones referidas utilizan moléculas cruciales para la correcta formación de la sinapsis inmunológica: unas son importantes por ser moléculas coestimuladoras, (CD28), y otras por ser moléculas de adhesión (CD2) y, por tanto, necesarios para la posterior estimulación del linfocito T a través de TCR-CD3, como ya se ha comentado antes.

Por otro lado, se observa también una disminución progresiva con respecto al grupo control en la respuesta a PMA+IL-2, de tal manera que el grupo ENR+ responde peor que el grupo ENR- y éste, a su vez, peor que el grupo control. PMA es un éster de forbol que es capaz de estimular a la proteína quinasa C (PKC), mimetizando la actividad del diacilglicerol (DAG). Se ha descrito que en ciertos tipos de cáncer existe un fallo en la actividad de la PKC, lo que concordaría con nuestros resultados. No sólo los pacientes con cáncer tienen un defecto en la actividad de PKC sino que este defecto es mayor o menor según su situación clínica.

Es de destacar que muchas de las combinaciones de mitógenos en las que se han observado defectos está presente la IL-2. Como veremos más adelante, existe una relación estrecha entre la IL-2 y los defectos encontrados en los linfocitos T de estos pacientes.

Tras el reconocimiento del antígeno por el receptor para antígeno de la célula T (TCR), se inicia una cascada de transducción de señales que regula la activación de los linfocitos T y requiere la actividad de tirosina quinasa (PTKs) que inducen la fosforilación de diferentes proteínas (Weiss *et al.*, 1994). Este proceso de activación toma lugar cuando el antígeno tumoral es reconocido por el linfocito T, paso requerido para la eliminación de la célula neoplásica. Sin embargo, y de acuerdo con nuestros resultados, esta habilidad parece alterada en los pacientes con adenocarcinoma gástrico, especialmente en los incluidos en el grupo de peor pronóstico.

En resumen, podemos concluir que la expresión de CD45, un procedimiento realizado rutinariamente en hospitales, y la respuesta proliferativa a CD3, pueden ser usados como marcadores de clasificación de pacientes con adenocarcinoma gástrico o para identificar pacientes que requieran unas estrategias terapéuticas más agresivas.

2. Utilización de las líneas HVS como modelo de estudio

La transformación de células T con el *Herpesvirus saimiri* ha permitido la obtención de líneas celulares estables de pacientes con adenocarcinoma gástrico y de controles sanos, tanto de sangre periférica como de mucosa. Estas líneas facilitan llevar a cabo estudios más amplios, imposibles de realizar con el reducido número de células obtenidas a partir de la continua extracción de sangre a los pacientes y, principalmente, a partir de muestras de tejido de pequeño tamaño, como las biopsias. Las líneas obtenidas son una fuente prácticamente inagotable de células con las que realizar estudios funcionales, genéticos o bioquímicos, que pueden llevar a un mayor entendimiento del papel de estas células en el adenocarcinoma gástrico. Además estas líneas permiten aislar a las células del efecto de cualquier factor o fármaco presente en el organismo, así como de cualquier

efecto ejercido por otra población celular, estas líneas nos permitirían intentar conocer el origen de la disminución de la cadena CD3 ζ .

Dado que todavía no está claro si la inflamación gástrica en el cáncer gástrico implica a células T expandidas localmente, al reclutamiento de células T que migran desde la sangre a la mucosa, o ambos, el presente estudio no sólo se centró en líneas procedentes de linfocitos T de la mucosa sino también en líneas de linfocitos T circulantes.

Los linfocitos T transformados con HVS, como se muestra en este trabajo, son dependientes de IL-2 pero crecen independientes de antígeno y mitógeno. Tienen una respuesta funcional normal a estímulos de membrana (anti-TCR-CD3) o transmembrana (ionóforos de calcio). Esta metodología, además, ha permitido el cultivo de líneas de linfocitos T procedentes de tejido (Martin-Villa *et al.*, 1998). Un trabajo previo de nuestro grupo (Valeri *et al.*, 2003) fue realizado en células T de sangre periférica y en sus respectivas líneas celulares procedentes de pacientes con adenocarcinoma gástrico, y se mostró que las líneas obtenidas mantenían defectos proliferativos similares a los presentes en CMSP.

Los linfocitos T poseen características diferentes según provengan de sangre periférica o de mucosa, dado que se trata de dos compartimentos anatómicos distintos: la proporción de cada subtipo celular dentro del total de leucocitos, así como sus características fenotípicas, es diferente en ambos. Así, por ejemplo, la mayor parte de los linfocitos T de la mucosa son CD4+ y expresan el marcador CD45RO (MacDonald *et al.*, 1994), mientras que en sangre periférica los niveles normales de linfocitos T cooperadores no suelen sobrepasar el 65%, y la mayor parte presentan el marcador CD45RA+. Estas características diferentes se reflejan en el tipo de poblaciones obtenidas al transformar con *Herpesvirus saimiri*. Así, las líneas T HVS obtenidas a partir de mucosa presentan fenotipo CD4+ mientras que las líneas procedentes de linfocitos T de sangre periférica pertenecen al fenotipo CD8+ en su totalidad. Posiblemente, el hecho de que el fenotipo predominante de los linfocitos T de mucosa sea CD4+, favorece que sean estas células las infectadas por el virus, mientras que en sangre periférica el fenotipo con mayor predisposición a la transformación por HVS es el CD8, tanto en pacientes como en controles.

Como se ha comentado en la introducción, las células T reguladoras CD4+CD25+ han sido recientemente descritas como una subpoblación que constituye el 5-10% del total de células T CD4+. Parecen controlar la tolerancia a los autoantígenos (Baecher-Allan *et al.*, 2005) y la inhibición de la proliferación de células T. Se ha descrito un incremento en el porcentaje de esta población en pacientes con diferentes tipos de cáncer (Ichihara *et al.*, 2003). En nuestro caso, sin embargo, tanto las líneas de linfocitos T de mucosa procedentes de controles

como de pacientes son CD4+CD25+ (Figura IV.5). Este hecho nos lleva a concluir que la transformación con HVS produce un aumento de expresión de CD25+ y no nos permite saber si las líneas procedentes de mucosa de pacientes con cáncer proceden realmente de esta población de células T reguladoras. Para poder conocer si esta subpoblación está representada en las líneas celulares obtenidas habría que estudiar la presencia de otro marcador característico tal como el factor transcripcional FOXP3 (Bacchetta *et al.*, 2005).

2.1. Defectos en la expresión de CD3 ζ

La cadena CD3 ζ es requerida para una correcta expresión del TCR en la superficie celular durante el desarrollo normal de la célula T tras su selección en el timo. Además, para que el TCR se exprese en superficie necesita formar un complejo estable con todas las cadenas de CD3, incluida CD3 ζ . Diferentes trabajos han publicado un defecto en la expresión de esta cadena en la superficie de linfocitos T de pacientes con cáncer (Baniyash, 2004; Lockhart *et al.*, 2001; Finke *et al.*, 1993) y en modelos animales (Mizoguchi *et al.*, 1992), postulándose que el defecto es debido a factores solubles secretados por el tumor. Lo relevante del presente trabajo es el mantenimiento del defecto de expresión de la cadena CD3 ζ en las líneas tras meses de cultivo, pudiéndose concluir que el defecto es inherente a las células. Varias son las causas que pueden explicar este defecto de expresión que pasamos a comentar a la luz de nuestros resultados, y de lo publicado en la literatura científica.

2.1.1. Efecto de la IL-2 en la expresión de la cadena CD3 ζ

Cuando se realiza el estudio en líneas de linfocitos T de sangre y de mucosa de pacientes con cáncer se muestra el mismo defecto de expresión de la cadena CD3 ζ que el descrito *in fresco* (Finke *et al.*, 1993; Lockhart, D.C. *et al.*, 2001; Taylor, D.D. *et al.*, 2001), siempre y cuando el cultivo se mantenga sin IL-2. Esto fue confirmado tanto por citometría de flujo (Figuras IV.7 y IV.10) como por western-blot (Figuras IV.8 y IV.11). Las líneas fueron crecidas *in vitro* durante varios meses y, está claro, que después de tanto tiempo ningún factor de origen tumoral ni ninguna otra población celular se encontrarán en el medio de cultivo. Parece, de acuerdo con el modelo HVS, que las células T de estos pacientes tienen una baja expresión de esta cadena de manera constitutiva. Estos resultados muestran que las líneas, tanto de mucosa como de sangre periférica, deben reflejar la situación presente *in vivo*: los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) y también los linfocitos circulantes de los pacientes con cáncer gástrico expresan en determinadas situaciones de estas células (por ejemplo, bajos niveles de IL-2, ver más abajo) bajas cantidades de CD3 ζ en la superficie de la membrana, situación que no se

encontrará en individuos con niveles adecuados de CD3 ζ y en los que el tumor no se ha diseminado. Esta situación daría lugar a una diseminación del proceso tumoral al evadir el control del sistema inmune.

Estos resultados obtenidos (baja expresión de CD3 ζ inherente a la célula T de estos pacientes) no contradicen, necesariamente, hipótesis previas. De hecho, una de ellas (la existencia de un factor tumoral como agente causante) puede ser compatible con nuestros resultados. La IL-2 es un elemento clave en la regulación de la expresión de la cadena CD3 ζ (Rabinowich *et al.*, 1996; De Paola *et al.*, 2003), y nuestros experimentos detectan una expresión defectuosa en líneas de linfocitos T de los pacientes cuando la IL-2 es retirada del cultivo. Además existen trabajos que observan un aumento de expresión de la cadena CD3 ζ al añadir IL-2 al medio de cultivo o *in vivo* (Tartour *et al.*, 1995; Meidenbauer *et al.*, 2002; Frydecka *et al.*, 2001) corroborando los resultados obtenidos en este estudio. Se ha propuesto que las células tumorales son capaces de actuar sobre el gen de la IL-2 y reducir las cantidades solubles de esta citoquina (Kolenko *et al.*, 1997; Lopez *et al.*, 1998). Podría ocurrir que la masa cancerosa limite la síntesis de IL-2 (por un factor derivado del tumor) lo que afectaría a la expresión de la cadena CD3 ζ en individuos predispuestos. Es decir, los factores solubles secretados por el tumor podrían afectar de una manera indirecta (por ejemplo, disponibilidad limitada de IL-2) a la expresión de la cadena CD3 ζ . De hecho, la eliminación de IL-2 del medio de cultivo afecta a tanto a líneas de pacientes con adenocarcinoma gástrico como a líneas de controles, aunque la reducción es más marcada en líneas procedentes de pacientes (Figuras IV.8 y IV.9 para líneas de linfocitos T procedentes de tejido y Figuras IV.11 y IV.12 para líneas de linfocitos T procedentes de sangre periférica), alcanzando diferencias estadísticamente diferentes cuando se compara con las líneas control. La hipótesis de la modulación de la cadena CD3 ζ inducida por IL-2 se puede constatar con los experimentos realizados en CMSP de controles sanos a los que se les consigue reducir la expresión de CD3 ζ utilizando IFN- γ y, luego, se reconstituye dicha expresión con IL-2 (Figuras IV.25 y IV.26). El efecto del IFN γ no es un efecto directo si no que probablemente lo ejerza a través de CMSP. La hipótesis más sostenible es que el IFN- γ actúa sobre los monocitos del cultivo, que producen especies reactivas de oxígeno y dan lugar a la disminución de la cadena CD3 ζ (Figura IV.25 y IV.26). Esta disminución de la cadena CD3 ζ es la que podría estar ocurriendo *in vivo* en la zona tumoral, de tal manera que en este entorno inflamatorio se podría dar lugar a una regulación de la expresión de ciertas proteínas del linfocito T.

