

Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

Volumen
Volume 15

Número
Number 3




Julio-Septiembre
July-September 2002

Artículo:




Alteración en la diferenciación de
células dendríticas inmaduras humanas
por adenocarcinomas pulmonares.

Derechos reservados, Copyright © 2002:
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

**Otras secciones de
este sitio:**

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

***Others sections in
this web site:***

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)



[Medigraphic.com](http://www.Medigraphic.com)

Alteración en la diferenciación de células dendríticas inmaduras humanas por adenocarcinomas pulmonares

Federico Ávila Moreno^{*,‡}
Carmen Sánchez Torres[‡]
Amaranta Rivas Carvalho[‡]
Heriberto Prado García^{*}
José Sullivan López González^{*}

Palabras clave: Células dendríticas, célula presentadora de antígeno, factores solubles, adenocarcinoma pulmonar, HLA-DR, CD1a, CD32, inhibición de la proliferación celular, citometría de flujo.

Key words: Dendritic cells, antigen presenting cell, soluble factors, lung adenocarcinoma, HLA-DR, CD1a, CD32, inhibition of proliferation rate, flow cytometry.

RESUMEN

Introducción: La diferenciación y maduración de las células dendríticas son eventos cruciales que definen su capacidad para inducir una respuesta inmune en contra de tumores. Se ha reportado que los tumores pulmonares evaden la respuesta inmu-

ne por distintas estrategias. Sin embargo, se desconoce si los adenocarcinomas pulmonares afectan la diferenciación de las células dendríticas.

Objetivo: Estudiar las alteraciones que factores solubles liberados por adenocarcinomas pulmonares inducen en la diferenciación de monocitos a células dendríticas inmaduras.

Material y métodos: Monocitos CD14⁺ purificados de donadores sanos se diferenciaron a células dendríticas inmaduras con factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos e interleucina-4. Empleando este mismo procedimiento, se cultivaron monocitos en presencia de factores solubles provenientes de líneas tumorales o células mononucleares como control. Se determinó por citometría de flujo: i) el porcentaje de células y ii) la expresión de las moléculas CD14, HLA-DR, CD1a, CD32, CD40, CD11b, CD80, CD86 y CD83. Asimismo, se estudió la capacidad de las células dendríticas inmaduras para activar la proliferación de linfocitos T alogénicos.

Resultados: Factores solubles liberados por tres líneas de adenocarcinoma pulmonar, tendieron en las células dendríticas inmaduras a reducir la expresión de CD1a, así como a incrementar el porcentaje de células y la expresión del receptor Fc [FcγRII (CD32)]. Sólo una línea celular tendió a

* Laboratorio de Cáncer Pulmonar, Departamento de Enfermedades Crónico-Degenerativas. Unidad de Investigación, INER.

‡ Laboratorio de Células Dendríticas, Departamento de Biomedicina Molecular. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2502, colonia San Pedro Zacatenco, México, D.F., 07360.

Correspondencia:

M. en C. Federico Ávila Moreno. Laboratorio de Cáncer Pulmonar, Departamento de Enfermedades Crónico-Degenerativas. Unidad de Investigación. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Calzada de Tlalpan No. 4502, colonia Sección XVI, México, D.F., 14080. Fax. 5665-4623, Tel. 5665-0043.

E-mail: favila@mail.cinvestav.mx

Trabajo recibido: 02-VII-2002; Aceptado: 13-IX-2002

incrementar la expresión de HLA-DR. Además, las células dendríticas inmaduras que previamente interaccionaron con sobrenadantes de las células tumorales, inhibieron la proliferación de linfocitos T alogénicos comparados con el control.

Conclusiones: Células de adenocarcinoma pulmonar afectan el proceso de diferenciación de monocitos a células dendríticas inmaduras, generando células dendríticas con un mayor carácter macrofágico. La pobre activación de linfocitos T inducida por células dendríticas inmaduras sugiere alteración en la funcionalidad de estas últimas. Es probable que las alteraciones demostradas en las células dendríticas inmaduras induzcan en el huésped, tolerancia a antígenos tumorales e inhibición de la respuesta inmune antitumoral, como mecanismo de evasión causado por los carcinomas pulmonares.

ABSTRACT

Introduction: Differentiation and maturation of dendritic cells (DCs) are characterized by changes in their phenotype and function. The DCs participation is crucial in the induction of an antitumor immune response. It has been reported that lung carcinomas elude the immune response using various strategies. Alterations in the DCs differentiation by lung adenocarcinoma, however, have not been described.

Objective: To study alterations on the differentiation from monocytes to immature DCs (iDCs) due to soluble factors released by lung adenocarcinoma.

Material and methods: CD14⁺ monocytes purified from peripheral blood mononuclear cells (MNC) were cultured with GM-CSF and IL-4 to induce differentiation to iDCs. Using the same procedure, soluble factors released from three different adenocarcinoma cell lines or from MNC (control) were added to the monocyte cultures. Changes in the percentage of positive cells and in the expression of CD14, HLA-DR, CD1a, CD32, CD40, CD11b, CD80, CD86 and CD83 molecules, measured as mean of fluorescence intensity (MF), were detected using flow cytometry. Proliferation rate was evaluated from co-cultures of iDCs and allogeneic T cells.

Results: The soluble factors released by three lung adenocarcinoma lines tended in the iDCs to reduce the expression of CD1a, and to increase the percentage of cells and the expression of CD32. Only one cell line tended to increase the expression of HLA-DR. Inhibition of allogeneic T cells proliferation was detected when iDCs (previously stimulated with supernatants from tumor cells) were added to the co-cultures.

