



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS ARNm
DE LAS MOLÉCULAS PD-L1 Y PD-L2
EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER PULMONAR**

T E S I S

Que para obtener el título de:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A :

ALDO OSORIO OCHOA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. HERIBERTO PRADO GARCÍA

CO-ASESOR DE TESIS:

DRA. SUSANA ROMERO GARCÍA



PUEBLA, PUE.

SEPTIEMBRE 2016

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1 Cáncer	2
2.2 Hallmarks del cáncer.....	2
2.3 CÁNCER DE PULMONAR	6
2.3.1 Clasificación del cáncer de pulmón.....	7
2.3.2 Estadística del cáncer de pulmón	8
2.4 RESPUESTA INMUNOLÓGICA CONTRA EL CÁNCER	8
2.4.1 Generalidades	8
2.4.2 Teoría de la Inmunoección del cáncer.....	9
2.4.3 Mecanismos de evasión de las células tumorales	11
2.4.4 <i>Checkpoints</i> inmunológicos	11
3. ANTECEDENTES	14
3.1 Generalidades de PD-1 (CD279)	14
3.2 Expresión de PD-L1	14
3.3 Expresión de PD-L2	15
3.4 Función Inmunológica de PD-L1	16
3.5 Expresión de PD-L1 en células tumorales	16
3.6 Regulación de la expresión de PD-L1 en tumores	18
3.7 Funcionalidad de PD-L1 en células tumorales.....	18
3.8 Función inmunológica de PD-L2	20
3.9 Regulación de la expresión de PD-L2.....	21
3.10 Expresión y función Inmunológica de PD-L2 en células tumorales.....	21
3.11 Hipoxia en células tumorales y su función inmunológica	22
3.12 Regulación de la expresión de PD-L1 y PD-L2 en las células tumorales sometidas a hipoxia	23
4. JUSTIFICACIÓN	25
5. HIPÓTESIS	26
6. OBJETIVOS	26
7. Esquema general de trabajo	27

8. MATERIAL Y MÉTODOS	28
8.1 Líneas celulares.....	28
8.2 Conteo y viabilidad celular.....	28
8.3 Incubación Normoxia e Hipoxia.....	29
8.4 Extracción de RNA.....	29
8.5 Tratamiento del RNA con DNAsa.....	30
8.6 Transcripción reversa.....	30
8.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR).....	31
8.8 Validación del ensayo de PCR en tiempo real.....	33
8.9 Análisis estadístico.....	36
9. RESULTADOS	37
9.1 Elección de la concentración óptima de los oligonucleótidos.....	37
9.2 Comprobación de la especificidad de los oligonucleótidos para la reacción en PCR en tiempo real.....	38
9.3 Curva estándar de los diferentes genes analizados.....	39
9.4 Elección del gen endógeno.....	41
9.5 En condiciones de normoxia e hipoxia, la expresión de PD-L1 y PD-L2 fue menor en las líneas tumorales respecto a MRC-5.....	42
9.6 Modificación de los niveles de expresión del ARNm de PD-L1 en las líneas celulares tumorales y los fibroblastos MRC-5 en hipoxia respecto a normoxia.	44
9.7 Modificación de los niveles de expresión del ARNm de PD-L2 en las líneas celulares y los fibroblastos MRC-5 en hipoxia respecto a normoxia.....	45
9.8 Modificación de los niveles de expresión del ARNm de PD-L2 en las líneas celulares respecto a PD-L1 en condiciones de normoxia e hipoxia.....	46
10. DISCUSIÓN	48
11. CONCLUSIÓN	52
12. BIBLIOGRAFÍA	53

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1. Inmunoedición del cáncer.....	10
Figura 2. Regulación de la respuesta de la célula T por las señales co estimuladoras y co-inhibidor.....	12
Figura 3. Ejemplo de la curva de disociación para los oligonucleótidos.....	35
Figura 4. Curvas de amplificación de PCR en tiempo real y la determinación de la concentración óptima de los oligonucleótidos.....	37-38
Figura 5. Curva de disociación de los oligonucleótidos.....	39
Figura 6. Curvas estándar de las diluciones seriadas.....	40
Figura 7. Rango dinámico de la amplificación.....	42
Figura 8. Expresión del ARNm de PD-L1 y PD-L2 en condiciones de normoxia e hipoxia en las líneas celulares tumorales respecto a MRC-5.....	43
Figura 9. Expresión del ARNm de PD-L1 de las líneas celulares de cáncer pulmonar y las células MRC-5 en condiciones de hipoxia respecto a normoxia...	44
Figura 10. Expresión del ARNm de PD-L2 en las líneas celulares de cáncer pulmonar y las células MRC-5 en condiciones de hipoxia respecto a normoxia...	45
Figura 11. Expresión del ARNm de PD-L2 en las líneas celulares de cáncer pulmonar y las células MRC-5 en condiciones de normoxia e hipoxia respecto a PD-L1.....	47

TABLAS

Tabla 1. Expresión del ARNm de PD-L1 en tumores humanos y función clínico patológica.....	17
Tabla 2. Función de la expresión de PD-L1 en diferentes células tumorales.....	20
Tabla 3. Expresión de PD-L2 en diferentes células tumorales y su función inmunológica clínica y patológica.....	22
Tabla 4. Características fisicoquímicas de los oligonucleótidos.....	32
Tabla 5. Cantidad de reactivos para los ensayos de cuantificación.....	33
Tabla 6. Temperaturas del termociclador para qPCR.....	33
Tabla 7. Concentración de primers empleada en la matriz.....	34
Tabla 8. Diluciones estándares empleadas para la curva estándar.....	35

ABREVIATURAS

ATP	Adenosín trifosfato
Akt	Proteína kinasa B
APC	Célula presentadora de antígeno profesional
ATCC	American Type Culture Collection
ADNc	ADN complementario
CO₂	Dióxido de carbono
CT	Ciclo umbral
CTLA-4	Antígeno-4 del linfocito T citotóxico
CTLs	Linfocitos T citotóxicos
DCs	Células dendríticas
DEPC	Dietilpirocarbonato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
FGF	Factor de crecimiento de fibroblasto
GLUT-1	Transportador de glucosa 1
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
HDI	Índice de desarrollo humano
HIF-1α	Factor inducible por hipoxia 1 alfa
HPRT-1	Hipoxantina guanina fosforribosil transferasa 1
IARC	International Agency for Research on Cancer
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IFN-γ	Interferón gamma
ITIM	Motivo inhibitorio del inmunoreceptor basado en tirosina
ITSM	Motivo de cambio basado en tirosina
MHC-1	Complejo mayor de histocompatibilidad 1
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NK	Asesinas naturales
nm	Nanómetro
NSCLC	Carcinoma pulmonar de células no pequeñas
PAHs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD-1	Receptor de muerte programada 1

PD-L1	Ligando del receptor de muerte programada 1
PD-L2	Ligando del receptor de muerte programada 2
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
pRb	Proteína retinoblastoma
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RPMI	Roswell Park Memorial Institute médium
RT	Retrotranscripción
SCLC	Carcinoma pulmonar de células pequeñas
siRNA	Pequeño ácido ribonucleico de interferencia
STAT-6	Transductor de señal y activador de la transcripción 6
TCR	Receptor de la célula T
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
Th	Linfocitos T cooperadoras
TILs	Linfocitos infiltrantes del tumor
TIM	Motivo inhibidor basado en tirosina
TNF-α	Factor de necrosis tumoral - α
VEGF	Factor de crecimiento endotelial

1. RESUMEN

Las moléculas PD-L1 y PD-L2 distribuyen señales inhibitorias que regulan el balance entre la activación de células T, tolerancia inmunológica e inmunopatologías. La expresión de la proteína PD-L1 y PD-L2 ha sido reportado en varios tipos de cáncer incluyendo pulmón, páncreas, ovario, hígado, riñón. Además, se ha reportado la expresión del ARNm de PD-L1 y PD-L2 en diferentes tipos de cáncer incluyendo el cáncer de mama, pulmón, esófago, glioma y páncreas. Por lo tanto, la expresión PD-L1 y PD-L2 en las células cancerosas ha sido demostrado como uno de los principales mecanismos que les permite evadir la respuesta inmune antitumoral.

La progresión del tumor también se ha asociado con la hipoxia tumoral, y ha sido vinculada con la generación de células con gran variación genética así como adquisición de fenotipos malignos. Sin embargo, pocos estudios han examinado la contribución de la hipoxia en la evasión a la respuesta inmune y como las moléculas PD-L1 y PD-L2 participan a esa respuesta. Por lo tanto, se analizaron los niveles de expresión relativa de los transcritos de PD-L1 y PD-L2 en las líneas celulares de cáncer de pulmón y fibroblastos MRC-5 como control de células no transformadas en condiciones de normoxia e hipoxia mediante RT-PCR en tiempo real. Los resultados mostraron que la hipoxia modificó ligeramente la expresión del transcrito PD-L1 en las líneas celulares y los fibroblastos, mientras que en la línea celular A-549 se incrementó considerablemente la expresión de ambos transcritos. Se encontró que las líneas celulares y los fibroblastos expresan constitutivamente los transcritos PD-L1 y PD-L2 en condiciones de normoxia y por tal motivo las células tumorales no presentan un cambio biológico importante en los niveles de los transcritos de PD-L1 y PD-L2 en condiciones de hipoxia.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades que resulta de diferentes factores externos e internos, que alteran las propiedades funcionales y fisiológicas de las células, originando una acumulación de células clonales patológicas derivadas de una célula ancestral en común. El cáncer se caracteriza por un trastorno en la proliferación en las células somáticas causada por la progresiva acumulación de mutaciones aleatorias, con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos (Hill., 2013).