Coincidiendo con los estudios de reconstitución de la expresión de la cadena CD3 ζ en linfocitos T de sangre periférica, hay estudios en donde la expresión de CD3 ζ se recobra en terapias basadas en la administración de IL-2 (Rabinowich *et al.*, 1996; Bukowski *et al.*, 1998; De Paola *et al.*, 2003) pero no siempre

coincide con una recuperación de la función de la célula T, medida como expresión y actividad tirosina quinasa y de ciertos factores de transcripción.

2.1.2. Incremento de la expresión de la arginasa I

Por otro lado, recientes experimentos (Rodríguez *et al.*, 2003a) apoyan la hipótesis de que macrófagos estimulados con IL-4 e IL-13 aumentan la expresión de la arginasa I (ASE-I) causando una rápida reducción de los niveles extracelulares de L-arginina e induciendo un descenso en la expresión de la cadena CD3 ζ , con el consiguiente descenso en la respuesta proliferativa. Dado que en nuestro modelo sólo están presentes líneas de linfocitos T, no podemos comprobar esta hipótesis.

2.1.3. Infiltración de los macrófagos asociados al tumor

También existen estudios que apuntan a que la disminución de la cadena CD3 ζ es debida a la infiltración de los llamados macrófagos asociados al tumor (tumor-associated macrophages, TAM) (Ishigami *et al.*, 2003). Estos macrófagos estarían presentes en el entorno inflamatorio causado por el sistema inmune al responder a la infección por *Helicobacter pylori*. En nuestro caso esto no puede ser así, ya que las líneas de células T transformadas son puras, sin la existencia de otro tipo celular en el cultivo.

2.1.4. Aumento de la tasa de apoptosis celular

Como ya se ha comentado, otros tipos de experimentos han apoyado la hipótesis de la existencia de un aumento de la tasa de apoptosis celular para explicar los defectos encontrados en la expresión de la cadena CD3 ζ . En el presente trabajo se ha podido comprobar que no existe mayor tasa de apoptosis o necrosis celular entre las líneas de los controles y de los pacientes (Figuras IV.18 y IV.19), contrariamente a lo descrito en la bibliografía (Saito *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2001). Además, se vió una tasa de crecimiento comparable entre las líneas de controles y de pacientes. El no observar aumento de apoptosis, a diferencia de lo descrito en la bibliografía, puede ser debido a que el tipo de apoptosis que se produce en linfocitos T es mediada por el contacto de FasL en la célula tumoral, con Fas en el linfocito T. Con el crecimiento de las líneas el contacto Fas-FasL ya no existe y, por lo tanto, estas células ya no entran en apoptosis por esta vía (Reichert *et al.*, 2002; Nagashima *et al.*, 2001).

2.1.5 Elementos reguladores de la expresión de la cadena CD3 ζ

Para seguir buscando el origen del defecto se estudiaron los elementos encargados de la regulación de la expresión de la cadena CD3 ζ , bien el promotor que regula la transcripción del gen o, bien, el factor de transcripción que se une al promotor del gen de la cadena CD3 ζ para permitir su transcripción, Elf-1. Elf-1 (*E-74-like factor*) es un factor de transcripción de la familia Ets (*E-26-specific*) y es crucial para la transcripción de la cadena CD3 ζ . Además, está implicado en la regulación de varios genes tales como las tirosina quinasas lck y lyn, CD4, la subunidad IL-2R α del receptor de la IL-2, GM-CSF e IL-2. Este trabajo muestra que el promotor del gen de la cadena CD3 ζ no está afectado en los pacientes (Figura IV.20) pero sí se observa una disminución en la expresión del factor de transcripción Elf-1 dependiente de IL-2 (Figura IV.24). La afectación de la expresión de Elf-1 explicaría no sólo el defecto de expresión de CD3 ζ , sino también de la proteína quinasa Lck. Como se ha comentado en la introducción, Lck es una tirosina quinasa importante en la transducción de señales a través del reconocimiento TCR-MHC, y que también está disminuida en las líneas procedentes de los pacientes con adenocarcinoma gástrico (Figura IV.22).

Dado que Elf es crucial para la síntesis de IL-2, parece lógico concluir que defectos en esta proteína afectarían la síntesis de la citoquina, importante en la activación del linfocito T, ya que mantiene la activación que se había producido inicialmente con el contacto antigénico a través del TCR-MHC.

2.1.6. Modificaciones epigenéticas

La existencia de otros mecanismos, tales como alteraciones epigenéticas, que podrían modificar la expresión no sólo de la cadena CD3 ζ sino de Elf o de la propia IL-2, transmitiéndolo a la descendencia han de ser tenidos en cuenta. Existen dos tipos de modificaciones epigenéticas: metilación del DNA y acetilación de histonas. Ambos tipos cooperan alternativamente para regular, por un lado, los eventos que se dan durante el desarrollo de los timocitos a células T en el timo y, por otro, en los cambios que sufre el linfocito T en sus diferentes etapas de desarrollo y activación, como en la aparición de las células de memoria. Las alteraciones en el repertorio del TCR están implicadas fuertemente con enfermedades alérgicas y autoinmunes, con lo que es concebible que existan inmunopatologías epigenéticas que tengan consecuencias en el desarrollo de tumores, al evitar la correcta acción del sistema inmune (Wilson *et al.*, 2005). Además, se ha descrito la existencia de este tipo de modificaciones en otras enfermedades que cursan con la disminución de la expresión de CD3 ζ , como el LES. Se ha encontrado que CREM (*cyclic AMP response element modulator*), elemento modulador de respuesta a cAMP de la unión de Elf al promotor de CD3 ζ y de IL-2, regula la deacetilación de histonas asociadas al

promotor, un efecto que limitaría la accesibilidad de la maquinaria de transcripción a su correspondiente promotor (Tenbrock *et al.*, 2005). La existencia de posibles modificaciones epigenéticas corroboraría el hecho de que el defecto encontrado en las líneas se mantenga tras meses de cultivo fuera del organismo, si bien este aspecto no se ha abordado en esta tesis.

No está muy claro si la metilación es un proceso reversible. Si los patrones de metilación actúan como señales biológicas para el bloqueo o expresión de ciertos genes, parece lógico pensar que estos patrones sean reversibles. En las líneas el entorno que había *in vivo* hostil deja de serlo, es decir, desaparecen las condiciones de inflamación, y la disminución en la expresión de la cadena CD3 ζ permanece, no produciéndose demetilación si es que este efecto es el que está actuando. A pesar de que la metilación produzca el bloqueo de expresión de la cadena CD3 ζ , algún evento tiene que darse lugar para estabilizar la expresión del TCR en superficie. Esto quiere decir que no pueden existir complejos TCR en superficie sin la expresión de CD3 ζ que los estabilice. Si se ha descrito qué ocurre en ausencia de los diferentes dominios ITAM del CD3 ζ por mutaciones, la falta de los dos dominios ITAM del extremo N^t dan lugar a la falta de inducción de la fosforilación de ZAP70 y de la movilización de calcio, es decir, casi toda la señalización, mientras que la falta del dominio ITAM del extremo C^t no permite la inducción del gen de la IL-2 (Sunder-Plassmann *et al.*, 1997; Tsuchihashi *et al.*, 2000). Algo curioso es que si estas mutaciones se producen en timocitos dobles negativos éstos no pueden diferenciarse mientras que si se producen en células maduras éstas son funcionales pudiendo proliferar y movilizar calcio tras estimulación (Aoe *et al.*, 1996), lo que indicaría que una cadena CD3 ζ truncada podría permitir la funcionalidad del linfocito T.

2.1.7. Posible sustitución de la cadena CD3 ζ por otras cadenas

La expresión alterada de CD3 ζ ha sido descrita en otras condiciones inflamatorias como osteoartritis (Sakkas *et al.*, 2004) y LES (Nambiar *et al.*, 2001a; Nambiar *et al.*, 2004; Tsuzaka *et al.*, 2003; Nambiar *et al.*, 2001b). Sin embargo, las células de estos pacientes muestran un estado hiperactivo (como se observa de sus respuestas proliferativas o movilización de calcio) cuando se comparan con individuos sanos, contrariamente a lo que ocurre en cáncer. Parece que en LES un procesamiento (splicing) aberrante en la región 3' no traducida del mRNA de la cadena CD3 ζ afecta a la estabilidad o transporte del mRNA, dando lugar al defecto de expresión de la proteína en células T (Nambiar *et al.*, 2001a). En ausencia de esta cadena, otras cadenas, como Fc ϵ R1 γ , de la misma familia que CD3 ζ , la reemplazan dando lugar a una mayor respuesta (Enyedy *et al.*, 2001). Esta conclusión no se puede aplicar a nuestras células, ya que cuando se analizó la existencia de la cadena Fc ϵ R1 γ

no se encontró ni en líneas de linfocitos T de sangre periférica ni de mucosa (Figura IV.21), coincidiendo con otros trabajos (Aoe *et al.*, 1995). Además, esto se corresponde con las diferencias encontradas en proliferación y movilización de calcio entre los diferentes tipos de pacientes (cáncer y LES) al compararlo con los individuos control, ya que mientras que la cadena CD3 ζ recluta ZAP70 para llevar a cabo la transducción de señales tras el reconocimiento antigénico, Fc ϵ R1 γ recluta y fosforila Syk, que es más potente que ZAP70 (Taylor *et al.*, 1997). Fc ϵ R1 γ y Syk en este caso serían los que promoverían la producción de IL-2. Al analizar la expresión de Syk tampoco se encontró ni en líneas procedentes de linfocitos T de mucosa ni de sangre periférica ni en linfocitos T procedentes de sangre periférica (Figura IV.21).

Por último podría producirse un aumento de los heterodímeros η - ζ u homodímeros η - η , que deberían formar parte sólo del 10% de los complejos TCR/CD3 de la superficie de la célula. El aumento de estos dímeros con menos dominios ITAM daría lugar a una disminución en la proliferación, ya que se ha descrito que la sustitución de CD3 ζ por CD3 η disminuye la respuesta de flujo de calcio y de IL-2 (Bauer *et al.*, 1991). Esta hipótesis no ha sido estudiada en la presente tesis doctoral.