Conclusion: Adenocarcinoma cell lines altered the differentiation process from monocytes to iDCs.

Our results suggest that iDCs expressed a macrophage-like phenotype. This type of iDCs induced a strong inhibition on the proliferation rate of allogeneic T cells. DCs with these alterations might induce tolerance to the tumor antigens, blocking the induction of an efficient immune response against the tumor.

INTRODUCCIÓN

Las células dendríticas (DCs, por sus siglas en inglés) derivan de precursores hematopoyéticos (células CD34⁺ de médula ósea, monocitos, etcétera) y para su generación requieren dos procesos: *i)* diferenciación y *ii)* maduración¹. Las DCs pertenecen al sistema de células presentadoras de antígeno profesionales (APC) y se ha considerado que son las más eficientes en activar a linfocitos T (LT) vírgenes para la inducción de una respuesta inmune primaria^{1,2}.

En los tejidos, las DCs intersticiales se encuentran en estadio inmaduro (iDCs). En este estadio muestran características morfológicas como prolongaciones membranales tipo dendritas y, características fenotípicas entre las que se encuentran: baja expresión de moléculas codificadas por el MHC, de moléculas de adhesión y coestimuladoras³, así como la inducción de moléculas de presentación de antígenos no peptídicos (CD1a-d, entre otros)⁴. Con relación a su funcionalidad, las iDCs poseen elevada capacidad de internalizar antígenos a través de tres procesos: fagocitosis, endocitosis mediada por receptores específicos y macropinocitosis constitutiva⁵. Los receptores que median la captación de antígenos son: FcγR (CD32 y CD64)⁶, FcεRII (CD23), FcαR, receptores para factores del complemento, receptores Toll y receptores de naturaleza lectina tipo C con dominios de unión a carbohidratos como receptor de manosa (MR), DEC-205, langerina, dectina, DC-SIGN, entre otros⁷.

En respuesta a estímulos inflamatorios, las iDCs migran de los tejidos u órganos periféricos a los órganos linfoides secundarios. Durante la migración, las iDCs regulan diferencialmente la expresión de receptores para quimiocinas, disminuyen la expresión de moléculas involucradas en la captura del antígeno (FcR, MR, etcétera) e incrementan la expresión tanto de moléculas del MHC como de moléculas coestimuladoras, así como la liberación de citocinas (IL-12, IL-1β, IFN-γ, TNF-α, etcétera). Se considera que en esta etapa, las DCs han alcanzado el estadio de maduración (mDCs) adquiriendo características que les permite participar eficientemente como APC⁸.

A partir de cultivos de monocitos (CD1a⁻, CD14⁺) se ha logrado la generación de DCs mediante la adición de distintas citocinas. En particular, Sallusto y colaborador³ han reportado que la adición conjunta del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e interleucina-4 (IL-4) a monocitos induce su diferenciación a iDCs y la combinación de estas citocinas con TNF-α induce su maduración a mDCs⁹⁻¹². La Tabla I muestra algunas de las moléculas asociadas al fenotipo de monocitos, iDCs y mDCs.

Tabla I. Expresión de marcadores de diferenciación y maduración en DCs de origen monocítico.

Moléculas	Monocitos	iDCs	MDCs
<i>Receptor para LPS</i>			
CD14	+++	+/-	-
<i>Receptores Fc</i>			
CD32	++	+	+/-
CD64	++	+/-	-
<i>Adhesión</i>			
CD11b	++	+	+
CD11c	+	++	++
ICAM-1 y 2	+	++	+++
<i>Coestimuladoras</i>			
CD40	+	++	+++
CD80	-	+/-	++
CD86	+/-	+	++
<i>Presentadoras de antígeno</i>			
HLA-ABC, DP, DQ	+	++	+++
HLA-DR	+	++	+++
CD1a	-	++	+
<i>Maduración/Activación</i>			
CD83	-	+/-	+
CD45 RO	-	++	++

Adaptada de¹. iDCs: Células dendríticas inmaduras; mDCs: Células dendríticas maduras; LPS: Lipopolisacárido. Grado de expresión: - negativo; +/- variable; + bajo; ++ alto; +++ muy alto.

Dada la importancia que tienen las DCs en la inducción de la respuesta inmune, se han iniciado estudios sobre su participación en la respuesta inmune antitumoral¹³. Se ha detectado la presencia de DCs que infiltran al tumor en varios tipos de carcinomas incluyendo el de pulmón¹⁴⁻¹⁸. Algunos autores han sugerido una relación directa entre mayor número de DCs infiltrantes con un mejor pronóstico^{14,15,19,20}. Esta asociación ha contribuido a destacar la importancia que tienen las DCs en el cáncer. Por otro lado, se ha reportado que algunas neoplasias alteran el fenotipo o funcionamiento de DCs²¹⁻²⁴.