Por lo tanto, el cáncer presenta mutaciones somáticas y cambios epigenéticos en genes concretos que regulan el crecimiento y el desarrollo normal de las células como son: protooncogenes, genes supresores de tumor y genes reparadores de DNA (Visvader., 2011). Estas mutaciones no solamente son requeridas para la iniciación del cáncer, sino también para el mantenimiento de la enfermedad (Vicente-Dueñas et al., 2013).

La acumulación de varias alteraciones conduce a la proliferación de las células cancerosas de manera incontrolable, anormalidades morfológicas generando la formación de un tumor clínicamente detectable. Los tumores malignos presentan un crecimiento rápido, invaden los tejidos circundantes y colonizan distintos órganos (metástasis). En contraste, el tumor con un crecimiento lento, no invasivo y morfológicamente parecido a su precursor se le denomina como tumor benigno (Talmadge and Fidler, 2010).

2.2 Hallmarks del cáncer

Las células cancerosas presentan capacidades funcionales que le permiten sobrevivir, proliferar y diseminarse, como son: 1) Señalización sostenida de la proliferación, 2) Evasión a las señales supresoras de crecimiento, 3) Resistencia a la muerte celular, 4) Invasión al tejido y metástasis, 5) Inmortalidad replicativa, 6)

Inducción de la angiogénesis, 7) Reprogramación metabólica, 8) Evasión a la respuesta inmune (Hanahan and Weinberg, 2011).

Señalización sostenida de la proliferación: Las células normales necesitan de estímulos mitogénicos para pasar de un estado quiescente a un estado de proliferación activado a través de una producción y liberación controlada de señales promotoras de crecimiento. Estos factores de crecimiento se unen a sus receptores transmembranales que instruyen la inhibición, entrada y progresión del crecimiento celular y división, asegurando la homeostasis del número de células, la función y mantenimiento de la fisiología del tejido. Las células cancerosas adquieren la capacidad de mantener la señalización proliferativa de diferentes formas: pueden producir sus propios ligandos de factor de crecimiento, resultando en una estimulación proliferativa autocrina. Alternativamente las células cancerosas pueden mandar señales para estimular a las células normales para que produzcan factores de crecimiento para las células tumorales (Hanahan and Weinberg, 2011).

Evasión a supresores de crecimiento: En las células normales, las señales anti-proliferativas operan para promocionar la entrada ya sea en estado G0 o en un estado post-mitótico, por lo que está asociado con los mecanismos que controlan el ciclo celular tales como los genes supresores de tumor. Las células tumorales tienen la capacidad de eludir estos programas que regulan negativamente la proliferación celular. Muchas de estas señales son canalizadas a través de las proteínas Rb y P53, que operan como control central dentro del circuito de regulación celular; Ambas moléculas rigen la proliferación celular o alternativamente activan la senescencia y el programa de apoptosis. La inhibición en la expresión de Rb, permite la proliferación celular e insensibilidad a señales proliferativas (Hanahan and Weinberg, 2011)

Resistencia a la muerte celular: El programa de muerte celular funciona como una barrera natural contra el desarrollo del cáncer, iniciando mecanismos como son: la apoptosis, necrosis y autofagia, que depende de la capacidad de hacer frente a las

condiciones en que son expuestas como: respuesta al daño en el DNA, exposición a enfermedades o agentes nocivos que estresen a la célula (Fulda et al., 2010).

Las células tumorales han desarrollado una variedad de estrategias para limitar o evitar la muerte celular como la apoptosis, bloqueando las vías de la muerte celular, mediante la pérdida o la función defectuosa de moléculas proapoptóticas; Por ejemplo la eliminación del gen TP53 resulta en la inactivación funcional de la proteína p53, componente clave del sensor de daño en el DNA el cual induce la apoptosis. Además la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-xL se incrementa. Estas alteraciones crean un ambiente permisivo para la inestabilidad genética, resultando en la acumulación de mutaciones en el genoma, lo que conduce a la iniciación y progresión del tumor (Fulda et al., 2010; Hanahan and Weinberg, 2011).

Inmortalidad Replicativa: Las células normales tienen la capacidad de pasar a través de solo un número limitado de crecimiento celular y ciclos de división sucesivas. Los telómeros juegan un papel importante, ya que protegen el extremo de los cromosomas y están involucrados en la capacidad de proliferación ilimitada (Hanahan and Weinberg, 2011).

El extremo final de los cromosomas, los telómeros, están compuestos por repeticiones no codificantes de un hexonucleótido cuya función principal es la estabilidad estructural de los cromosomas. Durante cada división celular el DNA telomérico se acorta, llegando a longitudes críticamente cortas siendo incapaces de apoyar la formación estable de los complejos de proteína (telosoma), en este punto las células detiene su crecimiento y entra a un estado de senescencia replicativa (Medina-Villaseñor and Martínez-Macías, 2009).

La adquisición de un potencial replicativo ilimitado de las células tumorales se le ha atribuido a su capacidad para mantener el DNA telomérico, mediante la expresión de la enzima telomerasa, que evita la erosión del DNA telomérico, esto conduce a que no se lleve a cabo la senescencia y la apoptosis (Hanahan and Weinberg, 2011).

Inducción de la angiogénesis: Las células tumorales al igual que las células normales, requieren sustento en forma de nutrientes y oxígeno, así como la

capacidad de eliminar los desechos metabólicos, esta capacidad es mediada por la formación de vasos sanguíneos (angiogénesis). Durante la progresión del tumor el switch angiogénico está casi siempre activado o permanece encendido, pasando de una vasculatura quiescente normal a la formación continua de nuevos vasos sanguíneos que ayuda a mantener el tumor. El switch angiogénico es regulado por moléculas activadoras (pro-angiogénicas), como es el caso del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), así como moléculas inhibitoras (anti-angiogénicas) como TSP-1, que contrarresta el estímulo pro-angiogénico. También se ha avisto que algunos oncogenes pueden sobre inducir la sobreexpresión de factores angiogénicos (Hanahan and Weinberg, 2011; Nishida et al., 2006).

Invasión del tejido y metástasis: La evolución de la metástasis es una de las transiciones más importantes en la progresión neoplásica, proceso durante el cual las células malignas se extienden desde el tumor primario a órganos contiguos (Medina-Villaseñor and Martinez-Macías, 2009). Este proceso involucra una serie de pasos secuenciales e interrelacionados (cascada de la invasión de metástasis), donde se incluyen: Invasión del tejido local, intravasación por la células cancerosas en los vasos sanguíneos y linfáticos, transporte a través del sistema circulatorio, seguido por el escape de las células cancerosas desde el lumen de dichos vasos en la parénquima de los tejidos distantes (extravasación), formación de pequeños nódulos de células cancerosas (micrometastasis) y colonización donde se da el crecimiento de las lesiones micrometastásicas en tumores macroscópicos (Hanahan and Weinberg, 2011).

Desregulación metabólica: La proliferación descontrolada de las células cancerosas que representa la esencia de la enfermedad neoplásica, involucra, además de la desregulación en el control de la proliferación celular, un ajuste del metabolismo con el fin de impulsar el crecimiento y la división celular (Hanahan and Weinberg, 2011). Por lo que las células cancerosas pueden reprogramar su metabolismo de la glucosa y así su producción de energía, favoreciendo su metabolismo

energético hacia la glicólisis, donde esta vía es favorecida sobre la fosforilación oxidativa mitocondrial incluso en presencia de oxígeno (efecto Warburg). De este modo el efecto Warburg permite el desvío de los metabolitos claves en las principales rutas biosintéticas celulares para la síntesis de aminoácidos, ácidos nucleicos, maximizando así la biosíntesis de macromoléculas y organelos para la formación de nuevas células cancerosas (Hanahan and Weinberg, 2011; Justus et al., 2015).

Evasión de la respuesta inmune: El sistema inmune juega un papel importante en restringir o erradicar la formación de neoplasias incipientes, tumores en estadios tardíos y micrometástasis.

Las células tumorales son capaces de limitar la magnitud de la muerte inmunológica, de este modo evaden la erradicación. El deterioro de la respuesta inmune puede inducir como consecuencia el crecimiento del tumor, previniendo una supresión antitumoral efectiva. Las células tumorales pueden producir factores inmunosupresores tales como IL-10, TGF- β , que suprimen la respuesta inmune contra el cáncer. Se ha demostrado que deficiencias en el desarrollo o función de linfocitos TCD8+, células T cooperadoras Th1 o natural killer (NK), incrementan la incidencia de los tumores. (Hanahan and Weinberg, 2011).