2.2. Defecto en la proliferación celular

Nuestro trabajo revela que los linfocitos de los pacientes reaccionan de diferente manera a la ausencia de IL-2 (reduciendo la expresión de la cadena CD3 ζ) que los linfocitos T de individuos control. Esta disminución se acompaña también de una disminución en la proliferación de los linfocitos T ya que, como se ha visto en este trabajo, varios estímulos de membrana usados (IL-2, α -CD2, α -CD3) mostraban respuestas disminuidas en las líneas de los pacientes con respecto a los controles, una disminución que, además, se correlacionaba con el estado clínico de los pacientes. Esto indica que algunas de las vías de señalización de membrana no están trabajando adecuadamente. Todos los estímulos defectuosos, tienen en común el reclutamiento de la quinasa Lck así como la cadena CD3 ζ (Ellery *et al.*, 2002; Germain, 2002), elementos centrales en los primeros pasos tras la activación de los linfocitos T y ambas están alteradas de manera constitutiva en los pacientes con cáncer (Zou *et al.*, 1992). El malfuncionamiento de estas proteínas daría lugar a una falta de respuesta por parte de la célula T *in vitro* a varios estímulos, o *in vivo*, a los antígenos tumorales.

De acuerdo con los resultados, la habilidad del linfocito T está comprometida en el cáncer gástrico. Cuando se estimula el linfocito T a través del CD3 no moviliza calcio a los niveles de los controles tanto en líneas de linfocitos T de sangre periférica y de mucosa (Figura IV.14, IV.15 y IV.16). Algunas de las proteínas

anteriormente mencionadas, como Lck y CD3 ζ , pueden contribuir a ese defecto, ya que están situadas en los momentos más tempranos de la cascada de transducción de señales. Los resultados de movilización de calcio concuerdan con los trabajos previos del grupo usando líneas HVS de sangre de pacientes con adenocarcinoma gástrico. Estos trabajos concluyeron que los defectos encontrados en las líneas mantenían los defectos encontrados en linfocitos T de sangre periférica (pobre respuesta a α CD3 y a α CD2) con lo que estos defectos parecen ser intrínsecos a las células y no causados por un factor derivado del tumor (Valeri *et al.*, 2003). Varios estudios publicados han demostrado el defecto de Lck y CD3 ζ en CMSP de pacientes con adenocarcinoma gástrico (Mizoguchi *et al.*, 1992; Zou *et al.*, 1992; Loeffler *et al.*, 1992) así como defectos en la movilización de calcio, en TIL y CMSP (Reichert *et al.*, 1998; Salvadori *et al.*, 1994) coincidiendo con nuestros análisis de Lck y CD3 ζ . Además hay trabajos en los que se observa que la reconstitución con CD3 ζ mejora la movilización de calcio y la fosforilación de proteínas (Nambiar *et al.*, 2003b). Todos estos datos sirven para corroborar la validez de nuestro modelo.

En resumen, los trabajos aquí mostrados han revelado una disminución no sólo en la población CD3 ζ +, en concordancia con lo ya publicado, sino también en el número de moléculas de CD3 ζ presentes en la superficie de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma gástrico. Esta disminución daría lugar a un defecto de activación a través del TCR-MHC, lo que explicaría los defectos de proliferación celular del linfocito T en respuesta a mitógenos (Valeri *et al.*, 2003; Lopez-Santalla *et al.*, 2005) que daría lugar a la falta de eficacia en la respuesta frente a la infección y a la posterior expansión del tumor tras su formación. Esta disminución no puede ser debida a un aumento en la tasa de apoptosis, según han descrito algunos autores (Reichert *et al.*, 2002; Whiteside, 1999), ya que de acuerdo con los resultados obtenidos por nosotros (Figura IV.4), las tasas de apoptosis y necrosis celular son comparables entre las células procedentes de pacientes y de controles (Figura IV.4). Puesto que estas líneas han sido crecidas *in vitro* durante varios meses, ningún factor tumoral está implicado en estos hallazgos y, por lo tanto, parecen inherentes a las propias células de los pacientes.

3. Hipótesis de tumoración gástrica según resultados obtenidos

Con todos los resultados obtenidos, y utilizando la bibliografía publicada podríamos plantear una hipótesis acerca de los eventos que han tenido lugar *in vivo* en un paciente con adenocarcinoma gástrico.

3.1. Consecuencias de la infección por *Helicobacter pylori*

Como ya se comentó en la introducción, en la respuesta inmunológica local y sistémica durante la infección por *Helicobacter pylori* participan diferentes tipos celulares: linfocitos, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y las propias células epiteliales. Cuando el crecimiento de la bacteria se ve limitado en el lumen del estómago debido a la falta de nutrientes necesarios, la bacteria secreta una proteína denominada Cag (*cytotoxin associated gene*) que permeabiliza la membrana, consiguiendo así los nutrientes necesarios. Posteriormente, la bacteria activa la expresión de un potente factor quimiotáctico de neutrófilos, la interleuquina-8 (IL-8), por parte de las células epiteliales gástricas y secreta NAP (*neutrophil-activating protein*) que interacciona directamente con neutrófilos, monocitos y mastocitos. Todas estas células al ser atraídas al lugar de lesión, liberan gran variedad de mediadores químicos como citoquinas, eicosanoides, radicales libres de oxígeno, componentes del sistema de complemento y neuropéptidos, los cuales ejercen distintas funciones, relacionadas unas con otras, amplificando la respuesta inflamatoria y aumentando la proliferación celular. Este aumento conllevaría, según intensidad y persistencia, la posibilidad de inducir la aparición de errores de replicación celular, principalmente, por incremento oxidativo en el daño del DNA, es decir, cambios en la expresión de genes (inestabilidad genómica, mutaciones, hipermetilaciones...) lo que facilitaría el desarrollo del cáncer gástrico.

Entre los factores envueltos en la progresión de la enfermedad está la citotoxina VacA (*vacuolization cytotoxin*) secretada por la bacteria, que causa degradación vacuolar masiva de las células epiteliales dando lugar a una erosión epitelial. VacA también inhibe la proliferación de PBL inducida por coestimulación con CD28 por interferencia en la progresión del ciclo celular dependiente de IL-2. La inflamación del epitelio gástrico inducida por *Helicobacter pylori* está asociada a respuesta Th1 (D'Elios *et al.*, 1997). Los linfocitos T específicos de *Helicobacter pylori* expresan IFN- γ pero no IL-4 ni IL-5. El tipo de respuesta Th1 se cree que contribuye a la inflamación gástrica inducida por *Helicobacter pylori*.

En definitiva frente a una infección por *Helicobacter pylori* el huésped desarrolla una respuesta inmune que es inefectiva en eliminar la bacteria. El sistema inmune procesa y presenta antígenos de *Helicobacter pylori*. La presencia de ciertas citoquinas modula la respuesta linfocítica tipo 1 estableciendo una gastritis crónica.

Además, como se ha comentado en la introducción, sobrenadantes de cultivos con *H.pylori* inhiben la producción de IL-2 dependiente de mitógeno y la proliferación de linfocitos de sangre periférica, por la inhibición del factor de transcripción NFAT producida por VacA, lo que bloquea el incremento masivo de calcio en el

citoplasma. De esta forma, la acción producida por la bacteria generaría la disminución de la expresión de CD3 ζ en los linfocitos T (Zabaleta *et al.*, 2004).

El estado inflamatorio producido tras infección por *Helicobacter pylori* y el siguiente desarrollo del tumor puede dar lugar a la regulación de la actividad de linfocitos T por modificaciones epigenéticas, en el gen de la proteína de CD3 ζ o en los genes de otras proteínas que regulan su expresión, Elf o IL-2. Esto daría lugar a una disfunción de los linfocitos T que no responderían, por tanto, ante el desarrollo del carcinoma. Además, se ha descrito que *Helicobacter pylori* es capaz de regular la expresión de determinados genes (Gologan *et al.*, 2005) y que la exposición a antígenos bacterianos es suficiente para dar lugar a la disminución de la expresión de la cadena CD3 ζ y producir una disfunción celular proporcionada por el desarrollo de una respuesta Th1 mediada por IFN γ (Bronstein-Sitton *et al.*, 2003).

Además, la producción de citoquinas durante la infección por *Helicobacter pylori* y el crecimiento progresivo del tumor en modelos de ratón mostró una respuesta tipo Th1 (IL-2 e IFN γ) en los estadios tempranos que tras la implantación del tumor se transformó en un patrón de citoquinas tipo Th2 (IL4 e IL10). Es decir, se produciría una disminución de la IL-2 pudiendo influir en la expresión de estas moléculas. Todo ello indica que, en general, el tumor reduce por varios mecanismos la producción de IL-2.

3.2. Respuesta del sistema inmune contra el tumor formado

Cuando el tumor sólido adquiere cierto tamaño y empieza a crecer invasivamente produce proteínas angiogénicas y estromagénicas para obtener aporte sanguíneo. Este crecimiento invasivo causa más daños en el tejido del entorno induciendo señales de inflamación que dan lugar al reclutamiento de más células del sistema inmune innato (NK, NKT, células T $\gamma\delta$, macrófagos y células dendríticas). Las estructuras de las células transformadas, producidas por el propio proceso tumoral o por la inflamación, son reconocidas por los linfocitos infiltrantes tales como NK, NKT y linfocitos T $\gamma\delta$ los cuales se estimulan para producir IFN γ .

El IFN- γ produce muerte de células tumorales al inducir mecanismos apoptóticos, antiproliferativos o por bloqueo de los nuevos vasos. Los restos celulares formados son ingeridos por las células dendríticas locales las cuales migran a los nódulos linfáticos drenantes. En los nódulos linfáticos drenantes, las células dendríticas recién migradas inducen células T CD4 *helper* específicas de tumor que secretan IFN γ (Th1) y así facilitan el desarrollo de células T CD8 específicas de tumor.

Las NK infiltrantes de tumor y los macrófagos se activan mutuamente por producción de IFN γ e IL12 y matan células tumorales por mecanismos de apoptosis mediados por TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*), perforina e intermedios reactivos de nitrógeno y oxígeno.

Llega un momento en que el sistema inmune del huésped y las células tumorales entran en un equilibrio. En este proceso los linfocitos y el IFN γ ejercen una presión de selección sobre las células tumorales. Esta presión es suficiente para contenerlas pero no para extinguiirlas. Las células tumorales son genéticamente inestables y mutan rápidamente. Durante este período muchas células mutantes son destruidas pero algunas de ellas se hacen resistentes al ataque inmune.

Como ya se ha comentado, a pesar del papel que el linfocito T juega en el control del crecimiento del tumor, las células malignas son capaces de escapar del sistema inmune y expandirse (Rodríguez *et al.*, 2003b). No está claro por qué los linfocitos T no son capaces de llevar a cabo una respuesta eficaz frente al tumor y se han dado varias explicaciones al respecto.