Durante el desarrollo maligno se establece una interacción compleja entre células tumorales, células del sistema inmune y células del estroma, generándose un microambiente constituido por distintos factores provenientes de diversos tipos celulares, los que influyen en las células neoplásicas como en las células de la respuesta inmune. Previamente, hemos reportado que factores solubles liberados por carcinomas pulmonares afectan la producción de TNF- α por monocitos²⁵. A la fecha, no tenemos conocimiento de reportes que estudien el efecto de adenocarcinomas pulmonares en la generación de DCs, por lo que nuestro grupo estudió el efecto de factores solubles secretados por líneas celulares de

adenocarcinoma en el proceso de diferenciación *in vitro* de monocitos a iDCs.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos

Se emplearon las citocinas recombinantes GM-CSF a la concentración de 1000U/mL (*PharMingen*, San Diego, CA) e IL-4 a la concentración de 15ng/mL (*Calbiochem*, La Jolla, CA). Anticuerpos para separación negativa de LT CD3⁺ y anticuerpos anti-CD14, ambos acoplados a microesferas metálicas (*Miltenyi Biotec*, *Bergisch Gladbach*, Germany). Anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD14, anti-HLA-DR, anti-CD1a, anti-CD32, anti-CD40, anti-CD11b, anti-CD80, anti-CD83 y anti-CD86 obtenidos de *PharMingen*. El anticuerpo secundario policlonal de cabra contra inmunoglobulinas de ratón acoplado a FITC fue obtenido de *Dako* (Carpinteria, CA).

Líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar

Se emplearon tres líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar la SK-LU-1 obtenida del American Type Culture Collection (ATCC), así como las líneas celulares 1.3.11 y 3B1A generadas de pacientes y reportadas previamente²⁶. Además, células mononucleares (CMN) de sujetos sanos. Las células tumorales y CMN se cultivaron empleando medio RPMI-1640 adicionado con 10% de suero fetal bovino inactivado, L-glutamina 2mM, piruvato de sodio 1mM, aminoácidos no esenciales 1%, (*Hyclone Logan*, UT), penicilina/estreptomina al 1% y 2-mercapto-etanol 50 μ M (*Gibco/BRL*, Grand Island, NY).

Obtención de sobrenadantes

Las células tumorales (1x10⁶) o las CMN (5x10⁶) se cultivaron en 10mL de medio de cultivo por 24h. Se recuperó el sobrenadante (SN) por centrifugación a 250 x g durante 10min e inmediatamente se procedió a su congelación. Previo a su adición a los cultivos de monocitos, los SN se mezclaron en proporción 1:1 con medio RPMI-1640 conteniendo 10% de suero humano.

Separación y purificación de monocitos

Mediante leucoféresis se obtuvieron concentrados leucocitarios de dos donadores sanos, se separaron las CMN empleando gradientes de densidad usando *Ficoll-Hypaque* (*Gibco/BRL*). Los monocitos fueron purificados por selección positiva empleando anticuerpos anti-CD14 unidos a microesferas metálicas. La pureza y viabilidad de la población en estudio siempre fue superior al 96%.

Diferenciación de células CD14⁺ a DCs inmaduras

Los monocitos purificados (CD14⁺) fueron cultivados a una densidad de 1 x 10⁶ cel/mL en placas de 12 pozos (Costar, Cambridge, MA) por seis días, adicionando GM-CSF e IL-4 al inicio del cultivo y renovado cada dos días. Para estudiar el efecto que el adenocarcinoma pulmonar causa en las iDCs, se adicionó SN proveniente de cada

línea tumoral desde el inicio del cultivo y éste, junto con las citocinas recombinantes, se renovó cada dos días. Como control se empleó SN de CMN. Al término de los cultivos, las iDCs se recuperaron para su inmunotinción o empleo en ensayos de proliferación alogénica de LT.

Inmunotinción

Las iDCs se ajustaron a 5×10^5 cel/mL en amortiguador fosfatos conteniendo azida de sodio (0.01%) y albúmina sérica bovina (0.1%) y se colocaron 100 µL de esta suspensión celular por pozo en placas de 96 pozos. Se adicionó 0.1 µg del anticuerpo monoclonal primario correspondiente a cada molécula por estudiar a los pozos respectivos y la placa se incubó a 4°C por 45 min. Después de lavar dos veces con amortiguador de fosfatos, las iDCs fueron incubadas con 100 µL de anticuerpo secundario conjugado a isotiocianato de fluoresceína [FITC (dilución 1:80)] a 4°C por 30 min en oscuridad. Posterior al lavado, las iDCs se fijaron con 200 µL de solución fijadora de FACS 1X (*Becton Dickinson*). Como control se emplearon iDCs conteniendo únicamente el anticuerpo secundario.

Citometría de flujo

Se empleó el citómetro de flujo FACScalibur (*Becton Dickinson*, Mountain View, CA) para la adquisición de 5,000 eventos. Los datos obtenidos se analizaron empleando histogramas.

Ensayos de proliferación de LT alogénicos

Las iDCs tratadas previamente con SN de CMN (control) o con SN provenientes de células tumorales, se co-cultivaron con 3×10^5 LT alogénicos por cinco días. Los co-cultivos se realizaron en relaciones seriadas de 1:10 a 1:160 (DCs:LT) manteniendo constante la densidad celular de LT alogénicos purificados (> 96%). Los ensayos de proliferación se realizaron por duplicado en placas de 96 pozos (Costar). Al día cinco, los co-cultivos fueron pulsados con 0.5 µCi/pozo de ^3H -timidina (Amersham, Arlington Heights, IL) por 18 h. Al término, los cultivos se cosecharon y se detectó la incorporación de ^3H -timidina (cpm) empleando un contador de centelleo líquido Beckman, LS 6500 (Fullerton, CA).