2.3 CÁNCER DE PULMONAR

El cáncer pulmonar se desarrolla a través de un proceso de múltiples etapas que implica una serie de alteraciones patológicas progresivas (preneoplásicas o lesiones precursoras) en las células del epitelio respiratorio, dirigido por daños genéticos y epigenéticos que alteran a los genes involucrados en los procesos fisiológicos de las células y teniendo como resultado la formación del cáncer (Cooper et al., 2013).

2.3.1 Clasificación del cáncer de pulmón

De acuerdo a sus características clínicas e histológicas, el cáncer pulmonar es clasificado en dos principales tipos: carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC por sus siglas en inglés), que representan el 80-85% de los casos y el carcinoma pulmonar de células pequeñas (SCLC por sus siglas en inglés) representando del 15-20% (Larsen and Minna, 2011).

El **carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC)** se clasifican en tres tipos histológicos.

Adenocarcinoma: Es un tumor epitelial maligno con formación glandular que normalmente crece en la periferia. Es el tipo más común de cáncer pulmonar, especialmente en mujeres y no fumadores con una prevalencia del 40% (Fraig., 2013).

Carcinoma de células escamosas (epidermoide): El segundo caso de células de carcinoma más común en el pulmón con una prevalencia del 20%, donde el 90% de los casos ocurre en fumadores (Fraig., 2013).

Carcinoma de células grandes: Es un carcinoma indiferenciado con una prevalencia del 3-10% del carcinoma pulmonar de células no pequeñas. Los cánceres de células grandes carecen de la diferenciación celular y características estructurales, suelen presentarse en cualquier parte del pulmón, principalmente en la periferia y tiende a crecer y a propagarse rápidamente compartiendo características patológicas con otros cánceres de pulmón (Fraig., 2013).

Carcinoma pulmonar de células pequeñas (SCLC): Generalmente tiene un tiempo de duplicación más rápida con una alta fracción de crecimiento y un desarrollo temprano de metástasis. Es el tipo de cáncer pulmonar más agresivo. Este tipo de cáncer por lo general es causado por el tabaquismo, suele surgir en localizaciones peribronquiales y se filtra en la submucosa bronquial (Kalemkerian et al., 2013).

2.3.2 Estadística del cáncer de pulmón

El cáncer pulmonar permanece como el cáncer más común en el mundo. En el 2012 se estimó 1.8 millones de casos ocurridos que representa el 13% de los diagnósticos de cáncer en total, siendo la principal causa de cáncer en hombres en países menos desarrollados y la segunda en países desarrollados y la tercer causa de cáncer en mujeres en países en vías de desarrollo (Torre et al., 2012). El cáncer pulmonar es la principal causa de muerte en hombres, con una mayor tasa de mortalidad en los países menos desarrollados, y la segunda causa de muerte en mujeres, con una mayor tasa de mortalidad en los países menos desarrollados (Torre et al., 2012; Ferlay et al., 2015).

Aproximadamente el 85% de los cánceres de pulmón son causados por la exposición al tabaquismo, debido a que contiene muchos carcinógenos potenciales, incluyendo hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), aminas aromáticas, N-nitrosaminas y otros compuestos orgánicos e inorgánicos, tales como el benceno, arsénico y cromo. Aunque el tabaco es el principal factor de riesgo para la mayoría de los cánceres de pulmón, existen otros factores que también pueden desempeñar un factor de riesgo para desarrollar cáncer pulmonar como son: asbestos, inhalación de gases radioactivos, incluyendo la exposición a gas radón (Jadus et al., 2012).

2.4 RESPUESTA INMUNOLÓGICA CONTRA EL CÁNCER

2.4.1 Generalidades

El sistema inmunológico innato y el sistema inmunológico adaptativo actúan en conjunto para proteger al hospedero, detectando y eliminando patógenos que puedan dañar al organismo, diferenciando los antígenos propios de los no propios, así como en la erradicación de la formación y progresión de neoplasias, tumores en estadios tardíos y micrometástasis (Raval et al., 2014).

Las células tumorales expresan antígenos que pueden ser reconocidos por el sistema inmune, estos antígenos son el resultado de la acumulación de alteraciones

genéticas, la pérdida de los procesos normales de regulación celular y proteínas mutadas de oncogenes (Inman et al., 2014).

Las primeras células transformadas son detectadas por las células NK a través de su encuentro con sus ligandos específicos expresados en las células tumorales, esto conduce a la destrucción de algunas células transformadas y a la captación y procesamiento de sus fragmentos por macrófagos y células dendríticas (DCs) activando a los linfocitos T. La activación y diferenciación de los linfocitos T a células efectoras que infiltran a los tumores causan la regresión tumoral (Finn., 2012).

2.4.2 Teoría de la Inmunoedición del cáncer

La teoría de inmunovigilancia originalmente propuesta por Burnet y Thomas en 1957, menciona que el sistema inmune es responsable de reconocer y eliminar la gran mayoría de células cancerosas incipientes, tumores nacientes y que la frecuencia de malignidad sería mayor si la inmunidad no estuviera presente (Mittal et al., 2014; Bhatia and Kumar, 2015). Esta teoría fue muy alentadora, pero los resultados no fueron los esperados, ya que se evidenció que en ratones atímicos la exposición a carcinógeno dio crecimiento a tumores con frecuencia similar que en ratones normales. Sin embargo se desconocía que estos ratones no padecen una inmunodeficiencia completa (Schreiber et al., 2011). Estudios llevados a cabo en modelos de ratones inmunodeficientes con defectos moleculares como RAG2^{-/-} y STAT1^{-/-}, revelaron un desarrollo más frecuente de tumores. Esto dio como resultado a proponer que el sistema inmune no solo protege al huésped contra el desarrollo de tumores sino también, la selección de tumores de menor inmunogenicidad, a la capacidad de promover el crecimiento del tumor. Lo anterior se conoce como la teoría de la inmunoedición del cáncer (Dunn et al., 2004).

La inmunoedición es un proceso dinámico, donde establece que los tumores son esculpidos por el sistema inmune, resultando en el crecimiento selectivo de variantes que están mejor equipados para luchar contra el sistema inmune (ver Figura 1). Este proceso transcurre en tres fases conocidas como:

Eliminación: En esta fase las células transformadas son reconocidas y eliminadas por el sistema inmune innato y adaptativo (Dunn et al., 2004).

Equilibrio: Las células tumorales pueden resistir la presión ejercida por el sistema inmune, este proceso conduce a la selección inmune de células tumorales con inmunogenicidad reducida, emergiendo variantes resistentes al ataque inmunológico (Kim et al., 2007).

Escape: Debido al aumento de la inestabilidad genómica en esta fase, las células cancerosas adquieren diversas características, generando variantes tumorales insensibles a los mecanismos efectores del sistema inmune (Bhatia and Kumar, 2015).

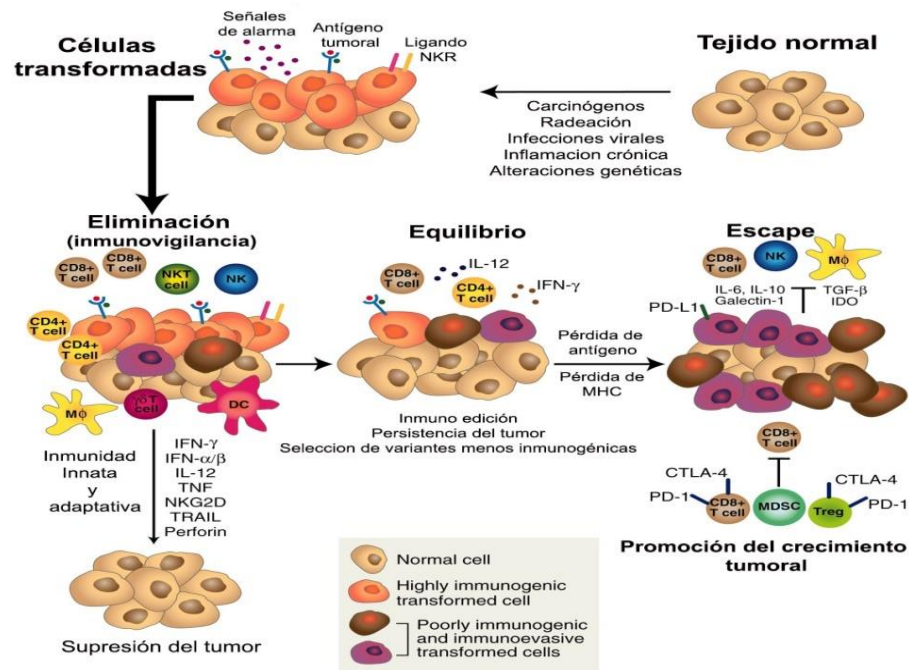


Figura 1. Proceso de la inmunomodulación del cáncer que consiste de tres fases: eliminación, equilibrio y escape. Imagen modificada de (Schreiber et al., 2011).