Entre ellas la baja expresión de la cadena CD3 ζ en linfocitos T ha sido una de las más frecuentemente apoyadas bibliográficamente (Mizoguchi *et al.*, 1992; Baniyash, 2004). Esta pobre expresión da lugar a que las células T no sean capaces de responder adecuadamente al estímulo y así las células tumorales se expandirían. Defectos similares se han observado en diferentes tipos de cáncer como se ha comentado en la introducción.

Se han propuesto varias explicaciones para justificar el descenso en la expresión de esta cadena, tales como:

- 1) existencia de factores derivados del tumor (Taylor *et al.*, 2001; Mizoguchi *et al.*, 1992; Lockhart *et al.*, 2001)
- 2) altos niveles de ciertas citoquinas como IL-10 o TGF β (von Bernstorff *et al.*, 2001) e IFN γ (Nieland, *et al.*, 1998)
- 3) consumo de L-arginina por parte de macrófagos (Rodríguez *et al.*, 2003b; Rodríguez *et al.*, 2003a)
- 4) presencia de especies reactivas de oxígeno secretadas por monocitos (Kono *et al.*, 1996b; Takahashi *et al.*, 2003) o granulocitos activados (Schmielau *et al.*, 2001a)
- 5) infiltración de macrófagos asociados al tumor (*infiltration of tumour-associated macrophage*, TAM) (Ishigami *et al.*, 2003)
- 6) apoptosis celular (Gastman *et al.*, 1999; Rabinowich *et al.*, 1998).

La existencia de estas citoquinas y estas especies celulares va en paralelo con la aparición del estado de inflamación crónica producido en la mucosa tras la infección por *Helicobacter pylori* y el tumor derivado. La inflamación (gastritis crónica) puede derivar en atrofia de la mucosa, metaplasia intestinal, displasia glandular y carcinoma. Esta secuencia de eventos es conocida como “cascada de Correa” (Correa, 1988).

Con todo esto se podría decir que el cáncer gástrico tiene un origen inmunológico, ya que se produce debido a una inflamación crónica que se desarrolla cuando el sistema inmune responde a la infección por *Helicobacter pylori* (D'Elíos *et al.*, 2005).

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. El porcentaje de células CD45+, así como la respuesta proliferativa a CD3 en células mononucleares de sangre periférica, sirve para singularizar pacientes con peor pronóstico (ENR+). Estos marcadores podrían utilizarse como criterios de clasificación de los pacientes.

2. La transformación con *Herpesvirus saimiri* ha permitido obtener líneas celulares T de crecimiento estable, tanto a partir de muestras de sangre periférica como de mucosa de pacientes con adenocarcinoma gástrico e individuos control con las que se han realizado estudios más amplios. Se evita así el problema de la difícil obtención de muestras tisulares y nos permite estudiar a las células ajenas al efecto de cualquier factor o fármaco presente en el organismo.

3. Las líneas de linfocitos T provenientes de sangre o de tejido de pacientes con cáncer muestran un defecto en la expresión de CD3 ζ cuando se mantienen en cultivo en ausencia de IL-2. La disminución de expresión de la cadena CD3 ζ es homogénea a lo largo de toda la superficie celular no encontrándose, además, diferencias en el patrón de expresión entre líneas de linfocitos T de pacientes y de controles.

4. Los resultados de liberación de calcio revelan que las líneas de linfocitos T procedentes de pacientes con adenocarcinoma gástrico están basalmente más activadas que las de los controles. Los resultados al estimular a través del TCR-CD3 revelan que mientras que las líneas de linfocitos T procedentes de controles son capaces de liberar calcio al citoplasma, las líneas de linfocitos T procedentes de pacientes no lo son. La estimulación con ionomicina muestra cantidades similares de calcio en el retículo en ambos tipos celulares lo que indica que el defecto radica en algún paso de la transducción de señales tras la estimulación celular y no en la capacidad de liberar calcio al citoplasma.

5. No se observaron diferencias en las tasas de apoptosis o necrosis celular entre pacientes y controles al estimular linfocitos de sangre periférica o líneas de linfocitos T con distintas combinaciones de mitógenos. Así pues estos mecanismos no son responsables de los defectos celulares encontrados en los pacientes.

6. No se detectó IL-2 en el sobrenadante de ninguna de las líneas de linfocitos T estudiadas. Por tanto, el defecto en la expresión de CD3 ζ no es debido a una diferencia de secreción de IL-2 entre las líneas de pacientes y de controles sanos.

7. No hay diferencias en la secuencia del promotor del gen de la cadena CD3 ζ entre el grupo de controles sanos y de pacientes. En la posición -77 de la secuencia del promotor se encontró una inserción de una timidina

(T) en todas las secuencias obtenidas. La secuencia obtenida fue depositada en el Genbank, donde se le asignó el número de acceso AY839629.

8. Las líneas de linfocitos T, procedentes de mucosa o sangre periférica que tras siete días sin IL-2 presentan una disminución en la expresión de CD3 ζ , no expresan ni la cadena γ del receptor para la IgE ni la proteína quinasa que se asocia a ella, Syk.

9. Hay una disminución de expresión de Lck y de ZAP70 en las líneas de linfocitos T pacientes procedentes tanto de tejido como de sangre periférica con respecto a las de controles. Las diferencias encontradas son independientes de la IL-2.

10. La presencia de Elf en los pacientes depende de la IL-2 ya que las líneas de pacientes cultivadas en ausencia de esta citoquina expresan menores cantidades de Elf que las de controles, diferencia que no se observa cuando se añade esta citoquina al cultivo.

11. El IFN γ disminuye la expresión de CD3 ζ en células mononucleares de sangre periférica pero no en linfocitos T purificados. La IL-2 es capaz de revertir el efecto del IFN- γ . El hecho de que el IFN γ no disminuya la expresión de CD3 ζ en linfocitos T purificados pero sí en células mononucleares de sangre periférica sugiere que actúa otra población celular que finalmente incide en linfocitos T.

VII. BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

A

Acuto, O. and D.Cantrell. 2000. T cell activation and the cytoskeleton. *Annu Rev Immunol* 18:165-184.

Ahmad, M., R.C.Rees, and S.A.Ali. 2004. Escape from immunotherapy: possible mechanisms that influence tumor regression/progression. *Cancer Immunol Immunother* 53:844-854.

Aoe, T., Y.Okamoto, H.Arase, K.Ikuta, J.Miyazaki, S.Ono, M.Otaji, H.Ohno, S.Miyatake, and T.Saito. 1996. Preferential requirement of CD3 zeta-mediated signals for development of immature rather than mature thymocytes. *Int Immunol* 8:1055-1066.

Aoe, T., Y.Okamoto, and T.Saito. 1995. Activated macrophages induce structural abnormalities of the T cell receptor-CD3 complex. *J Exp Med* 181:1881-1886.

Ashwell, J.D. and R.D.Klusner. 1990. Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* 8:139-167.

B

Bacchetta, R., S.Gregori, and M.G.Roncarolo. 2005. CD4(+) regulatory T cells: Mechanisms of induction and effector function. *Autoimmun Rev* 4:491-496.

Baecher-Allan, C., E.Wolf, and D.A.Hafner. 2005. Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4(+)CD25(+) T cells. *Clin Immunol* 115:10-18.

Baldari, C.T., A.Lanzavecchia, and J.L.Telford. 2005. Immune subversion by *Helicobacter pylori*. *Trends Immunol* 26:199-207.

Baniyash, M. 2004. TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nat Rev Immunol* 4:675-687.

Baniyash, M., P.Garcia-Morales, J.S.Bonifacio, L.E.Samelson, and R.D.Klausner. 1988. Disulfide linkage of the zeta and eta chains of the T cell receptor. Possible identification of two structural classes of receptors. *J Biol Chem* 263:9874-9878.

Bauer, A., D.J.McConkey, F.D.Howard, L.K.Clayton, D.Novick, S.Koyasu, and E.L.Reinherz. 1991. Differential signal transduction via T-cell receptor CD3 zeta 2, CD3 zeta-eta, and CD3 eta 2 isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3842-3846.

Biesinger, B., I.Muller-Fleckenstein, B.Simmer, G.Lang, S.Wittmann, E.Platzer, R.C.Desrosiers, and B.Fleckenstein. 1992. Stable growth transformation of human T lymphocytes by herpesvirus saimiri. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3116-3119.

Biesinger, B., J.J.Trimble, R.C.Desrosiers, and B.Fleckenstein. 1990. The divergence between two oncogenic Herpesvirus saimiri strains in a genomic region related to the transforming phenotype. *Virology* 176:505-514.

Boehm, U., T.Klamp, M.Groot, and J.C.Howard. 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15:749-795.

Bromley, S.K., W.R.Burack, K.G.Johnson, K.Somersalo, T.N.Sims, C.Sumen, M.M.Davis, A.S.Shaw, P.M.Allen, and M.L.Dustin. 2001. The immunological synapse. *Annu Rev Immunol* 19:375-396.

Bronstein-Sitton, N., L.Cohen-Daniel, I.Vaknin, A.V.Ezernitchi, B.Leshem, A.Halabi, Y.Houri-Hadad, E.Greenbaum, Z.Zakay-Rones, L.Shapira, and M.Baniyash. 2003. Sustained exposure to bacterial

antigen induces interferon-gamma-dependent T cell receptor zeta down-regulation and impaired T cell function. *Nat Immunol* 4:957-964.

Brown, D.A. and E.London. 2000. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 275:17221-17224.

Bukowski, R.M., P.Rayman, R.Uzzo, T.Bloom, K.Sandstrom, D.Peereboom, T.Olencki, G.T.Budd, D.McLain, P.Elson, A.Novick, and J.H.Finke. 1998. Signal transduction abnormalities in T lymphocytes from patients with advanced renal carcinoma: clinical relevance and effects of cytokine therapy. *Clin Cancer Res* 4:2337-2347.

Burnet, F.M. 1970. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13:1-27.

C

Capron, M., G.A.Soussi, M.Morita, M.J.Truong, L.Prin, J.P.Kinet, and A.Capron. 1995. Eosinophils: from low- to high-affinity immunoglobulin E receptors. *Allergy* 50:20-23.

Cherukuri, A., M.Dykstra, and S.K.Pierce. 2001. Floating the raft hypothesis: lipid rafts play a role in immune cell activation. *Immunity* 14:657-660.

Clayton, L.K., A.Bauer, Y.J.Jin, L.D'Adamio, S.Koyasu, and E.L.Reinherz. 1990. Characterization of thymus-derived lymphocytes expressing Ti alpha-beta CD3 gamma delta epsilon zeta-zeta, Ti alpha-beta CD3 gamma delta epsilon eta-eta or Ti alpha-beta CD3 gamma delta epsilon zeta-zeta/zeta-eta antigen receptor isoforms: analysis by gene transfection. *J Exp Med* 172:1243-1253.