RESULTADOS

La población de DCs obtenida con la adición de GM-CSF e IL-4 mostró características morfológicas como desarrollo de prolongaciones membranales tipo dendritas, observadas por microscopia óptica (datos no mostrados). Por otro lado, el perfil de fluorescencia debido al anticuerpo secundario no mostró cambios en relación con la autofluorescencia de las iDCs analizadas. El incremento en la fluorescencia debida al anticuerpo primario se consideró como detección específica y a partir de ésta, se determinó: *i)* el porcentaje de células positivas a cada marcador, así como *ii)* la expresión de cada marcador, detectada mediante la intensidad media de fluorescencia (MF) co-

respondiente. Los datos de MF mostrados representan el valor promedio obtenido de muestras por duplicado.

Nuestro estudio mostró que sólo 2-5% de la población de iDCs fue CD14⁺, mientras que el 97-99% de las células presentaron las moléculas CD1a o CD40. Además, se detectaron porcentajes de células en intervalos de 15-25%, 20-30% y 7-12% para los marcadores CD80, CD86 y CD83, respectivamente. Los porcentajes de células que mostraron los marcadores antes indicados, nos permiten considerar a la población empleada en el estudio como DCs en estadio inmaduro.

Con relación a los marcadores HLA-DR, CD1a, CD32, CD40 y CD11b, el porcentaje de células y la intensidad MF fueron similares a los resultados obtenidos cuando la diferenciación a iDCs fue realizada en presencia de los sobrenadantes (SN) obtenidos de las CMN de sujetos sanos. En estas últimas, las iDCs obtenidas del sujeto 1 y 2 mostraron que el 99 y 96% de la población celular fue HLA-DR⁺. El 98 y 93% fue CD1a⁺. El 64 y 74% fue CD32⁺. El 99 y 98% de las células fue CD40⁺. El 98 y 97% mostró CD11b, respectivamente. El valor promedio de la MF debido a la expresión de cada uno de los marcadores se indica en la Tabla II.

Las iDCs generadas en presencia del SN de las líneas tumorales mostraron los siguientes resultados: con relación a la molécula HLA-DR, el porcentaje de iDCs del sujeto 1 y 2 no se modificó con respecto al control (datos del sujeto 1 se indican en la Figura 1). Sin embargo, la exposición a SN de la línea 1.3.11 mostró en ambos sujetos una tendencia a incrementar la expresión de este marcador en 78 y 41%. Las líneas 3B1A y SK-LU-1 no modificaron el valor promedio de la MF (Tabla II).

Respecto a CD1a, los SN provenientes de las líneas tumorales 1.3.11 y 3B1A mostraron una tendencia a reducir el porcentaje de iDCs del sujeto 1 a 91-92% (Figura 1) y del sujeto 2 a 86-88%, comparado con los controles; en cambio, la línea SK-LU-1 no alteró dicho porcentaje. Por otro lado, los SN de las tres líneas tumorales mostraron tendencia a disminuir en las iDCs de ambos sujetos la expresión de CD1a; la línea 1.3.11 en 20 y 23%, la línea 3B1A en 43 y 37% respectivamente, mientras que la línea SK-LU-1 afectó sólo al sujeto 1 en 26%, (Tabla II).

Respecto a CD32, los SN de las tres líneas tumorales estudiadas mostraron una tendencia a incrementar en ambos sujetos tanto el porcentaje de células como la expresión de este marcador. El sujeto 1 incrementó el porcentaje de células a 70-75% (Figura 1) y el sujeto 2 a 87-93%, comparado con los controles correspondientes. Con relación a la expresión de CD32, la línea 1.3.11 tendió a incrementar su expresión en 95% sólo en el sujeto 1, la línea 3B1A incrementó en 89 y 41% en ambos sujetos, mientras que la línea SK-LU-1 lo hizo en 26 y 21%, como se indica en la Tabla II.

Con relación a las moléculas CD40 y CD11b, los porcentajes de células de ambos sujetos en presencia de SN de las líneas tumorales (96-99%) no mostraron cambios

Tabla II. Valor promedio de la intensidad media de fluorescencia y porcentaje de cambio debido a la expresión de diversos marcadores en iDCs.

SN	HLA-DR	CD1a	CD32	CD40	CD11b
Control					
1°	101*	347	19	301	213
2	183	418	76	226	317
1.3.11					
1	180 (+ 78%)**	276 (-20%)	37 (+ 95%)	309 (+ 3%)	176 (-17%)
2	258 (+ 41%)	321 (-23%)	83 (+ 10%)	263 (+ 16%)	338 (+ 7%)
3B1A					
1	110 (+ 8.9%)	197 (-43%)	36 (+ 89%)	304 (+ 1%)	232 (+ 9%)
2	204 (+ 11%)	265 (-37%)	107 (+ 41%)	260 (+ 15%)	318 (+ 1%)
SK-LU-1					
1	85 (-16%)	257 (-26%)	24 (+ 26%)	306 (+ 2%)	212 (-1%)
2	151 (-17%)	395 (-5%)	92 (+ 21%)	245 (+ 8%)	345 (+ 8%)

° Individuos incluidos en el estudio; *Valor promedio de la intensidad media de fluorescencia (MF) obtenida de muestras por duplicado; **Porcentaje de incremento (+) o decremento (-) de la MF con relación al control respectivo.