2.4.3 Mecanismos de evasión de las células tumorales

Los tumores utilizan diversos mecanismos moleculares para escapar del sistema inmune. Estos mecanismos incluyen: **a)** Alteración de la expresión de la molécula clase I del MHC o la pérdida de la expresión de antígenos tumorales. **b)** Producción de citocinas inmunosupresoras (TGF- β , IL-10,) **c)** Inducción de anergia o delección clonal. **d)** Aumento de linfocitos T reguladores. **e)** Aumento de la resistencia a la muerte celular programada mediante la alteración de las vías de muerte celular. **f)** Expresión de los “*checkpoints* moleculares de co-inhibición” receptor de muerte programada 1 (PD-1), ligando del receptor de muerte programada 1 (PD-L1), ligando del receptor de muerte programada 2 (PD-L2), CTLA-4 en las células tumorales. (Mittal et al., 2014; Bhatia and Kumar, 2014).

2.4.4 Checkpoints inmunológicos

Los *checkpoints* inmunológicos juegan un papel importante en la regulación de la respuesta de las células T a las infecciones crónicas y antígenos tumorales así como en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica y la tolerancia, mediante la prevención de la sobreactivación del sistema inmune del huésped (Nirschl and Drake, 2013).

La respuesta de las células T se logra en gran medida durante la activación, donde dos señales son requeridas:

Primero: El receptor de la célula T (TCR) deben interactuar específicamente al péptido presentado por el complejo principal de histocompatibilidad (MHCs) en células presentadoras de antígenos (APCs), pero esto no es suficiente para iniciar una respuesta inmune eficiente (Adachi and Tamada, 2015).

Segundo: Para una activación completa, las células T requieren de señales adicionales mediante la unión de las moléculas co-estimuladoras y co-inhibidoras presentes en las APC y las células T, pertenecientes a la familia B7 que actúan en conjunto con las señales de los receptores de antígeno. Lo que conduce a una productiva activación celular, producción de factores de crecimiento, expansión

celular, supervivencia y la función efectora. Entre las moléculas co-estimuladoras que modulan las funciones en las células T se encuentran: CD28 con sus ligandos CD80, CD86 expresados en APCs (Driessens et al., 2009; Leung and Suh, 2014).

En contraste, las moléculas co-inhibidoras atenúan las señales del receptor de antígeno, resultando en una disminución de la activación celular, inhibición en la producción de factores de crecimiento, inhibición de la progresión del ciclo celular y en algunos casos, aumento de la muerte celular. Entre las señales co-inhibidoras se encuentra la interacción del Antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4) expresado en el linfocito T con sus ligandos CD80, CD86 y la interacción del receptor de muerte programada PD1 expresado en la superficie de la célula T con sus ligandos PD-L1 y PD-L2. (Driessens et al., 2009; Leung and Suh, 2014; Adachi and Tamada, 2015) (Ver Figura 2).

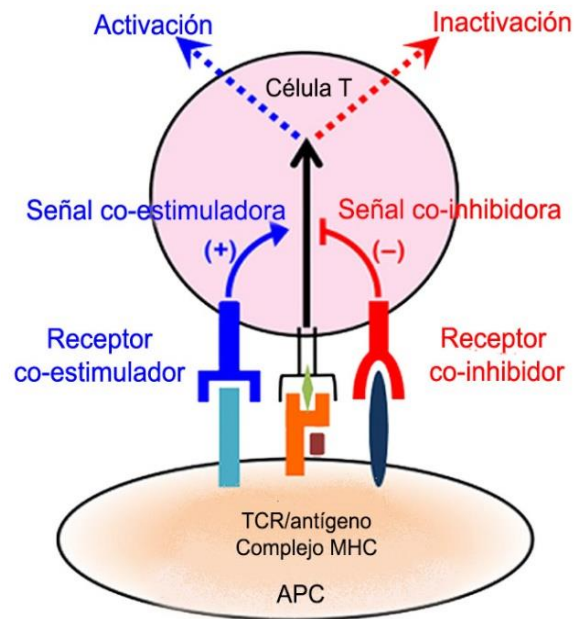


Figura 2. Regulación de la respuesta de la célula T por las señales co-estimuladoras y co-inhibidoras. La primera señal es traducida a través del receptor de la célula T (TCR) dentro de la célula mientras el receptor de co-estimulador entrega la segunda señal. Imagen modificada de (Adachi et al., 2015).

Sin embargo, las células tumorales pueden desregular la expresión de los *checkpoints* inmunológicos como un importante mecanismo de resistencia inmune, se ha visto que los receptores y los ligandos de co-inhibición que regulan la función efectora de la célula T en tejidos son comúnmente expresado en las células tumorales o en células no transformadas en el microambiente tumoral, generando una condición inmunosupresora, mediante la expresión de los ligandos PD-L1 y PD-L2 (Pardoll., 2012).

3. ANTECEDENTES

3.1 Generalidades de PD-1 (CD279)

PD-1 es un receptor transmembranal tipo I que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig), posee un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático que contiene dos motivos de señalización basados en tirosina: el motivo inhibitorio del inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM) y un motivo de cambio del inmunoreceptor basado en tirosina (ITSM) esencial en la inhibición de señalización del TCR (Riella et al., 2012; jin et al., 2011). Esta señal inhibitoria es transmitida tras la estimulación del antígeno y la unión de PD-1 a sus ligandos, resultando en la fosforilación de los residuos de tirosina en el ITSM, lo que conduce al reclutamiento de SHP-2, que desfosforila e inactiva moléculas efectoras que participan en la señalización río abajo del TCR (Okazaki and Honjo, 2007; Riella et al., 2012).

PD-1 es expresado en timocitos CD4⁻ CD8⁻ doble negativo en el timo y en células T periféricas CD4⁺ y CD8⁺ activadas, células B, monocitos, células NK y células dendríticas (Chen et al., 2012; Okazaki and Honjo, 2007). Se ha visto que IL-2, IL-7, IL-15 e IL-21 pueden inducir la expresión de PD-1 (Kinter et al., 2008).

Diversos estudios han demostrado que la molécula PD-1 está involucrada en la regulación de la tolerancia periférica, ya que estudios realizados en ratones PD-1^{-/-} desarrollaron autoinmunidad específica llegando a padecer artritis, lupus, diabetes, hidronefrosis y cardiopatías (Okazaki and Honjo, 2007). Los ligandos para el receptor PD-1 son: PD-L1 (B7-H1; CD274) y PD-L2 (B7-DC; CD273) que presentan diferentes patrones de expresión (Okazaki and Honjo, 2007).

3.2 Expresión de PD-L1

PD-L1 también conocido como B7-H1 (CD274), es una proteína transmembranal tipo 1, miembro de la familia B7 (Shi et al., 2013).

En humanos, el ARNm de PD-L1 está presente en órganos no hematopoyéticos tales como: el corazón, musculo esquelético, riñón, bazo, placenta, hígado, timo y

ganglios linfáticos. En ratones, el ARNm de PD-L1 se expresa en corazón, riñón, pulmones, hígado y placenta, (Liang et al., 2003; Ritprajack and Asuma, 2015; Martin-Orozco and Dong, 2007; Latchman et al., 2001). Sin embargo, su abundante distribución no se correlaciona con la expresión de la proteína. De hecho, la expresión de la proteína no es detectable en muchos tejidos normales lo que indica que la expresión de la proteína es controlada por mecanismos post-transcripcionales (Chen., 2004).

La expresión de la proteína PD-L1 se ha identificado en ratones mediante el análisis por inmunohistoquímica de tejido de corazón, páncreas, intestino delgado y placenta, (Liang et al., 2003). PD-L1 se expresa a nivel de proteína en casi todos los tipos de células hematopoyéticas en diferentes niveles y es constitutivamente expresado a nivel de ARNm en células T, células B, macrófagos y células dendríticas (DCs)a (Keir et al., 2008; Shi et al., 2013).

Se ha visto que la expresión de PD-L1 puede ser sobre expresada por la exposición a interferón tipo I y II, IL-12 y en menor medida por TNF- α en células T, células B, células endoteliales y células epiteliales (Ohaegbulam et al., 2015).

3.3 Expresión de PD-L2

PD-L2 fue descubierto como el segundo ligando para PD-1. Al igual que PD-L1 es una proteína transmembranal tipo 1, miembro de la familia B7. La expresión de PD-L2 en comparación con PD-L1 es baja, pero la afinidad a PD-1 es tres veces mayor que PD-L1 (Rozali et al., 2012).

Se pensaba inicialmente que la expresión de PD-L2 estaba restringida a células presentadoras de antígeno tales como macrófagos y DCs. Sin embargo, se ha mostrado que la expresión de PD-L2 puede ser inducida en una amplia variedad de células inmunes como en las células T activadas y células no inmunes dependiendo de los estímulos microambientales (Rozali et al., 2012; Messal et al., 2011).

La expresión del ARNm de PD-L2 se ha encontrado en corazón, placenta, pulmón hígado, páncreas, bazo, timo, ganglios linfáticos y músculo (Martin-Orozco and Dong, 2007; Latchman et al., 2001). Por otro lado, la proteína de PD-L2 se ha detectado en una amplia variedad de tejidos humanos como el endotelio cardiaco, endotelio placentario,

mastocitos derivados de la medula ósea, células del endotelio vascular y en células T así como en macrófagos y DCs (Liang et al., 2003; Riella et al., 2012).