Clayton, L.K., L.D'Adamio, F.D.Howard, M.Sieh, R.E.Hussey, S.Koyasu, and E.L.Reinherz. 1991. CD3 eta and CD3 zeta are alternatively spliced products of a common genetic locus and are transcriptionally and/or post-transcriptionally regulated during T-cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5202-5206.

Clevers, H., B.Alarcon, T.Wileman, and C.Terhorst. 1988. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol* 6:629-662.

Cloutier, J.F. and A.Veillette. 1999. Cooperative inhibition of T-cell antigen receptor signaling by a complex between a kinase and a phosphatase. *J Exp Med* 189:111-121.

Coley, W. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *Am J Med Sci* 105, 487-511. 1893.

Correa, P. 1988. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 48:3554-3560.

D

D'Elcios, M.M., A.Amedei, M.Benagiano, A.Azzurri, and G.Del Prete. 2005. Helicobacter pylori, T cells and cytokines: the "dangerous liaisons". *FEMS Immunol Med Microbiol* 44:113-119.

D'Elcios, M.M., M.Manghetti, M.De Carli, F.Costa, C.T.Baldari, D.Burroni, J.L.Telford, S.Romagnani, and G.Del Prete. 1997. T helper 1 effector cells specific for Helicobacter pylori in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *J Immunol* 158:962-967.

Davis, D.M. 2002. Assembly of the immunological synapse for T cells and NK cells. *Trends Immunol* 23:356-363.

Davis, M.M., M.Krogsgaard, J.B.Huppa, C.Sumen, M.A.Purbhoo, D.J.Irvine, L.C.Wu, and L.Ehrlich. 2003. Dynamics of cell surface molecules during T cell recognition. *Annu Rev Biochem* 72:717-742.

de Gruijl, T.D., H.J.Bontkes, F.Peccatori, M.P.Gallee, T.J.Helmerhorst, R.H.Verheijen, J.Aarbiou, W.M.Mulder, J.M.Walboomers, C.J.Meijer, d.van, V, and R.J.Scheper. 1999. Expression of CD3-zeta on T-cells in primary cervical carcinoma and in metastasis-positive and -negative pelvic lymph nodes. *Br J Cancer* 79:1127-1132.

De Paola, F., R.Ridolfi, A.Riccobon, E.Flamini, F.Barzanti, A.M.Granato, G.L.Mordenti, L.Medri, P.Vitali, and D.Amadori. 2003. Restored T-cell activation mechanisms in human tumour-infiltrating lymphocytes from melanomas and colorectal carcinomas after exposure to interleukin-2. *Br J Cancer* 88:320-326.

Diego Morillas, J. and J.A.Solis Herruzo. 2005. Tumores del estómago. *In Tratado en medicina. Tomo I. C.Perezagua Clamagirand, editor. Ariel, Barcelona. 269-270.*

Duboise, S.M., J.Guo, S.Czajak, R.C.Desrosiers, and J.U.Jung. 1998. STP and Tip are essential for herpesvirus saimiri oncogenicity. *J Virol* 72:1308-1313.

Dunn, G.P., A.T.Bruce, H.Ikeda, L.J.Old, and R.D.Schreiber. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3:991-998.

Dustin, M.L. and A.C.Chan. 2000. Signaling takes shape in the immune system. *Cell* 103:283-294.

Dworacki, G., N.Meidenbauer, I.Kuss, T.K.Hoffmann, W.Gooding, M.Lotze, and T.L.Whiteside. 2001. Decreased zeta chain expression and apoptosis in CD3+ peripheral blood T lymphocytes of patients with melanoma. *Clin Cancer Res* 7:947s-957s.

E

Edmonds, S.D. and H.L.Ostergaard. 2002. Dynamic association of CD45 with detergent-insoluble microdomains in T lymphocytes. *J Immunol* 169:5036-5042.

Ehrlich, P. 1909. Ueber den jetzigen stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneeskde* 273-290.

Ellery, J.M. and P.J.Nicholls. 2002. Alternate signalling pathways from the interleukin-2 receptor. *Cytokine Growth Factor Rev* 13:27-40.

Enyedy, E.J., M.P.Nambiar, S.N.Liossis, G.Dennis, G.M.Kammer, and G.C.Tsokos. 2001. Fc epsilon receptor type I gamma chain replaces the deficient T cell receptor zeta chain in T cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 44:1114-1121.

Ernst, P. 1999. Review article: the role of inflammation in the pathogenesis of gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 13 Suppl 1:13-18.

F

Ferlay, J., F.Bray, P.Pisani, and D.M.Parkin. 2001. GLOBOSCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 1.0. IARC CancerBase N°5. IARCPress, Lyon.

Finke, J.H., A.H.Zea, J.Stanley, D.L.Longo, H.Mizoguchi, R.R.Tubbs, R.H.Wiltrout, J.J.O'Shea, S.Kudoh, E.Klein, and . 1993. Loss of T-cell receptor zeta chain and p56lck in T-cells infiltrating human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 53:5613-5616.

Forones, N.M., S.V.Mandowsky, and L.G.Lourenco. 2001. Serum levels of interleukin-2 and tumor necrosis factor-alpha correlate to tumor progression in gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 48:1199-1201.

Frank, S.J., L.E.Samelson, and R.D.Klausner. 1990. The structure and signalling functions of the invariant T cell receptor components. *Semin Immunol* 2:89-97.

Frydecka, I., D.Bocko, A.Kosmaczewska, L.Ciszek, and R.Morilla. 2001. The effect of peripheral blood lymphocyte stimulation on zeta chain expression and IL-2 production in Hodgkin's disease. *Br J Cancer* 84:1339-1343.

G

Gaffen, S.L. 2001. Signaling domains of the interleukin 2 receptor. *Cytokine* 14:63-77.

Gaffen, S.L. and K.D.Liu. 2004. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine* 28:109-123.

Garrido, F. and I.Algarra. 2001. MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv Cancer Res* 83:117-158.

Gastman, B.R., D.E.Johnson, T.L.Whiteside, and H.Rabinowich. 1999. Caspase-mediated degradation of T-cell receptor zeta-chain. *Cancer Res* 59:1422-1427.

Germain, R.N. 2002. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* 2:309-322.

Glaspy, J.A. 2002. Therapeutic options in the management of renal cell carcinoma. *Semin Oncol* 29:41-46.

Gologan, A., D.Y.Graham, and A.R.Sepulveda. 2005. Molecular markers in Helicobacter pylori-associated gastric carcinogenesis. *Clin Lab Med* 25:197-222.

I

Ichihara, F., K.Kono, A.Takahashi, H.Kawaida, H.Sugai, and H.Fujii. 2003. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clin Cancer Res* 9:4404-4408.

International Agency for Research on Cancer. 1994. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. In Lyon:International Agency for Research on Cancer.

Ishigami, S., S.Natsugoe, K.Tokuda, A.Nakajo, H.Higashi, H.Iwashige, K.Aridome, S.Hokita, and T.Aikou. 2002. CD3-zetachain expression of intratumoral lymphocytes is closely related to survival in gastric carcinoma patients. *Cancer* 94:1437-1442.

Ishigami, S., S.Natsugoe, K.Tokuda, A.Nakajo, H.Okumura, M.Matsumoto, F.Miyazono, S.Hokita, and T.Aikou. 2003. Tumor-associated macrophage (TAM) infiltration in gastric cancer. *Anticancer Res* 23:4079-4083.

J

Jakobisiak, M., W.Lasek, and J.Golab. 2003. Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunol Lett* 90:103-122.

James, S.P. and M.Zeitz. 1994. Handbook of Mucosal Immunology .

Janeway, C.A. 2000. Inmunobiología. El Sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. Masson, Barcelona.

Januchowski, R., J.Prokop, and P.P.Jagodzinski. 2004. Role of epigenetic DNA alterations in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Appl Genet* 45:237-248.

Japanese Gastric Cancer Association. 1998. Japanese Classification of Gastric Adenocarcinoma. In Gastric Cancer. 10-24.

Jensen, J.P., D.Hou, M.Ramsburg, A.Taylor, M.Dean, and A.M.Weissman. 1992. Organization of the human T cell receptor zeta/eta gene and its genetic linkage to the Fc gamma RII-Fc gamma RIII gene cluster. *J Immunol* 148:2563-2571.

Jones, P.A. and S.B.Baylin. 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3:415-428.

Juang, Y.T., E.E.Solomou, B.Rellahan, and G.C.Tsokos. 2002. Phosphorylation and O-linked glycosylation of Elf-1 leads to its translocation to the nucleus and binding to the promoter of the TCR zeta-chain. *J Immunol* 168:2865-2871.

June, C.H., J.A.Bluestone, L.M.Nadler, and C.B.Thompson. 1994. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today* 15:321-331.

Jury, E.C., P.S.Kabouridis, F.Flores-Borja, R.A.Mageed, and D.A.Isenberg. 2004. Altered lipid raft-associated signaling and ganglioside expression in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 113:1176-1187.

K

- Khong, H.T. and N.P.Restifo. 2002. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 3:999-1005.
- Kim, C.W., S.H.Choi, E.J.Chung, M.J.Lee, E.K.Byun, M.H.Ryu, and Y.J.Bang. 1999. Alteration of signal-transducing molecules and phenotypical characteristics in peripheral blood lymphocytes from gastric carcinoma patients. *Pathobiology* 67:123-128.
- Kolenko, V., Q.Wang, M.C.Riedy, J.O'Shea, J.Ritz, M.K.Cathcart, P.Rayman, R.Tubbs, M.Edinger, A.Novick, R.Bukowski, and J.Finke. 1997. Tumor-induced suppression of T lymphocyte proliferation coincides with inhibition of Jak3 expression and IL-2 receptor signaling: role of soluble products from human renal cell carcinomas. *J Immunol* 159:3057-3067.
- Kono, K., F.Ichihara, H.Iizuka, T.Sekikawa, and Y.Matsumoto. 1998. Expression of signal transducing T-cell receptor zeta molecules after adoptive immunotherapy in patients with gastric and colon cancer. *Int J Cancer* 78:301-305.
- Kono, K., M.E.Ressing, R.M.Brandt, C.J.Melief, R.K.Potkul, B.Andersson, M.Petersson, W.M.Kast, and R.Kiessling. 1996a. Decreased expression of signal-transducing zeta chain in peripheral T cells and natural killer cells in patients with cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2:1825-1828.
- Kono, K., F.Salazar-Onfray, M.Petersson, J.Hansson, G.Masucci, K.Wasserman, T.Nakazawa, P.Anderson, and R.Kiessling. 1996b. Hydrogen peroxide secreted by tumor-derived macrophages down-modulates signal-transducing zeta molecules and inhibits tumor-specific T cell-and natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol* 26:1308-1313.
- Kosugi, A., S.Saitoh, S.Noda, K.Yasuda, F.Hayashi, M.Ogata, and T.Hamaoka. 1999. Translocation of tyrosine-phosphorylated TCRzeta chain to glycolipid-enriched membrane domains upon T cell activation. *Int Immunol* 11:1395-1401.
- Kraft, M.S., G.Henning, H.Fickenscher, D.Lengenfelder, J.Tschopp, B.Fleckenstein, and E.Meinl. 1998. Herpesvirus saimiri transforms human T-cell clones to stable growth without inducing resistance to apoptosis. *J Virol* 72:3138-3145.
- Krishnan, S., M.P.Nambiar, V.G.Warke, C.U.Fisher, J.Mitchell, N.Delaney, and G.C.Tsokos. 2004. Alterations in lipid raft composition and dynamics contribute to abnormal T cell responses in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 172:7821-7831.
- Krissansen, G.W., M.J.Owen, W.Verbi, and M.J.Crumpton. 1986. Primary structure of the T3 gamma subunit of the T3/T cell antigen receptor complex deduced from cDNA sequences: evolution of the T3 gamma and delta subunits. *EMBO J* 5:1799-1808.
- Kuhn, D.J. and Q.P.Dou. 2005. The role of interleukin-2 receptor alpha in cancer. *Front Biosci* 10:1462-1474.