Expresión de diversos marcadores de superficie en iDCs

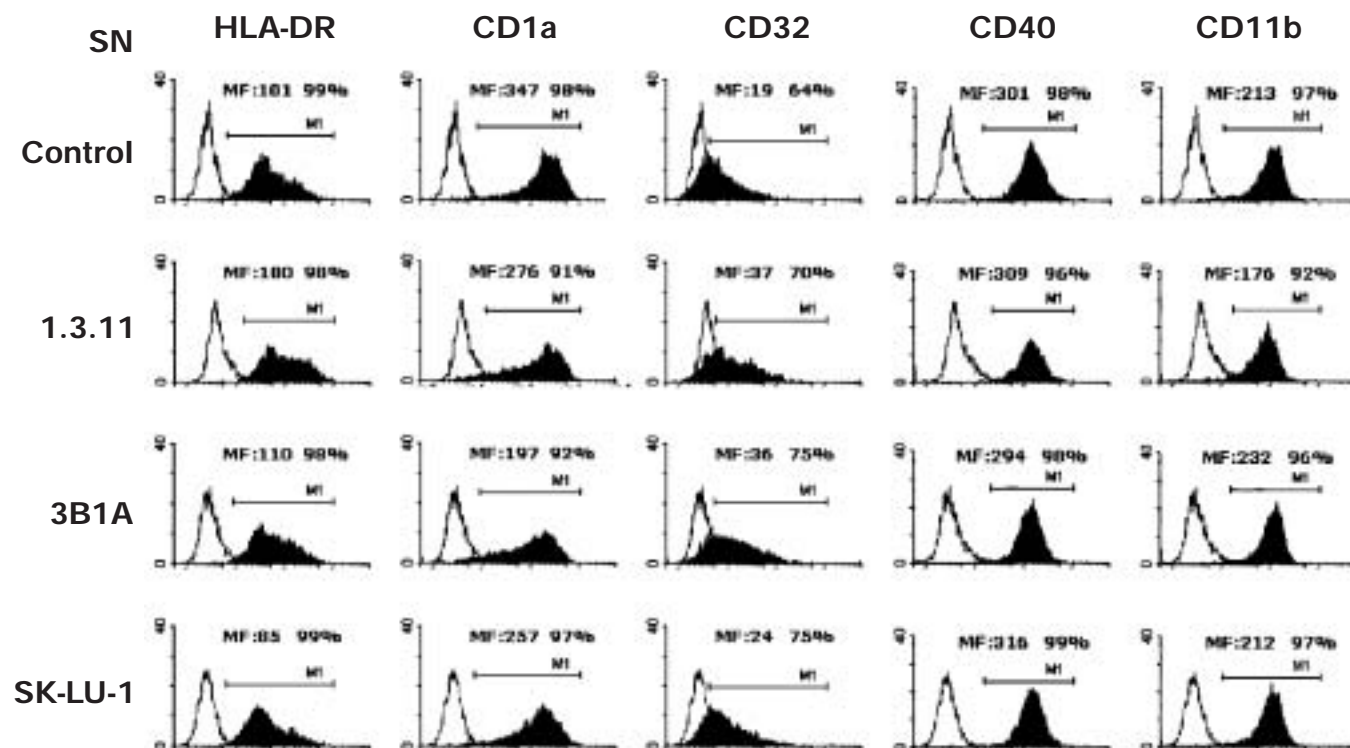


Figura 1. Los histogramas muestran el porcentaje (%) de iDCs que expresan moléculas HLA-DR, CD1a, CD32, CD40 y CD11b en presencia de SN obtenidos de CMN (control) o de líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar. El perfil de fluorescencia debida al anticuerpo secundario se indica por el área blanca, el perfil de fluorescencia debida a las moléculas de superficie se indican por el área negra.

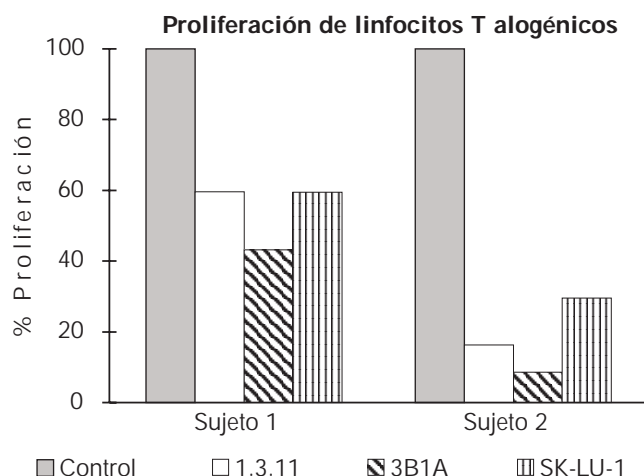


Figura 2. Proliferación alogénica de LT inducida por iDCs de dos individuos a la relación 1:80. Las iDCs fueron tratadas previamente con los SN provenientes de CMN (control) o de las células de adenocarcinoma pulmonar indicadas.

con respecto a los controles. La expresión de estas moléculas tampoco mostró cambios en la MF (Tabla II).

Por otro lado, se detectó reducción en la proliferación de LT alogénicos debida a iDCs tratadas previamente con SN de las líneas tumorales. Como se muestra en la Figura 2, en el sujeto 1 la inhibición encontrada varió de 40-57%, mientras que en el sujeto 2 la inhibición fue mayor al 70%. Los porcentajes de inhibición fueron obtenidos a una relación 1:80; un comportamiento semejante se obtuvo en las distintas relaciones DCs:LT empleadas (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

Con base al procedimiento reportado previamente³, el empleado por nuestro grupo permitió generar DCs que morfológica, fenotípica y funcionalmente pueden ser consideradas en etapa inmadura. Morfológicamente, las células mostraron desarrollo de prolongaciones tipo dendritas. Fenotípicamente, la población celular no expresó la molécula CD14 (presente en monocitos), incrementó CD40 e indujo la expresión *de novo* de CD1a. Además, el bajo porcentaje de células que expresaron las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 así como la ausencia de la expresión de CD83 (moléculas presentes en mDCs)¹ confirman el estadio de las DCs.