Se ha demostrado que PD-L2 puede ser inducida en macrófagos y DCs por IL-4, IFN- γ y (GM-CSF) (Okazaki and Honjo, 2007). Además, citocinas como IL-2, IL-7, IL-15 e IL-21, aumentan la expresión de PD-L2 en estas células (Rozali et al., 2012).

3.4 Función Inmunológica de PD-L1

La expresión de PD-L1 en células no hematopoyéticas media la tolerancia de los tejidos, también se ha visto que limita el daño tisular mediado por el sistema inmune (SI) mediante el control de las funciones de las células efectoras autorreactivas (Keir et al., 2007).

La interacción de PD-L1 con su receptor PD-1 dirige una señal inhibitoria, reduciendo la producción de citocinas, la actividad citolítica y la proliferación de las células T (Chen et al., 2012).

También se ha observado que PD-L1 puede mediar una función inmunosupresora mediante la interacción con la proteína CD80, disminuyendo la proliferación y la producción de citocinas de las células T (Chen et al., 2012; Keir et al., 2008).

Además se ha demostrado que PD-L1 induce anergia, apoptosis y agotamiento de los linfocitos T después de la unión a su receptor PD-1 (Ghebeh et al., 2006).

Se ha demostrado que PD-L1 tiene un papel clave en promover el desarrollo y la función de las células T reguladoras, ya que éstas son mediadores clave de la tolerancia periférica que suprime activamente las células T efectoras e inhibe el daño tisular mediado por el sistema inmune (Francisco et al., 2009).

3.5 Expresión de PD-L1 en células tumorales

La expresión del ARNm de PD-L1 ha sido asociada con una baja supervivencia en una gran variedad de cánceres. Diferentes metodologías han sido empleadas para la identificación y la medición del transcrito de PD-L1 (ver Tabla 1).

Tabla 1. Expresión del ARNm de PD-L1 en tumores humanos y función clínico patológica.

Tipo de cáncer.	Casos de ARNm PD-L1+/ Total de casos.	Estudio	Referencias
Osteosarcoma	32/38 (84.2%)	No se encontró ninguna correlación en la expresión del ARNm de PD-L1 con las características clínico patológicas como la edad, género, porcentaje de necrosis y estado de metástasis en las muestras de pacientes con osteosarcoma. También se observó que el 24% de los pacientes expresaron niveles altos del transcrito de PD-L1, con un pobre pronóstico de sobrevida.	(Shen et al., 2014)
Cáncer de Mama	60%	La expresión de ARNm de PD-L1 se asocia con una elevada presencia de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) y con una larga sobrevida.	(Shalper et al., 2014)
Cáncer de pulmón	11/11	La expresión de ARNm de PD-L1 se observó en las líneas celulares: 1.3.11, 1.3.15, SKLU-1, 3A5A, OSJV-1, 3B1A, Calu-1, A-427, SKMES-1, AJG-1 y A-549. A su vez se observó que la expresión de ARNm de PD-L1 se incrementó tras la estimulación con IFN- γ en las líneas celulares A-549, A-427, SKMES-1, SKLU-1, y OSVJ-1. Las líneas A-549, A-427, SKMES-1, SKLU-1, 1.3.11, Calu-1 y OSVJ-1, expresaron la proteína y se observó que en presencia de IFN- γ incrementó la expresión de PD-L1.	(Pérez-Hernández., 2010)
Cáncer de esófago	18/41 (43.9%)	La expresión del ARNm de PD-L1 en tumores esofágicos de humano se relacionó con un pobre pronóstico de supervivencia. En este mismo estudio se evaluaron 31 tumores de pacientes con cáncer esofágico, donde 13 de los 31 casos dieron positivos para la expresión de la proteína PD-L1 con un pobre pronóstico de supervivencia.	(Ohigashi et al., 2005)
Melanoma Uveal	9/10	La expresión del ARNm se midió en líneas celulares de melanoma uveal humano donde presentaron diferentes niveles en su expresión. Se observó que tras la estimulación con IFN- γ el transcrito de PD-L1 se vio aumentado. Por otro lado, la expresión de la proteína no se encontró en algunas líneas celulares que expresaron el ARNm.	(Yang et al., 2008)
Glioma	12/12	La expresión del ARNm se midió en líneas celulares de glioma de humano en presencia y ausencia de IFN- γ . Se observó que la expresión del ARNm de PD-L1 en ausencia del IFN- γ fue baja en todas las líneas, mientras que en presencia de IFN- γ el transcrito de PD-L1 aumentó considerablemente.	(Winterle et al., 2003)
Cáncer pancreático	40/40 (100%)	La expresión de ARNm de PD-L1 fue mayor en células tumorales pancreáticas que en los tejidos normales donde 19 muestras de tejido normal solo el 89.5% expresó el transcrito. Por otro lado, la expresión del ARNm se asoció con un pobre pronóstico de supervivencia.	(Loos et al., 2008)

3.6 Regulación de la expresión de PD-L1 en tumores

En estudios realizados en tejidos tumorales de humanos y líneas tumorales humanas se observó que la exposición a IFN- γ incrementa en la expresión de PD-L1 en la superficie de la membrana celular de las líneas tumorales (Dong et al., 2002). Asimismo, estudios realizados en líneas celulares de cáncer pulmonar, se observó que IFN- γ incrementó la expresión del ARNm de PD-L1 (Pérez-Hernández., 2010).

Se ha observado que la pérdida de EGFR y PTEN que es una mutación común en los tumores y que conduce a la sobre activación de PI3K/Akt, puede conducir a la sobreexpresión de PD-L1 en glioblastoma (Akabay et al., 2013). Por otro lado, en un estudio realizado en 7 líneas celulares de melanoma, la inhibición de la vía MAPK disminuyó la expresión de PD-L1 en 3 líneas celulares, mientras que la inhibición de PI3K redujo la expresión de PD-L1 en algunas líneas celulares (Atefi et al., 2014). Adicionalmente se avisto que la vía de señalización PTEN está vinculada con la regulación post-transcripcional de PD-L1 (Parssa et al., 2007).

3.7 Funcionalidad de PD-L1 en células tumorales

Varios mecanismos son identificados y caracterizados que pueden ser responsables de la disfunción de las células T después de la unión de PD-L1 en la células tumorales con PD-1 expresado en las células T (Sanmamed and Chen, 2014).

Estudios han demostrado la expresión de PD-L1 como uno de los principales mecanismos por el cual las células cancerosas se protegen de la función efectora de la célula T CD8⁺, promoviendo la muerte de estas células por apoptosis (Dong et al., 2002). Estos resultados se confirmaron mediante un estudio en ratones Knockout para PD-L1, donde la supresión o la muerte apoptótica de los linfocitos T fue disminuida, conduciendo a la acumulación de las células T efectoras (Chen., 2004).

Por otro lado, en una línea de melanoma humana PD-L1^{-/-} se le transfectó PD-L1, lo que condujo a la muerte por apoptosis de las células T y el bloqueo de PD-L1 mediante el anticuerpo anti-PD-L1 inhibió la apoptosis de dichas células T (Dong et al., 2002).

Se ha visto que las células tumorales y células presentadoras de antígeno asociadas a tumor (APCs) expresan altos niveles de PD-L1 y que a su vez no expresan o tienen una baja expresión de CD80 y CD86, moléculas co-estimuladoras que proporcionen una segunda señal para una completa activación de la célula T; lo anterior genera un estado de anergia en los linfocitos T (Prado-Garcia et al., 2015; Crespo et al., 2013).

Otros estudios determinaron que la vía PD-L1/PD-1 está implicada en un estado disfuncional de la célula T, conocido como agotamiento de la célula T. Este fenómeno fue descrito durante un proceso de infección crónica viral en ratones y posteriormente en humanos, donde las células T presentaron funciones efectoras disminuídas (Prado-Garcia et al., 2015).

Se han identificado varios factores que contribuyen al agotamiento del linfocito T, entre los que se encuentran la persistencia del antígeno expuesto, aumento de la expresión de receptores inhibidores en el linfocito como (PD-1) y la duración de la infección (Jiang et al., 2015).

En diferentes tipos de cáncer el agotamiento de las células T se ha observado en linfocitos T CD8+ tumor específicos y debido a su interacción con PD-L1, la expresión de PD-1 sobre los linfocitos T CD8+ puede ser sostenida, inhibiendo la activación de las células T efectoras permitiendo la progresión del tumor (Jiang et al., 2015; Prado-Garcia et al., 2015). Estas señales inhibitorias transmitidas por la interacción de estas moléculas dieron como resultado linfocitos T CD8+ con pérdida en sus funciones tales como producción de citocinas (IL-2, TNF- α , IFN- γ) y disminución de la proliferación (Jiang et al., 2015).

Se ha reportado que la interacción de PD-1 con su ligando PD-L1 expresado en tumores estimula la producción de IL-10 en las células T de sangre periférica de humanos (Dong et al., 2002).

Estudios realizados en diferentes tipos de cáncer han confirmado la función de PD-L1 en mediar la respuesta inmune contra el cáncer (ver Tabla 2).

Tabla 2. Función de la expresión de PD-L1 en diferentes células tumorales.