L

- Langlet, C., A.M.Bernard, P.Drevot, and H.T.He. 2000. Membrane rafts and signaling by the multichain immune recognition receptors. *Curr Opin Immunol* 12:250-255.
- Latour, S. and A.Veillette. 2001. Proximal protein tyrosine kinases in immunoreceptor signaling. *Curr Opin Immunol* 13:299-306.
- Leo, A. and B.Schraven. 2001. Adapters in lymphocyte signalling. *Curr Opin Immunol* 13:307-316.
- Letsch, A., U.Keilholz, D.Schadendorf, D.Nagorsen, A.Schmittel, E.Thiel, and C.Scheibenbogen. 2000. High frequencies of circulating melanoma-reactive CD8+ T cells in patients with advanced melanoma. *Int J Cancer* 87:659-664.
- Liossis, S.N., X.Z.Ding, G.J.Dennis, and G.C.Tsokos. 1998. Altered pattern of TCR/CD3-

mediated protein-tyrosyl phosphorylation in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. Deficient expression of the T cell receptor zeta chain. *J Clin Invest* 101:1448-1457.

Lockhart, D.C., A.K.Chan, S.Mak, H.G.Joo, H.A.Daust, A.Carritte, C.C.Douville, P.S.Goedegebuure, and T.J.Eberlein. 2001. Loss of T-cell receptor-CD3zeta and T-cell function in tumor-infiltrating lymphocytes but not in tumor-associated lymphocytes in ovarian carcinoma. *Surgery* 129:749-756.

Loeffler, C.M., M.J.Smyth, D.L.Longo, W.C.Kopp, L.K.Harvey, H.R.Tribble, J.E.Tase, W.J.Urba, A.S.Leonard, H.A.Young, and . 1992. Immunoregulation in cancer-bearing hosts. Down-regulation of gene expression and cytotoxic function in CD8+ T cells. *J Immunol* 149:949-956.

Lopez, C.B., T.D.Rao, H.Feiner, R.Shapiro, J.R.Marks, and A.B.Frey. 1998. Repression of interleukin-2 mRNA translation in primary human breast carcinoma tumor-infiltrating lymphocytes. *Cell Immunol* 190:141-155.

Lopez-Santalla, M., A.P.Valeri, M.Perez-Blas, N.Aguilera-Montilla, A.Gutierrez, I.Lasa, J.M.Muguerza, J.Martin, L.Garcia-Sancho, J.Granell, and J.M.Martin-Villa. 2005. Expression of CD45 and proliferative response to CD3 as suitable classification markers of patients with gastric adenocarcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 1-5.

M

MacDonald, T.T. and J.Spencer. 1994. Ontogeny of the gut-associated lymphoid system in man. *Acta Paediatr Suppl* 83:3-5.

Marmor, M.D. and M.Julius. 2001. Role for lipid rafts in regulating interleukin-2 receptor signaling. *Blood* 98:1489-1497.

Martin-Villa, J.M., S.Ferre-Lopez, J.C.Lopez-Suarez, M.Perez-Blas, G.Castellano-Tortajada, F.Sanchez-Gomez, and A.Arnaiz-Villena. 1998. Successful in vitro immortalization of human intestinal mucosal

lymphocytes with Herpesvirus saimiri. *Tissue Antigens* 52:430-434.

Maurice, M.M., A.C.Lankester, A.C.Bezemer, M.F.Geertsma, P.P.Tak, F.C.Breedveld, R.A.van Lier, and C.L.Verweij. 1997. Defective TCR-mediated signaling in synovial T cells in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 159:2973-2978.

Meidenbauer, N., W.Gooding, L.Spitler, D.Harris, and T.L.Whiteside. 2002. Recovery of zeta-chain expression and changes in spontaneous IL-10 production after PSA-based vaccines in patients with prostate cancer. *Br J Cancer* 86:168-178.

Meinl, E., R.Hohlfeld, H.Wekerle, and B.Fleckenstein. 1995. Immortalization of human T cells by Herpesvirus saimiri. *Immunol Today* 16:55-58.

Meinl, E., D.Lengenfelder, N.Blank, R.Pirzer, L.Barata, and C.Hivroz. 2000. Differential requirement of ZAP-70 for CD2-mediated activation pathways of mature human T cells. *J Immunol* 165:3578-3583.

Mizoguchi, H., J.J.O'Shea, D.L.Longo, C.M.Loeffler, D.W.McVicar, and A.C.Ochoa. 1992. Alterations in signal transduction molecule in T lymphocytes from tumor-bearing mice. *Science* 11:1795-1798.

Montixi, C., C.Langlet, A.M.Bernard, J.Thimonier, C.Dubois, M.A.Wurbel, J.P.Chauvin, M.Pierres, and H.T.He. 1998. Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *EMBO J* 17:5334-5348.

Moreno, J.G., M.C.Miller, S.Gross, W.J.Allard, L.G.Gomella, and L.W.Terstappen. 2005. Circulating tumor cells predict survival in patients with metastatic prostate cancer. *Urology* 65:713-718.

Morgan, D.A., F.W.Ruscetti, and R.Gallo. 1976. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 193:1007-1008.

Muller, D., S.Lang, M.Roskrow, and B.Wollenberg. 2002. [The expression of zeta-chain of the T cell receptor as prognostic marker for patients with head and neck cancer]. *Laryngorhinootologie* 81:516-520.

N

Nagashima, H., M.Mori, N.Sadanaga, K.Mashino, Y.Yoshikawa, and K.Sugimachi. 2001. Expression of Fas ligand in gastric carcinoma relates to lymph node metastasis. *Int J Oncol* 18:1157-1162.

Nakagomi, H., M.Petersson, I.Magnusson, C.Juhlin, M.Matsuda, H.Mellstedt, J.L.Taupin, E.Vivier, P.Anderson, and R.Kiessling. 1993. Decreased expression of the signal-transducing zeta chains in tumor-infiltrating T-cells and NK cells of patients with colorectal carcinoma. *Cancer Res* 53:5610-5612.

Nakayama, T., A.Singer, E.D.Hsi, and L.E.Samelson. 1989. Intrathymic signalling in immature CD4+CD8+ thymocytes results in tyrosine phosphorylation of the T-cell receptor zeta chain. *Nature* 341:651-654.

Nambiar, M.P., E.J.Enyedy, V.G.Warke, S.Krishnan, G.Dennis, G.M.Kammer, and G.C.Tsokos. 2001a. Polymorphisms/mutations of TCR-zeta-chain promoter and 3' untranslated region and selective expression of TCR zeta-chain with an alternatively spliced 3' untranslated region in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 16:133-142.

Nambiar, M.P., E.J.Enyedy, V.G.Warke, S.Krishnan, G.Dennis, H.K.Wong, G.M.Kammer, and G.C.Tsokos. 2001b. T cell signaling abnormalities in systemic lupus erythematosus are associated with increased mutations/polymorphisms and splice variants of T cell receptor zeta chain messenger RNA. *Arthritis Rheum* 44:1336-1350.

Nambiar, M.P., C.U.Fisher, A.Kumar, C.G.Tsokos, V.G.Warke, and G.C.Tsokos. 2003a. Forced expression of the Fc receptor gamma-chain renders human T cells hyperresponsive to TCR/CD3 stimulation. *J Immunol* 170:2871-2876.

Nambiar, M.P., C.U.Fisher, V.G.Warke, S.Krishnan, J.P.Mitchell, N.Delaney, and G.C.Tsokos. 2003b. Reconstitution of deficient T cell receptor zeta chain restores T cell signaling and augments T cell receptor/CD3-induced interleukin-2 production in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 48:1948-1955.

Nambiar, M.P., S.Krishnan, V.G.Warke, and G.C.Tsokos. 2004. TCR zeta-chain abnormalities in human systemic lupus erythematosus. *Methods Mol Med* 102:49-72.

Nieland, J.D., K.Loviscek, K.Kono, K.S.Albain, A.R.McCall, R.K.Potkul, S.G.Fisher, M.P.Velders, M.Petersson, R.Kiessling, and W.M.Kast. 1998. PBLs of early breast carcinoma patients with a high nuclear grade tumor unlike PBLs of cervical carcinoma patients do not show a decreased TCR zeta expression but are functionally impaired. *J Immunother* 21:317-322.

O

Orditura, M., C.Romano, F.De Vita, G.Galizia, E.Lieto, S.Infusino, G.De Cataldis, and G.Catalano. 2000. Behaviour of interleukin-2 serum levels in advanced non-small-cell lung cancer patients: relationship with response to therapy and survival. *Cancer Immunol Immunother* 49:530-536.

Otsuji, M., Y.Kimura, T.Aoe, Y.Okamoto, and T.Saito. 1996. Oxidative stress by tumor-derived macrophages suppresses the expression of CD3 zeta chain of T-cell receptor complex and antigen-specific T-cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13119-13124.

P

Pacheco-Castro, A., C.Marquez, M.L.Toribio, A.R.Ramiro, C.Trigueros, and J.R.Regueiro. 1996. Herpesvirus saimiri immortalization of alpha beta and gamma delta human T-lineage cells derived from CD34+ intrathymic precursors in vitro. *Int Immunol* 8:1797-1805.

Parkin, D.M. 1997. Cancer incidence in five continents. In Lyon: International Agency for Research on Cancer. 922-924.

Parkin, D.M., F.Bray, J.Ferlay, and P.Pisani. 2001. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 94:153-156.

Pawelec, G. 2004. Tumour escape from the immune response. *Cancer Immunol Immunother* 53:843.