Existen reportes con relación a la participación de las DCs en cáncer, pero escasos estudios referentes a la(s) alteración(es) inducidas por células tumorales en los procesos de diferenciación y/o maduración de DCs. Reportes empleando inmunohistoquímica han sugerido que el incremento de DCs infiltrantes en tumores correlaciona con un mejor pronóstico^{14-16,19,20}. De manera contraria, estudios fenotípicos o funcionales en DCs infiltrantes obtenidas de tumores de pacientes o de modelos animales han repor-

tado deficiencias en las DCs asociadas a la inmunosupresión inducida por el tumor^{18,27-29}.

En estudios *in vitro*, Kiertscher y colaboradores³⁰ han descrito que la adición de SN de líneas celulares de distintos carcinomas (colon, renal, pancreático, etcétera) incrementan en DCs la expresión de moléculas relacionadas con su maduración y presentación de antígeno. Sin embargo, dicho efecto está acompañado de reducción en la síntesis de IL-12 así como de apoptosis temprana de las DCs, sugiriendo que a pesar de que las células tumorales activan a las DCs, su muerte prematura evita la inducción eficiente de la respuesta inmune antitumoral.

Durante la transformación maligna, la célula presenta alteraciones genómicas al azar que repercuten en la adquisición de características genotípicas y fenotípicas particulares que conllevan o no a su manifestación clínica. A pesar de los grandes esfuerzos realizados para la identificación de los factores solubles liberados por las células tumorales, a la fecha sólo se ha logrado un conocimiento parcial. Debido a ello, en la mayor parte de los estudios se han empleado sobrenadantes obtenidos del cultivo de las células tumorales con la finalidad de mantener la relación de los diversos factores solubles liberados por las mismas³⁰.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio demuestran que factores solubles secretados por células de adenocarcinoma pulmonar, alteran la expresión de moléculas relacionadas con el fenotipo y funcionalidad de las DCs. En general, los SN de las líneas tumorales tendieron a alterar principalmente la expresión de la molécula CD1a y, el porcentaje de células y la expresión de CD32. Se ha descrito que durante la diferenciación de monocitos a iDCs se induce la expresión de la molécula CD1a, mientras que durante el proceso de maduración su expresión disminuye considerablemente³¹. Con relación a este marcador, la disminución en su expresión sugiere dos posibilidades: a) retardo en la diferenciación o, b) maduración prematura de iDCs.

Se ha reportado que en el humano las iDCs expresan preferentemente FcR (CD32)^{32,33}, el cual participa en la fagocitosis de complejos inmunes⁴ y que la disminución en su expresión sugiere un mayor grado de maduración alcanzado por las DCs³⁴. Esta molécula posee en su dominio intracelular una secuencia que participa en la generación de señales inhibitorias⁴. En nuestros resultados, el incremento tanto en el porcentaje de células como en la expresión de CD32 sugiere la participación de señalización negativa que repercute en la funcionalidad de las DCs, (ver más adelante).

Se ha reportado previamente que la adición de vitamina D₃³⁵ o IL-10³⁶ a las DCs disminuye la inducción de CD1a e incrementa la expresión de CD32, lo cual se ha asociado con la diferenciación de monocitos a macrófagos³⁶. Es probable que un fenómeno similar se manifieste en nuestras condiciones metodológicas, en el cual pueda participar IL-10 u otros factores.

Ya que de manera particular, la línea tumoral 1.3.11 tendió a incrementar la expresión de la molécula HLA-DR,

los resultados obtenidos nos permiten proponer que las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar liberan distintos factores que afectan de manera diversa a las iDCs. Actualmente estamos identificando algunos factores que pueden ser liberados por estas células tumorales.

En conclusión, los resultados obtenidos nos permiten sugerir que los adenocarcinomas liberan factores que aplazan la diferenciación de las iDCs, favoreciendo características de células de tipo macrófago.

Katsenelson y colaboradores³⁷ han reportado que el carcinoma pulmonar de células pequeñas induce en las iDCs reducción drástica en el porcentaje de células con los marcadores HLA-DR, CD1a y CD40. Estos resultados, diferentes a los obtenidos por nosotros, pueden deberse a las características agresivas que muestra este tumor, comparado con el adenocarcinoma pulmonar o bien, al distinto origen precursor de las DCs empleadas por ellos (células CD34⁺).

A pesar de que los cambios fenotípicos observados en nuestros resultados no fueron contundentes, las iDCs mostraron alteraciones en la capacidad para activar a LT alógenicos. Dichas alteraciones no parecen ser reversibles, ya que la inhibición se mantiene aún en la ausencia de dichos factores solubles. Este fenómeno pudiera ser resultado de los cambios que, al nivel de membrana, tiene la expresión de las moléculas estudiadas o de otras; por deficiencias en las DCs para secretar citocinas que favorezcan la proliferación de LT o por el incremento en la expresión de citocinas con actividad inmunosupresora que afecten la interacción DCs-LT. Será importante determinar si la inhibición inducida por las DCs se mantiene aún en su etapa madura. Nos encontramos estudiando algunas de estas posibilidades. Es probable que si el fenómeno de inhibición se presenta *in vivo*, sea responsable de la deficiente respuesta inmune antitumoral observada en los pacientes con cáncer^{18,27}.