Tipo de cáncer	Estudio	Referencia
Glioblastoma	Se observó que el bloqueo de PD-L1 revierte la inhibición de la proliferación de las células T, así como una disminución de células T apoptóticas.	(Wei et al., 2010)
Cáncer pancreático	Se observó que el bloqueo de PD-L1 inhibe el crecimiento del tumor en un modelo murino y a su vez hubo un incremento significativo de infiltración de células CD4+ y CD8+. Por otro lado, el bloqueo de PD-L1 con un anticuerpo neutralizante incrementó la producción de IFN- γ .	(Okudaira et al., 2009)
Cáncer de ovario	En un modelo murino inoculado con una línea celular tumoral de ovario, el bloqueo de PD-L1 mediante anticuerpos resultó en el rechazo del tumor. También se correlacionó con incremento en el número de células T CD8+.	(Duraishwamy et al., 2013)
Cáncer de hígado	El bloqueo de la vía PD-L1/PD-1 mejoró en gran medida la capacidad proliferativa de las células T CD8. También se observó que el bloqueo de PD-L1 inhibió la apoptosis y necrosis de las células T CD8+.	(Shi et al., 2011)
Cáncer de riñón	La proliferación de las células T CD8 se incrementó al igual que la disminución de la muerte de dichas células mediante el bloqueo de PD-L1 en humanos.	(Quandt et al., 2014)

3.8 Función inmunológica de PD-L2

En un estudio realizado en linfocitos T CD4+ y CD8+ purificados provenientes de sangre periférica de humanos, se estimularon utilizando perlas de activación (perlas de látex con anticuerpo anti-CD3, anti-CD28 y anti-PD-L2 adheridos). Tras dos días de activación, mediante la prueba de Elisa se midió la producción de citocinas para IL-2, IFN- γ e IL10, donde se observó que mediante la estimulación con anti-PD-L2 hubo una disminución en la producción de tales citocinas (Messal et al., 2011).

Por otro lado células T CD4+ aisladas de ratón BALB/c y previamente activadas, fueron reestimuladas con células de ovario de hámster (CHO) transfectadas con I-A^d (MHCII de ratón) y PD-L2, se demostró que la interacción de PD-L2/PD-1 redujo la producción de citocinas como IL-4, IFN- γ e IL-10 al igual que su proliferación (Latchman et al., 2001).

En otro estudio se investigó el rol de la vía PD-L2/PD-1 en la activación de la célula T. Este estudio se llevó a cabo con linfocitos T purificados de ganglios linfáticos

provenientes de ratón, los cuales fueron estimulados utilizando perlas de activación con anti-CD3 + control Ig y mPD-L2-Ig. Las células T activadas con anti-CD3 + mPD-L2-Ig, mostraron una disminución en su proliferación (Latchman et al., 2001).

Estudios realizados con células presentadoras de antígeno PD-L2^{-/-} de ratones mostraron un incremento en la activación de las células T, al igual que en la producción de citocinas como IL-4, IL-2 e IFN- γ . (Zhang et al., 2006).

3.9 Regulación de la expresión de PD-L2

Se han reportado dos principales vías que regulan de la expresión de PD-L2, los cuales son las vías NF- κ B y STAT-6, ya que estudios realizados en macrófagos de ratones STAT6^{-/-} fueron incapaces de expresar PD-L2 (Huber et al., 2010). Estos resultados fueron confirmados mediante la inhibición farmacológica de STAT-6 en células dendríticas (DCs) derivadas de médula ósea de ratones (BALB/c), donde se observó una disminución en la expresión de PD-L2 en comparación con DCs STAT-6^{-/-} (Lesterhuis et al., 2011).

En un estudio realizado en DCs de ratón con deficiencia en NF- κ B p50^{-/-} P65^{+/-}, se observó que una disminución drástica en la expresión de PD-L2 en comparación con las DCs de ratones silvestres (Liang et al., 2003).

3.10 Expresión y función Inmunológica de PD-L2 en células tumorales

La expresión de PD-L2 por diferentes tipos de tumores es mucho menos frecuente que PD-L1 (Chen et al., 2012). Se ha reportado que las células tumorales utilizan PD-L2 para evadir la inmunidad antitumoral, ya que se ha observado una supervivencia baja en pacientes que expresan PD-L2 (Rozali et al., 2012). Sin embargo, los estudios respecto de cómo PD-L2 ejerce esa función es menos conocida y estudiada que la de PD-L1 (ver Tabla 3).

Tabla 3. Expresión de PD-L2 en diferentes células tumorales y su función inmunológica clínica y patológica.

Tipo de cáncer	Casos PD-L2+/ Total de casos.	Expresión y función Inmunológica	Referencias
Cáncer cervical	34/115	La expresión de la proteína de PD-L2 se asoció con etapas más avanzadas del cáncer y se observó que no hubo una asociación entre las células tumorales que expresan PD-L2 y linfocitos infiltrantes de tumor (TIL).	(Karim et al., 2009)
Cáncer de pulmón	9/11	La expresión de ARNm de PD-L2 se observó en las líneas celulares: 1.3.11, 1.3.15, SKLU-1, 3A5A, OSJV-1, 3B1A, CALU-1, SKMES-1 y AJG-1, mientras que A-549 y A-427 no expresaron el ARNm de PD-L2. A su vez se observó que la expresión de ARNm de PD-L2 se incrementó tras la estimulación con IFN- γ , en 1.3.11, OSJV-1, SKMES-1 y SKLU-1. La expresión de la proteína se midió en las líneas celulares A-549, A-427, SKMES-1, SKLU-1, 1.3.11, Calu-1 y OSVJ-1 estimuladas con o sin IFN- γ . Se observó que sin la estimulación con IFN- γ las líneas SKLU-1, Calu-1 y OSVJ-1 expresaron la proteína de PD-L2 y al ser tratadas con IFN- γ la expresión de PD-L2 se incrementó. Además esta citocina indujo la expresión de PD-L2 en la línea celular SKMES-1. Por otro lado, las líneas celulares A-549, A-427 y 1.3.11 no expresaron PD-L2	(Pérez-Hernández., 2010)
Cáncer de esófago	18/41 (43.9%)	La expresión del ARNm de PD-L2 en tumores esofágicos de humano se relacionó con un pobre pronóstico de supervivencia. En este mismo estudio se evaluaron 31 tumores de pacientes con cáncer esofágico, donde 15 de los 31 casos dieron positivos para la expresión de la proteína PD-L2 con un pobre pronóstico de sobrevida.	(Ohigashi et al., 2005)
Cáncer pancreático		Se observó que el bloqueo de PD-L2 inhibe el crecimiento del tumor en un modelo murino y a su vez hubo un incremento significativo de infiltración de células CD4+ y CD8+. Por otro lado la expresión de IL-10 y FoxP3 disminuyó mediante el bloqueo de PD-L2.	(Okudaira et al., 2009)

3.11 Hipoxia en células tumorales y su función inmunológica

Se le ha denominado hipoxia a la disminución anormal en los niveles de oxígeno en tejidos. Una característica común de la mayoría de los tumores es la existencia de zonas con presiones parciales de oxígeno muy bajas, exhibiendo áreas hipóxicas

en el tumor (Höckel and Vaupel, 2001). Esta condición es debido a un desequilibrio en el suministro de oxígeno y nutrientes a través de la circulación de la sangre y el consumo por las células tumorales. En tumores sólidos, la incidencia de hipoxia es alta y se le ha correlacionado con fenotipos tumorales agresivos y metastásicos. En las últimas décadas, se ha reportado una gran variedad de cánceres con regiones hipóxicas como carcinoma endometrial, ovario, melanoma, linfoma, cáncer de mama, cerebro, colon, cáncer gástrico y cáncer pulmonar (Yotnda et al., 2010).

La hipoxia puede surgir en las masas tumorales por el resultado de una pobre distribución vascular, densidad vascular baja, perfusión de la sangre y una alta proliferación de las células cancerosas que supera la neo-vascularización (Yotnda et al., 2010). También se ha demostrado que la hipoxia ejerce una fuerte presión de selección, generando células con gran variación genética mediante inestabilidades genómicas (Höckel and Vaupel 2001).

Se ha observado que las células cancerosas han desarrollado diversos mecanismos por los cuales pueden sobrevivir a periodos de baja disponibilidad de oxígeno, donde HIF-1 α es un factor principal en la adaptación celular a condiciones de hipoxia y que es un importante activador de genes y media la expresión de diversas proteínas (Yotnda et al., 2010). Por otro lado, se ha demostrado que las células tumorales pueden aumentar la resistencia a la lisis mediada por los linfocitos T citotóxicos (CTL) bajo condiciones de hipoxia así como la inducción a la apoptosis en las células T, esto debido a que hipoxia aumenta la expresión de PD-L1 (Barsoum et al., 2013).