Pitcher, L.A., P.S.Ohashi, and N.S.van Oers. 2003a. T cell antagonism is functionally uncoupled from the 21- and 23-kDa tyrosine-phosphorylated TCR zeta subunits. *J Immunol* 171:845-852.

Pitcher, L.A., J.A.Young, M.A.Mathis, P.C.Wrage, B.Bartok, and N.S.van Oers. 2003b. The formation and functions of the 21- and 23-kDa tyrosine-phosphorylated TCR zeta subunits. *Immunol Rev* 191:47-61.

Plunkett, T.A. and D.W.Miles. 1999. Immunotherapy: the last 25 years. *Cancer Treat Rev* 25:355-363.

R

Rabinowich, H., M.Banks, T.E.Reichert, T.F.Logan, J.M.Kirkwood, and T.L.Whiteside. 1996. Expression and activity of signaling molecules in T lymphocytes obtained from patients with metastatic melanoma before and after interleukin 2 therapy. *Clin Cancer Res* 2:1263-1274.

Rabinowich, H., T.E.Reichert, Y.Kashii, B.R.Gastman, M.C.Bell, and T.L.Whiteside. 1998. Lymphocyte apoptosis induced by Fas ligand-expressing ovarian carcinoma cells. Implications for altered expression of T cell receptor in tumor-associated lymphocytes. *J Clin Invest* 101:2579-2588.

Ravetch, J.V. and J.P.Kinet. 1991. Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 9:457-492.

Reichert, T.E., R.Day, E.M.Wagner, and T.L.Whiteside. 1998. Absent or low expression of the zeta chain in T cells at the tumor site correlates with poor survival in patients with oral carcinoma. *Cancer Res* 58:5344-5347.

Reichert, T.E., L.Strauss, E.M.Wagner, W.Gooding, and T.L.Whiteside. 2002. Signaling abnormalities, apoptosis, and reduced proliferation of circulating and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with oral carcinoma. *Clin Cancer Res* 8:3137-3145.

Rellahan, B.L., J.P.Jensen, and A.M.Weissman. 1994. Transcriptional regulation of the T cell antigen receptor zeta subunit: identification of a tissue-restricted promoter. *J Exp Med* 180:1529-1534.

Rodgers, W. and J.K.Rose. 1996. Exclusion of CD45 inhibits activity of p56lck associated with glycolipid-enriched membrane domains. *J Cell Biol* 135:1515-1523.

Rodriguez, P.C., A.H.Zea, K.S.Culotta, J.Zabaleta, J.B.Ochoa, and A.C.Ochoa. 2002. Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. *J Biol Chem* 277:21123-21129.

Rodriguez, P.C., A.H.Zea, J.DeSalvo, K.S.Culotta, J.Zabaleta, D.G.Quiceno, J.B.Ochoa, and A.C.Ochoa. 2003a. L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes. *J Immunol* 171:1232-1239.

Rodriguez, P.C., A.H.Zea, and A.C.Ochoa. 2003b. Mechanisms of tumor evasion from the immune response. *Cancer Chemother Biol Response Modif* 21:351-364.

Roth, C., C.Rochlitz, and P.Kourilsky. 1994. Immune response against tumors. *Adv Immunol* 57:281-351.

S

Saha, K., G.McKinley, and D.J.Volsky. 1997. Improvement of Herpesvirus saimiri T cell immortalization procedure to generate multiple CD4+ T-cell clones from peripheral blood lymphocytes of AIDS patients. *J Immunol Methods* 206:21-23.

Saito, T., I.Kuss, G.Dworacki, W.Gooding, J.T.Johnson, and T.L.Whiteside. 1999. Spontaneous ex vivo apoptosis of peripheral blood

- mononuclear cells in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 5:1263-1273.
- Sakkas, L.I., G.Koussidis, E.Avgerinos, J.Gaughan, and C.D.Platsoucas. 2004. Decreased expression of the CD3zeta chain in T cells infiltrating the synovial membrane of patients with osteoarthritis. *Clin Diagn Lab Immunol* 11:195-202.
- Salvadori, S., B.Gansbacher, A.M.Pizzimenti, and K.S.Zier. 1994. Abnormal signal transduction by T cells of mice with parental tumors is not seen in mice bearing IL-2-secreting tumors. *J Immunol* 153:5176-5182.
- Schmielau, J. and O.J.Finn. 2001a. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res* 61:4756-4760.
- Schmielau, J., M.A.Nalesnik, and O.J.Finn. 2001b. Suppressed T-cell receptor zeta chain expression and cytokine production in pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res* 7:933s-939s.
- Schule, J., L.Bergkvist, L.Hakansson, B.Gustafsson, and A.Hakansson. 2002. Down-regulation of the CD3-zeta chain in sentinel node biopsies from breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 74:33-40.
- Shiue, L., J.Green, O.M.Green, J.L.Karas, J.P.Morgenstern, M.K.Ram, M.K.Taylor, M.J.Zoller, L.D.Zydowsky, J.B.Bolen, and . 1995a. Interaction of p72syk with the gamma and beta subunits of the high-affinity receptor for immunoglobulin E, Fc epsilon RI. *Mol Cell Biol* 15:272-281.
- Shiue, L., M.J.Zoller, and J.S.Brugge. 1995b. Syk is activated by phosphotyrosine-containing peptides representing the tyrosine-based activation motifs of the high affinity receptor for IgE. *J Biol Chem* 270:10498-10502.
- Simons, K. and E.Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572.
- Sobin, L.H., C.H.Wittekind, and International Union against Cancer. 1997. TNM classification of malignant tumors.
- Su, M.W., C.L.Yu, S.J.Burakoff, and Y.J.Jin. 2001. Targeting Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase (SHP-1) into lipid rafts inhibits CD3-induced T cell activation. *J Immunol* 166:3975-3982.
- Sunder-Plassmann, R., F.Lialios, M.Madsen, S.Koyasu, and E.L.Reinherz. 1997. Functional analysis of immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-mediated signal transduction: the two YxxL segments within a single CD3zeta-ITAM are functionally distinct. *Eur J Immunol* 27:2001-2009.
- Szyf, M. 2005. DNA methylation and demethylation as targets for anticancer therapy. *Biochemistry (Mosc)* 70:533-549.
- ## T
- Takahashi, A., K.Kono, H.Amemiya, H.Iizuka, H.Fujii, and Y.Matsumoto. 2001. Elevated caspase-3 activity in peripheral blood T cells coexists with increased degree of T-cell apoptosis and down-regulation of TCR zeta molecules in patients with gastric cancer. *Clin Cancer Res* 7:74-80.
- Tsokos, G.C., H.K.Wong, E.J.Enyedy, and M.P.Nambiar. 2000. Immune cell signaling in lupus. *Curr Opin Rheumatol* 12:355-363.
- Tsuchihashi, N., S.Matsuda, E.L.Reinherz, and S.Koyasu. 2000. Two YxxL segments of a single immunoreceptor tyrosine-based activation motif in the CD3zeta molecule differentially activate calcium mobilization and mitogen-activated protein kinase family pathways. *Eur J Immunol* 30:1785-1793.
- Tsuzaka, K., I.Fukuhara, Y.Setoyama, K.Yoshimoto, K.Suzuki, T.Abe, and T.Takeuchi. 2003. TCR zeta mRNA with an alternatively spliced 3'-untranslated region detected in systemic lupus erythematosus patients leads to the down-regulation of TCR zeta and TCR/CD3 complex. *J Immunol* 171:2496-2503.

Tsygankov, A.Y. 2005. Cell transformation by Herpesvirus saimiri. *J Cell Physiol* 203:305-318.

V

Valeri, A.P., M.Perez-Blas, A.Gutierrez, M.Lopez-Santalla, N.Aguilera, C.Rodriguez-Juan, L.Sala-Silveira, J.Martin, I.Lasa, J.M.Muguerza, A.Lopez, L.Garcia-Sancho, J.Granell, and J.M.Martin-Villa. 2003. Intrinsic defects explain altered proliferative responses of T lymphocytes and HVS-derived T-cell lines in gastric adenocarcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 52:708-714.

Valitutti, S., M.Dessing, K.Aktories, H.Gallati, and A.Lanzavecchia. 1995. Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton. *J Exp Med* 181:577-584.

Van Oers, N.S., B.Tohlen, B.Malissen, C.R.Moomaw, S.Afendis, and C.A.Slaughter. 2000. The 21- and 23-kD forms of TCR zeta are generated by specific ITAM phosphorylations. *Nat Immunol* 1:322-328.

Vassilopoulos, D., B.Kovacs, and G.C.Tsokos. 1995. TCR/CD3 complex-mediated signal transduction pathway in T cells and T cell lines from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 155:2269-2281.

Von Bernstorff, W., M.Voss, S.Freichel, A.Schmid, I.Vogel, C.Johnk, D.Henne-Bruns, B.Kremer, and H.Kalthoff. 2001. Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res* 7:925s-932s.

W

Wange, R.L. and L.E.Samelson. 1996. Complex complexes: signaling at the TCR. *Immunity* 5:197-205.

Warren, J.R. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1:1273-1275.

Weber, F., E.Meinl, K.Drexler, A.Czlonkowska, S.Huber, H.Fickenscher, I.Muller-Fleckenstein, B.Fleckenstein, H.Wekerle, and R.Hohlfeld. 1993. Transformation of human T-cell clones by Herpesvirus saimiri: intact antigen recognition by autonomously growing myelin basic protein-specific T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:11049-11053.

Weed, T.E., W.Nuessle, and A.Ochsner. 1981. Carcinoma of the stomach. Why are we failing to improve survival? *Ann Surg* 193:407-413.

Weiss, A., D.Desai, M.Graber, J.Picus, and G.Koretzky. 1991. The regulation of T-cell antigen receptor signal transduction function. *Transplant Proc* 23:32-33.

Weiss, A. and D.R.Littman. 1994. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76:263-274.

Weissman, A.M., M.Baniyash, D.Hou, L.E.Samelson, W.H.Burgess, and R.D.Klausner. 1988. Molecular cloning of the zeta chain of the T cell antigen receptor. *Science* 239:1018-1021.

Whiteside, T.L. 1994a. Tumor-infiltrating lymphocytes in human solid tumors. *Immunol Ser* 61:137-148.

Whiteside, T.L. 1999. Signaling defects in T lymphocytes of patients with malignancy. *Cancer Immunol Immunother* 48:346-352.

Whiteside, T.L. 2004. Down-regulation of zeta-chain expression in T cells: a biomarker of prognosis in cancer? *Cancer Immunol Immunother* 53:865-878.

Whiteside, T.L. and G.Parmiani. 1994b. Tumor-infiltrating lymphocytes: their phenotype, functions and clinical use. *Cancer Immunol Immunother* 39:15-21.

Wilson, C.B., K.W.Makar, M.Shnyreva, and D.R.Fitzpatrick. 2005. DNA methylation and the expanding epigenetics of T cell lineage commitment. *Semin Immunol* 17:105-119.