Recientemente se ha demostrado que la migración de DCs en etapa inmadura a ganglios linfáticos induce tolerancia de LT a los antígenos presentados por las DCs^{38,39}. Posiblemente las células neoplásicas generen tolerancia a los antígenos tumorales, manteniendo a las DCs en su etapa inmadura. Serán necesarios más estudios para analizar esta posibilidad.

En los últimos años, se han realizado esfuerzos para el empleo de DCs como estrategia inmunoterapéutica en pacientes con cáncer. Sin embargo, en algunos de ellos no se observa regresión del tumor tras la administración de las DCs^{40,41}. El uso de DCs, en pacientes con cáncer pulmonar, plantea la necesidad de profundizar en los mecanismos de evasión de los carcinomas pulmonares y su efecto sobre la diferenciación, maduración y funcionamiento de DCs. Lo anterior permitirá en el futuro, el diseño de estrategias sólidas y eficientes de la inmunoterapia, basada en el uso de DCs, en contra de los carcinomas pulmonares.

CONCLUSIONES

Las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar liberaron factores solubles que indujeron cambios fenotípicos y

funcionales en el proceso de diferenciación a iDCs. Estos cambios se manifestaron principalmente por disminución en la expresión de CD1a, incremento en el porcentaje de células y en la expresión del marcador CD32 e inhibición de la proliferación de LT alógenicos. Estas alteraciones sugieren un desvío en la ruta de diferenciación de monocitos hacia iDCs que manifiestan un mayor carácter macrófago.

Agradecimientos

Agradecemos al banco de sangre del Hospital Juárez de México en la ciudad de México, Distrito Federal el suministro de concentrados leucocitarios de donadores sanos. A Víctor M. Rosales por su ayuda técnica en el uso del citómetro de flujo. A Héctor Vilchis Vivas por su apoyo técnico en el suministro de material estéril. El M. en C. Federico Ávila Moreno, agradece la beca de doctorado otorgada actualmente por el CONACyT (registro # 142632).

REFERENCIAS

1. Hart DN. *Dendritic cells: Unique leukocyte populations which control the primary immune response*. Blood 1997;9:3245-3287.
2. Steinman RM. *The dendritic cell system and its role in immunogenicity*. Annu Rev Immunol 1991;9:271-296.
3. Sallusto F, Lanzavecchia A. *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by GM-CSF factor plus IL-4 and down regulated by TNF- α* . J Exp Med 1994;4:1109-1118.
4. Sozzani S, Allavena P, Mantovani A. *Dendritic cells and chemokines*. In: Lotze TM, Thompson WA, editors. *Dendritic cells: Biology and clinical applications*. 2nd ed. Great Britain: Academic Press; a Harcourt Science and Technology Company, 2001:203-211.
5. Watts C. *Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules*. Annu Rev Immunol 1997;15:821-850.
6. Ravetch JV, Bolland S. *IgG Fc receptors*. Annu Rev Immunol 2001;19:275-290.
7. Figdor CG, Van Kooyk Y, Adema GJ. *C-Type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells*. Nature Rev Immunol 2002; 2:77-84.
8. Steinman RM, Witmer-Pack M, Inaba K. *Dendritic cells: antigen presentation, accessory function and clinical relevance*. Adv Exp Med Biol 1993;329:1-9.
9. Zhou LJ, Tedder TF. *CD14⁺ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83⁺ dendritic cells*. Proc Natl Acad Sci USA 1996;6:2588-2592.
10. Eibl B, Ebner S, Duba C, Bock G, Romani N, Erdel M, et al. *Dendritic cells generated from blood precursors of chronic myelogenous leukemia patients carry the Philadelphia translocation and can induce a CML-specific primary cytotoxic T-cell response*. Genes Chromosomes Cancer 1997;3:215-223.
11. Holt GP. *Antigen presentation in the lung*. Am J Respir Crit Care Med 2000; 4:151S-156S.