3.12 Regulación de la expresión de PD-L1 y PD-L2 en las células tumorales sometidas a hipoxia

En células de cáncer de próstata y cáncer de mama sometidas a hipoxia (0.5% O₂) por 24h, se observó un aumento en los niveles de la proteína PD-L1 cuando fueron comparados bajo una condición control (25% O₂). Por otro lado se observó que HIF-1 α es requerida para la expresión de PD-L1 inducida por hipoxia, esto se realizó mediante la reducción de la expresión de HIF-1 α usando siRNA, lo cual impidió la acumulación de la proteína HIF-1 α en las células de cáncer de próstata incubadas

en condición de hipoxia por 24h. La inhibición de HIF-1 α disminuyó la expresión del ARNm y la proteína de PD-L1 (Barsoum et al., 2014)

Estudios realizados en diferentes líneas celulares tumorales de humano como MCF-7 (cáncer de mama), IGR-Heu (cáncer de pulmón), M4T (melanoma) y T1 (melanoma) expresaron PD-L1 y PD-L2, tras someter a las células en condiciones de hipoxia, se observó un incremento en la expresión de PD-L1 en las líneas celulares excepto en MCF-7, mientras que PD-L2 no mostró un incremento cuando las células fueron sometidas a esta condición (Noman et al., 2014). También se observó que la línea celular tumoral de ratón (MSC-1) sometida a hipoxia incrementó la expresión del ARNm y la proteína de PD-L1, mientras que PD-L2 no mostró incremento en su expresión.

Además se demostró que la transfección de siRNA dirigida a HIF-1 α en la línea celular MSC-1 sometida a hipoxia, dio como resultado la disminución de la expresión del ARNm y la proteína de PD-L1, mientras que PD-L2 no mostró cambios en el transcrito ni en la proteína. (Noman et al., 2014).

4. JUSTIFICACIÓN

El cáncer pulmonar presenta la mayor tasa de mortalidad e incidencia a nivel mundial y ésta ha ido aumentando año tras año. Las células tumorales presentan ciertas características como la proliferación descontrolada, que es indicio de que ha evadido a la respuesta inmune. La respuesta inmune mediada por los linfocitos T está encargada de eliminar a las células tumorales. Además, se ha descrito que la expresión de las moléculas PD-L1 y PD-L2 en diferentes tipos de cáncer son responsables de generar una disfunción de las células T, protegiéndose de su función citolítica evitando así la respuesta inmune antitumoral. La expresión de la proteína de PD-L1 y PD-L2 se ha determinado en distintos tipos de cáncer, relacionándose con una pobre supervivencia. Por otro lado, pocos son los estudios que han reportado que la hipoxia tiene un efecto sobre la expresión de estas moléculas y que están relacionadas con un incremento en la resistencia a la respuesta inmune antitumoral en diversos tipos de cáncer.

En el cáncer pulmonar se desconoce si la expresión de los transcritos PD-L1 y PD-L2 es regulada por la hipoxia. Por lo que en este estudio se determinará si esta condición modifica los niveles de expresión de los transcritos PD-L1 y PD-L2. Este estudio permitirá fundamentar nuevas estrategias terapéuticas en la prevención de esta enfermedad. También el presente trabajo permitirá fundamentar nuevos conceptos que puedan servir a futuras investigaciones en cómo la hipoxia contribuye a la evasión a la respuesta inmune.

5. HIPÓTESIS

Las líneas celulares de cáncer pulmonar modificarán la expresión de los transcritos PD-L1 y PD-L2 si son sometidas a tensiones bajas de oxígeno.

6. OBJETIVOS

Objetivo General

Realizar la cuantificación relativa de los ARNm para PD-L1 y PD-L2 en las líneas celulares tumorales y fibroblastos en condiciones de normoxia e hipoxia.

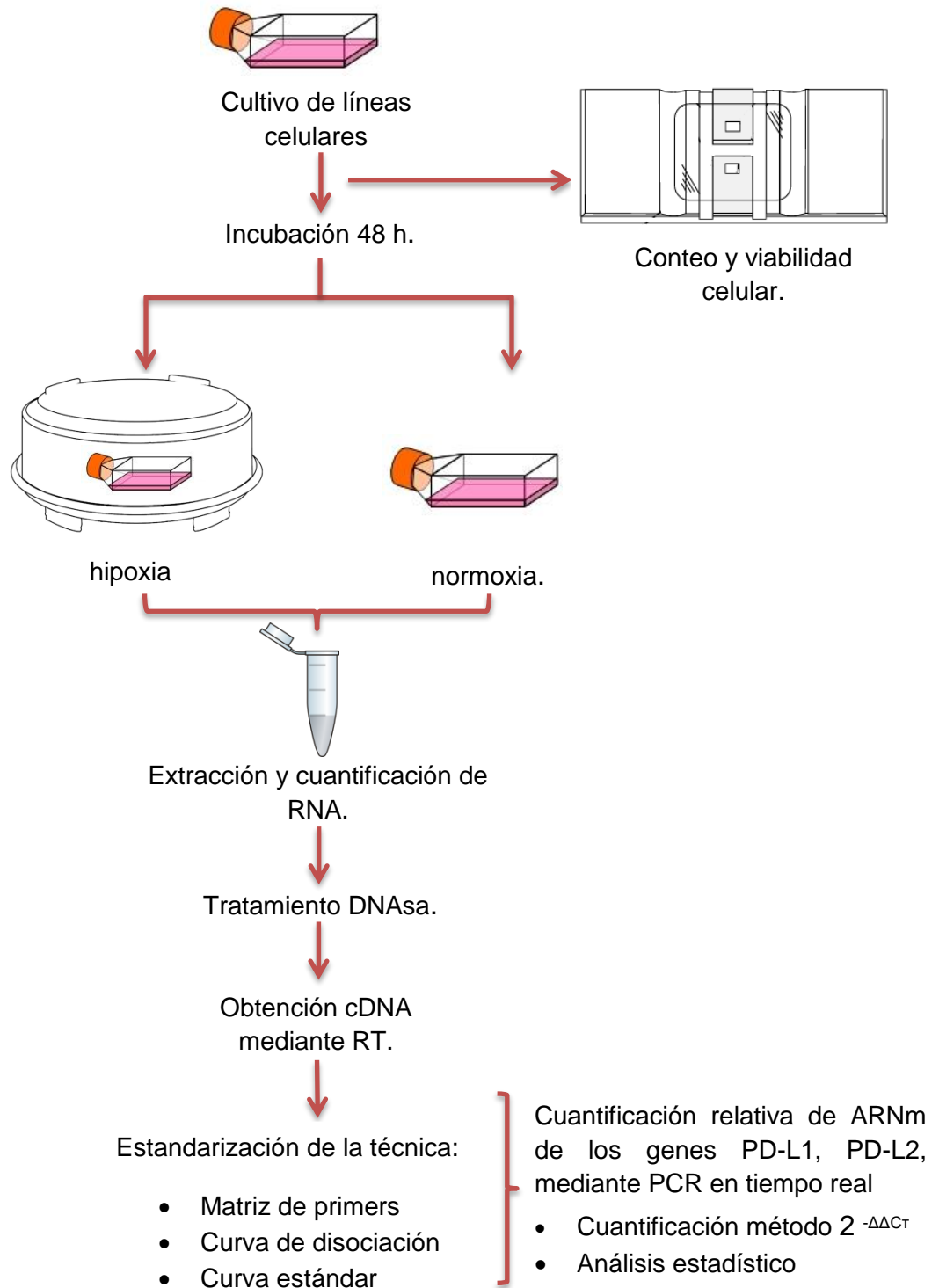
Objetivos particulares

Estandarizar las técnicas de qPCR para la cuantificación relativa de los transcritos PD-L1 y PD-L2 mediante el método $\Delta\Delta CT$.

Analizar la expresión del ARNm de PD-L1 y PD-L2 en las líneas celulares tumorales y fibroblastos de pulmón en condiciones de normoxia e hipoxia.

Analizar la expresión de PD-L1 y PD-L2 en las líneas celulares tumorales y en condiciones de normoxia e hipoxia respecto a los fibroblastos de pulmón MRC-5.

7. Esquema general de trabajo



8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Líneas celulares

Las líneas celulares incluidas en este estudio fueron de carcinoma pulmonar: cuatro líneas de adenocarcinomas A-549, A-427, SKLU-1 obtenidas de la ATCC, Rockaville, MD y 1.3.11 obtenida en el Laboratorio de Cáncer Pulmonar del INER, la línea de carcinoma epidermoide Calu-1 obtenidas de la ATCC, una línea celular de cáncer de mama MCF-7 y los fibroblastos de pulmón MRC-5 obtenidos de la ATCC. Las células se mantuvieron en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) suplementado con Suero Fetal Bovino al 10% (Thermo Scientific, Logan, Utah, USA) y una mezcla de antibióticos compuesto por 10 mg/mL estreptomicina y 10000 U/mL de penicilina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Se incubaron en una atmosfera húmeda con 21% de O₂ y 5% de CO₂ a una temperatura de 37°C. Por sus características de adherencia, las células se separaron de la caja de cultivo celular mediante agitación mecánica al llegar a un estado de confluencia, empleando una solución de tripsina (0,05%), verseno al (0,05%) libre de calcio y magnesio (In vitro, D.F., México).

8.2 Conteo y viabilidad celular

Las células de las diferentes líneas de estudio se contaron utilizando una cámara de Neubauer, se distinguieron las células vivas de las muertas empleando un colorante vital azul tripano, (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). La viabilidad celular fue siempre >90%.