Wulfing, C., Y.H.Chien, and M.M.Davis. 1999. Visualizing lymphocyte recognition. *Immunol Cell Biol* 77:186-187.

Y

Yang, H. and E.L.Reinherz. 2001. Dynamic recruitment of human CD2 into lipid rafts. Linkage to T cell signal transduction. *J Biol Chem* 276:18775-18785.

Z

Zabaleta, J., D.J.McGee, A.H.Zea, C.P.Hernandez, P.C.Rodriguez, R.A.Sierra, P.Correa, and A.C.Ochoa. 2004. Helicobacter pylori arginase inhibits T cell proliferation and reduces the expression of the TCR zeta-chain (CD3zeta). *J Immunol* 173:586-593.

Zea, A.H., B.D.Curti, D.L.Longo, W.G.Alvord, S.L.Strobl, H.Mizoguchi, S.P.Creekmore, J.J.O'Shea, G.C.Powers, W.J.Urba, and . 1995. Alterations in T cell receptor and signal transduction molecules in melanoma patients. *Clin Cancer Res* 1:1327-1335.

Zea, A.H., M.T.Ochoa, P.Ghosh, D.L.Longo, W.G.Alvord, L.Valderrama, R.Falabella, L.K.Harvey, N.Saravia, L.H.Moreno, and A.C.Ochoa. 1998. Changes in expression of signal transduction proteins in T lymphocytes of patients with leprosy. *Infect Immun* 66:499-504.

Zeit, M., W.C.Greene, N.J.Peffer, and S.P.James. 1988. Lymphocytes isolated from the intestinal lamina propria of normal nonhuman primates have increased expression of genes associated with T-cell activation. *Gastroenterology* 94:647-655.

Zhang, W., R.P.Trible, and L.E.Samelson. 1998. LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity* 9:239-246.

Zou, J.P., J.Shimizu, K.Ikegame, N.Yamamoto, S.Ono, H.Fujiwara, and T.Hamaoka. 1992. Tumor-bearing mice exhibit a progressive increase in tumor

antigen-presenting cell function and a reciprocal decrease in tumor antigen-responsive CD4+ T cell activity. *J Immunol* 148:648-655.

VIII. ABREVIATURAS

VIII. ABREVIATURAS

α - anti

AP-1- *Activator protein-1*. Proteína activadora-1

APC- *Antigen presenting cell*. Célula presentadora de antígeno

Cag- *Cytotoxin associated gene*. Gen asociado a citotoxina

CD- *Cluster of differentiation*. Grupo de diferenciación

XL- *Crosslinker*. Entrecruzador

cFLIP- *Cellular FLICE-inhibitory protein*.

CMSP- Células mononucleares de sangre periférica

cpm- Cuentas por minuto

Csk- *C-terminal Src kinase*. Quinasa del carbono terminal de Src.

CTL- *Cytotoxic T-lymphocyte*. Linfocito T citotóxico.

CTLA-4- *Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*. Antígeno de linfocito T citotóxico

Cy5-PE- *Cyan5-Phycoerythrin*. Cianina 5-R-ficoeritrina

DAG- Diacilglicerol

DNMT- *DNA Methyltransferase*. Metiltransferasas

EDTA- *Ethylenediaminetetraacetic acid*. Ácido etilendiaminotetraacético

Elf- *E-74-like factor*.

ENR- Enfermedad neoplásica residual

FAE- *Follicle associated epithelium*. Epitelio asociado al folículo

FITC- *Fluorescein isothiocyanate*. Isotiocianato de fluoresceína

Gads- *GRB2-related adaptor proteins*. Proteínas adaptadoras relacionadas con GRB-2

GEF- *Guanine nucleotide exchange proteins*. Proteínas de intercambio de nucleótidos de guanina

GEMs- *Glycosphingolipid-enriched microdomains*. Microdominios enriquecidos en glicoesfingolípidos

GRB-2- *Growth factor binding protein 2*. Proteína de unión a factor de crecimiento 2

GTP- *Guanosine triphosphate*. Guanosín trifosfato

HAT- *Histone Acetyltransferase*. Acetiltransferasas de histonas

HDAC- *Histone deacetylases*. Deacetilasas de histonas

HEPES- *N-[2-hydroxymethyl] piperazine-N'-[ethanesulfonic acid]*

HVS- *Herpesvirus saimiri*

IDO- Indolamina 2,3-dioxigenasa

ION- Ionomicina

IFI- Inmunofluorescencia indirecta

IFN- Interferon

IL- Interleuquina

ION- Ionomicina

IP3- Inositol trifosfato

IRS- *Insulin receptor substrate*. Sustrato del receptor de la insulina.

ITAM- *Immune receptor tyrosine-based activation motifs*. Motivos de activación basados en tirosina del receptor inmunológico

JAK- *Janus kinase*

LAT- *Linker for activation of T cells*. Enlace para la activación de las células T.

MALT- *Mucosal associated lymphoid tissue*. Tejido linfoide asociado a la mucosa

MAP- *Mitogen-activated protein kinases*. Proteínas quinasa activadas por mitógenos

MHC- *Major histocompatibility complex*. Complejo principal de histocompatibilidad

NAP- *Neutrophil-activating protein*. Proteína activadora de neutrófilos.

NF κ B- *Nuclear factor kappa Beta*. Factor nuclear kappa Beta

NFAT- *Nuclear factor of activated T-cells*. Factor nuclear de células T activadas

NK- *Natural killer*

NO- Óxido nítrico

Oct- *Octamer binding protein*

PAG- *Proteins Associated with GEMs*. Proteínas asociadas con GEMs

PBS- *Phosphate buffered saline*. Tampón fosfato salino

PCR- *Polymerase chain reaction*. Reacción en cadena de la polimerasa.

PE- *Phytoerythrin*. Ficoeritrina

PEP- *Proline enriched phosphatase*. Fosfatasa rica en prolina

PHA- *Phytohemagglutinin*. Fitohemaglutinina

PI3K- *Phosphoinositide-3 kinase*. Fosfatidil inositol 3 quinasa

PIP2- *Phosphoinositoldiphosphate*. Fosfatidil inositol bifosfato

PKB- *Protein kinase B*. Proteína quinasa B

PKC- *Protein kinase C*. Proteína quinasa C

PLC- γ - *Phospholipase C- γ* . Fosfolipasa C- γ

PMA- *Phorbol myristate acetate*. Acetato de forbol mirístico

PTB- *phosphotyrosine-binding domains*. Dominios de unión a fosfotirosinas.

- PTK- *Protein tyrosine kinase*. Proteína tirosina quinasa
- rhIL-2- *recombinant human IL-2*. IL-2 humana recombinante
- R-PE- *R-Phycoerythrin*. R-ficoeritrina
- SH2- *Src homology 2*. Homología a Src 2
- SHP- *SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase*. Tirosinas fosfatasas con dominios SH2.
- SOCS- *suppressors of cytokine signaling*. Supresor de señalización por citoquinas
- Src- *Steroid receptor coactivator*. Coactivador del receptor de esteroides
- STAM- *signal transducing adaptor molecule*. Molécula adaptadora de transducción de señales
- StpC- *Saimiri transformation-associated protein of subgroup C virus strains*. Proteína asociada a la transformación de *saimiri* de las cepas del subgrupo C
- Tc- Células T citotóxicas
- Th- Células T *helper*
- TcR- *T cell receptor*. Receptor para antígeno de la célula T
- TGF β - *Transforming growth factor β* . Factor de crecimiento transformante β
- Tip- *Tyrosine kinase-interacting protein*. Proteína de interacción con tirosina quinasas
- TNF α - *Tumor necrosis factor α* . Factor de necrosis tumoral α
- TNFR- *TNF receptor*. Receptor de TNF
- TRITC- *Tetramethyl rhodamine isothiocyanate*. Isotiocianato de tetrametil rodamina
- Vac- *Vacuolization cytotoxin*. Citotoxina para vacuolización.
- VEGF- *Vascular endothelial growth factor*. Factor de crecimiento del endotelio vascular

IX. PUBLICACIONES

IX. PUBLICACIONES

1. Expression of CD45 and proliferative response to CD3 as suitable classification markers of patients with gastric adenocarcinoma (Cancer Immunology and Immunotherapy. 2005 Sep 21:1-5)

Twenty-five patients with resectable gastric adenocarcinoma subdivided according to the absence or presence of residual neoplastic disease (RND– or RND+, respectively) were studied. Cytofluorometric analysis and proliferative responses to mitogens was performed in peripheral blood mononuclear cells of patients.

The percentage of CD3-expressing cells is significantly reduced in the different group of patients studied, when compared to healthy subjects ($p < 0.0001$ in all instances). However, if the expression of CD45 is considered instead, it is significantly reduced only in the RND+ patients, ($72\% \pm 11$) when compared with the control group ($96 \pm 1\%$, $p < 0.0001$). Likewise, cells from these patients proliferated significantly less when stimulated with monoclonal antibodies to CD3 than control cells ($18,920 \pm 6,019$ cpm *vs.* $42,697 \pm 1798$ cpm, $p = 0.0036$), a difference not found if RND– patients ($33,619 \pm 11,733$ cpm) were considered.

We propose that the low expression of CD45 and the poor response to CD3 are markers able to discriminate the subgroup of patients in whom the disease will tend to progress more rapidly, and we suggest the use of such markers as additional criteria for classification of patients with gastric adenocarcinoma or to identify patients requiring more aggressive therapeutic strategies.

2. Down-regulation of CD3 ζ chain expression in mucosal T lymphocytes in gastric adenocarcinoma is not mediated by tumour-derived factors (Enviado a Journal of Leukocyte Biology. Diciembre 2005)

Low expression of the CD3 ζ chain has been reported in patients with cancer and it was suggested that tumour-derived factors were involved in this down-regulation. The expression of this chain was measured in T-cell lines from patients with gastric adenocarcinoma and healthy volunteers and grown *in vitro* for several months and, hence, in the absence of any such factor.

T-cell lines of mucosal origin were obtained by *Herpesvirus saimiri* transformation, from patients. CD3 ζ and CD3 ϵ expression was measured by flow cytometry and western-blot. Calcium mobilization and apoptosis rate was also measured.

The number of CD3 ζ , but not CD3 ϵ , chain molecules on the cell surface was significantly reduced in T-cell lines from patients when cultured in the absence of IL2. Western-blot analysis of total cell extracts or lipid rafts confirmed this absence. Calcium mobilization, a measure of signal transduction, was reduced in patients, a reduction not due to increased apoptosis or necrosis rate. T cells from patients with cancer express lower levels of CD3 ζ . This down-regulation is not caused by a direct effect of tumour-derived factors but, rather, seems inherent to the patient cells. The low CD3 ζ expression would render T lymphocytes unable to cope with the growing tumour.