12. Croizet K, Rabilloud R, Kostrouch Z, Nicolas JF, Rousset B. *Culture of dendritic cells from a nonlymphoid organ, the thyroid gland: evidence for TNF alpha-dependent phenotypic changes of thyroid-derived dendritic cells.* Lab Invest 2000;8:1215-1225.
13. Rock KL, Rothstein L, Gamble S, Fleischacker C. *Characterization of antigen-presenting cells that present exogenous antigens in association with class I MHC molecules.* J Immunol 1993;2:438-446.
14. Zeid NA, Muller HK. *S100 positive dendritic cells in human lung tumors associated with cell differentiation and enhanced survival.* Pathol 1993;4:338-343.
15. Ambe K, Mori M, Enjoji M. *S-100 protein-positive dendritic cells in colorectal adenocarcinomas. Distribution and relation to the clinical prognosis.* Cancer 1989;3:496-503.
16. Kakeji Y, Maehara Y, Korenaga D, Tsujitani S, Haraguchi M, Watanabe A, et al. *Prognostic significance of tumor-host interaction in clinical gastric cancer: relationship between DNA ploidy and dendritic cell infiltration.* J Surg Oncol 1993; 4:207-212.
17. Thurnher M, Radmayr C, Ramoner R, Ebner S, Bock G, Klocker H, et al. *Human renal-cell carcinoma tissue contains dendritic cells.* Int J Cancer 1996;1:1-7.
18. Enk AH, Jonuleit H, Saloga J, Knop J. *Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma.* Int J Cancer 1997;3:309-316.
19. Gong X, Yan Y, Wu J. *Tumor infiltrating dendritic cells in relation to prognosis of lung cancer.* Zhonghua Zhong Liu Za Zhi 2000;2:135-137.
20. Gong X, Yan Y, Wu J. *Dendritic cell infiltration in lung adenocarcinoma and its effect on prognosis.* Zhonghua Zhong Liu Za Zhi 2000;8:478-479.
21. Tas MP, Simons PJ, Balm FJ, Drexhage HA. *Depressed monocyte polarization and clustering of dendritic cells in patients with head and neck cancer: in vitro restoration of this immunosuppression by thymic hormones.* Cancer Immunol Immunother 1993; 2:108-114.
22. Gabrilovich DI, Corak J, Ciernik IF, Kavanaugh D, Carbone DP. *Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer.* Clin Cancer Res 1997;3:483-490.
23. Rezvany MR, Jeddi-Tehrani M, Biberfeld P, Soderlund J, Mellstedt H, Osterborg A, et al. *Dendritic cells in patients with non-progressive B-chronic lymphocytic leukemia have a normal functional capacity but abnormal cytokine pattern.* Br J Haematology 2001; 2:263-271.
24. Narita M, Takahashi M, Liu A, Ayres F, Satoh N, Abe T, et al. *Generation of dendritic cells from leukaemia cells of a patient with acute promyelocytic leukaemia by culture with GM-CSF, IL-4 and TNF-alpha.* Acta Haematol 2001;3:89-94.
25. Ávila-Moreno F. *Alteraciones en la expresión de TNF- α en un modelo celular tipo monocito causadas por adenocarcinoma pulmonar* (Tesis de maestría en Biomedicina Molecular). México. DF: CINVESTAV-IPN, Zacatenco, 2001.
26. López-González JS, Aguilar-Cázares D, Prado-García H, Nieto-Rodríguez A, Mandoki JJ, Ávila-Moreno F, et al. *Lack of correlation between growth inhibition by TGF- β and the percentage of cells expressing type II TGF- β receptor in human non-small cell lung carcinoma cell lines.* Lung Cancer 2002; 38:149-158.
27. Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, et al. *Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer.* Clin Cancer Res 2000;5:1755-1766.
28. Nestle FO, Burg G, Fah J, Wrone-Smith T, Nickoloff BJ. *Human sunlight-induced basal-cell-carcinoma-associated dendritic cells are deficient in T cell co-stimulatory molecules and are impaired as antigen-presenting cells.* Am J Pathol 1997;2:641-651.
29. Ishida T, Oyama T, Carbone DP, Gabrilovich DI. *Defective function of Langerhans cells in tumor-bearing animals is the result of defective maturation from hematopoietic progenitors.* J Immunol 1998;9:4842-4851.
30. Kiertscher SM, Luo J, Dubinett SM, Roth MD. *Tumors promote altered maturation and early apoptosis of monocyte-derived dendritic cells.* J Immunol 2000;3:1269-1276.
31. Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, et al. *Generation of mature dendritic cells from human blood: an improved method with special regard to clinical applicability.* J Immunol Methods 1996;2:137-151.
32. Fanger NA, Voigtlaender D, Liu C, Swink S, Wardwell K, Fisher J, et al. *Characterization of expression, cytokine regulation, and effector function of the high affinity IgG receptor Fc gamma RI (CD64) expressed on human blood dendritic cells.* J Immunol 1997;7:3090-3098.
33. Geissman F, Launay P, Pasquier B, Lepelletier Y, Leborgne M, Lehuen A, et al. *A subset of human dendritic cells expresses IgA Fc receptor (CD89), which mediates internalization and activation upon crosslinking by IgA complexes.* J Immunol 2001;1:346-352.
34. Sánchez-Torres C, García-Romo GS, Cornejo-Cortés MA, Rivas-Carvalho A, Sánchez-Schmitz G. *CD16+ and CD16-human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD4+ T cells.* Int Immunol 2001;12:1571-1581.
35. Piemonti L, Monti P, Sironi M, Fraticelli P, Leone BE, Dal Cin E, et al. *Vitamin D3 Affects differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells.* J Immunol 2000;9:4443-4451.
36. Allavena P, Piemonti L, Longoni D, Bernasconi S, Stoppaciario A, Ruco L, et al. *Interleukin-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages.* Eur J Immunol 1998;1:359-369.
37. Katsenelson NS, Shurin GV, Bykovskaia SN, Shogan J, Shurin MR. *Human small cell lung carcinoma and carcinoid tumor regulate dendritic cell maturation and function.* Mod Pathol 2001;1:40-45.
38. Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. *The induction of tolerance by dendritic cells that have capture apoptotic cells.* J Exp Med 2000;3:411-416.
39. Huang FP, Platt N, Wykes M, Najor JR, Powell TJ, Jenkins CD, et al. *A discrete subpopulation of dendritic cells transport apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes.* J Exp Med 2000;3:435-444.
40. Thurner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, et al. *Vaccination with Mage3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma.* J Exp Med 1999;11:1669-1678.
41. Geiger J, Hutchinson R, Hohenkirk L, McKenna E, Chang A, Mulé J. *Treatment of solid tumours in children with tumour-lysate-pulsed dendritic cells.* Lancet 2000;356:1163-1165.