8.3 Incubación Normoxia e Hipoxia

En cajas T25 se sembraron las líneas celulares de carcinoma pulmonar siendo las concentraciones celulares iniciales las siguientes: 7.5×10^5 células/mL para A549, SKLU-1 y CALU-1, 1.5×10^6 células/mL para 1.3.11y MRC-5, 9.7×10^5 células/mL para A 427, 1.2×10^6 células/mL para MCF-7. De esta forma se sembraron dos cajas para cada línea celular, una para normoxia y otra para hipoxia. La incubación en normoxia consistió en una atmosfera húmeda con 21% de O₂ y 5% de CO₂ en una incubadora (Sanyo Electric Co., Ltd). Mientras que para hipoxia, las células se incubaron en una cámara de incubación modular (Billups-Rothenberg, Inc), en la que se mantuvo a una mezcla de gases con las siguientes concentraciones: 2% de O₂ 93% N₂ y 5% de CO₂. Ambas cajas se incubaron a 37°C durante 48h. Todos los cultivos se realizaron por duplicado.

8.4 Extracción de RNA

Después de las 48h de incubación, se retiró el sobrenadante de las cajas. Posteriormente se realizó la obtención del RNA total mediante el método fenol-cloroformo, agregando 1ml del reactivo Trizol (Invitrogen, CA, USA) y se homogenizó hasta que las células se lisaron. Las muestras se trasvasaron a tubos eppendorf, se les adicionó 200 µl de cloroformo, se agitaron suavemente y se centrifugaron a 4°C y 12000 rpm durante 15 min para la separación de las muestras en 3 fases: la fase orgánica, la interfase y la fase acuosa. La fase acuosa se recuperó cuidadosamente en otro tubo eppendorf y se le adicionó 500 µl de isopropanol, con la finalidad de precipitar el RNA. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 10 o 15 min. Posteriormente se centrifugaron a 4°C y 12000 rpm durante 10 min. Mediante este proceso se obtuvo un pellet, al cual se le retiró el sobrenadante y se lavó con 1 ml de etanol al 80% (v/v), se centrifugó a

7500 rpm durante 5 min a 4°C. Posteriormente, se descartó el sobrenadante dejando secar a temperatura ambiente el pellet.

El RNA obtenido se resuspendió agregando 30µl de agua tratada con dietil-pirocarbonato (H₂O/DEPC) y se incubó a 60°C durante 10 min.

El RNA extraído se cuantificó usando un NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific), por medio de la determinación de la absorbancia a las longitudes de onda 230, 260 y 280 nm obteniéndose la pureza y la concentración del RNA total obtenido.

8.5 Tratamiento del RNA con DNAsa

Para eliminar del RNA obtenido cualquier indicio de DNA genómico, se llevó a cabo un tratamiento con DNAsa siguiendo el protocolo descrito a continuación:

Para 10 µg del RNA total obtenido anteriormente, se utilizaron 2.5 µl DNase I-RNase-free (Thermo Scientific), se añadió el buffer para la DNAsa 10X +MgCl₂ (Thermo Scientific), de acuerdo al volumen final de la reacción se le añadió H₂O DEPC c.b.p., la reacción se incubó a 37°C por 30 min. Para inactivar a la DNAsa se agregaron 2.5 µl de EDTA 50 mM (Thermo Scientific) y se incubó a 65°C por 10 minutos.

8.6 Transcripción reversa

Se realizó la síntesis del DNA complementario (cDNA) mediante retrotranscripción. A los 10 µg del RNA total libre de DNA se les adicionó 2 µl de oligo Random 25 mM (Thermo Scientific) y se incubó a 70°C por 10 min. Posteriormente, se agregaron 9.67 µl de la siguiente mezcla de reacción: 5.4 µl 5x First Strand Buffer (Invitrogen), 2 µl DTT 0.1 mM (Invitrogen), 1 µl dNTPs 25 mM, 0.27 µl Inhibidor de RNAsa

(Invitrogen) y 1 μ l enzima RT (Invitrogen). El programa de termociclador para la síntesis de cDNA consistió de un ciclo de 22°C durante 10 min y la extensión a 37°C por 60 min. El cDNA obtenido fue almacenado a -20°C para su análisis.

8.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR).

El ensayo de PCR en tiempo real se llevó a cabo utilizando el termociclador ABI Prism 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en placas de 96 pozos (Applied Biosystems), se utilizó SYBR Green (SYBR® Select Master Mix Applied biosystems) y oligos específicos para el gen de interés elaborados en el Instituto de Biotecnología UNAM (ver Tabla 4), donde el volumen final para cada reacción de PCR fue de 15 μ l (ver Tabla 5). Cada reacción de PCR se realizó por triplicado, mediante el programa de reacción establecido en el termociclador (ver Tabla 6):

Tabla 4. Características fisicoquímicas de los oligonucleótidos.

Como genes endógenos: Hipoxantina guanina fosforribosil transferasa 1 (HPRT-1) y 18s RNA ribosomal (18s)

Como genes de interés: Ligando del receptor de muerte programada 1 (PD-L1) y Ligando del receptor de muerte programada 2 (PD-L2)

	HPRT-1	18S	PDL-1	PDL-2
Tm	64.88	64.88	64.88	66.45
Secuencia sentido	5' CCTGCTGGATTACATCAAAGC	5' TACCCGACGTAGGAATAATGG	5' TGGACAAGCAGTGACCATCAA	5' AAGGCCTCGTCCACATACC
Longitud	21	21	21	20
%GC	47.62	47.62	47.62	55.00
Secuencia antisentido	5' CTGCATTGTTTTGCCAGTGTC	5' CGTCTTCGAACCTCCGACTT	5' GGATGTGCCACAGGTTAGTTC	5' GCCAGAGGATAACCTGTAGC
Longitud	21	20	20	20
%GC	47.62	55.00	55.00	55.00
Tamaño del amplicon	150pb	150pb	150pb	150pb

Tabla 5. Se muestran los reactivos y las cantidades empleadas para los ensayos de cuantificación.

Reactivos	PD-L1	PD-L2	HPRT-1	18S
SYBR select Master Mix	7.5µl	7.5µl	7.5µl	7.5µl
Oligo sentido 5µM	0.52µl	0.78µl	0.78µl	0.78µl
Oligo antisentido 5µM	0.78µl	0.52µl	0.78µl	0.78µl
cDNA	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl
H ₂ O	3.7µl	3.7µl	3.44µl	3.44µl

Tabla 6. Programa establecido en el termociclador, incluye el perfil térmico y número de ciclos. La reacción de PCR consiste en llevar a cabo cambios de temperatura en tiempos específicos para lograr la amplificación del producto de interés.

Programa de Termociclador	Temperatura	Tiempo	Numero de ciclos
Activación de la enzima	50°C	2 minutos	Pasos iniciales
Pre-Desnaturalización	95°C	10 minutos	
Desnaturalización	95°C	15 segundos	40 ciclos PCR
Alineamiento	60°C	1 minuto	
Elongación			

8.8 Validación del ensayo de PCR en tiempo real

Para llevar a cabo las validaciones del ensayo, se llevó a cabo lo siguiente:

- Matriz de primers para cada par de oligos 18s RNA ribosomal (18s), Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa 1 (HPRT-1), Ligando de muerte programada 1 (PD-L1) y Ligando de muerte programada 2 (PD-L2).
- Curva de disociación para cada par de primers.
- Se llevaron a cabo curvas estándar incluyendo a dos posibles genes endógenos: 18s y HPRT-1, y los genes de interés PD-L1 y PD-L2. El gen endógeno óptimo se eligió en función de la eficiencia de las reacciones de PCR, y el rango dinámico se determinó en función de las diluciones seriales de la muestra de interés.

a) Matriz de Primers

La matriz de oligos para 18s, HPRT-1, PD-L1, PD-L2 se llevó a cabo probando diferentes concentraciones de oligo sentido y anti-sentido (ver Tabla 7), para identificar las concentraciones con las que se obtuvo la mejor eficiencia de la reacción, proporcionando una fluorescencia alta en la curva de disociación.

Tabla 7. Concentración de oligos empleada en la matriz.

		Oligo Sentido	
		Conc. por reacción	
		200nM	300nM
Oligo Antisentido	200nM	1	2
		0.52µl	0.78µl
	0.52µl	0.52µl	
	300nM	3	4
0.78µl		0.78µl	

b) Curva de Disociación

Para corroborar la especificidad de los oligonucleótidos, se incluyó una curva de disociación en el programa de PCR en tiempo real para cada par de oligos: 18s, HPRT-1, PD-L1 y PD-L2. La curva de disociación consistió en aumentar gradualmente la temperatura hasta los 95°C, con la finalidad de desnaturalizar la doble cadena de los productos obtenidos durante el PCR, posteriormente, se bajó drásticamente la temperatura hasta 60°C lo que renaturaliza las cadenas de DNA con la finalidad de ver cuántos picos de disociación hubo en esa reacción (ver Figura 3). Para un par de oligos específicos para un gen, idealmente se observó un pico de disociación, asegurando la especificidad de la reacción.

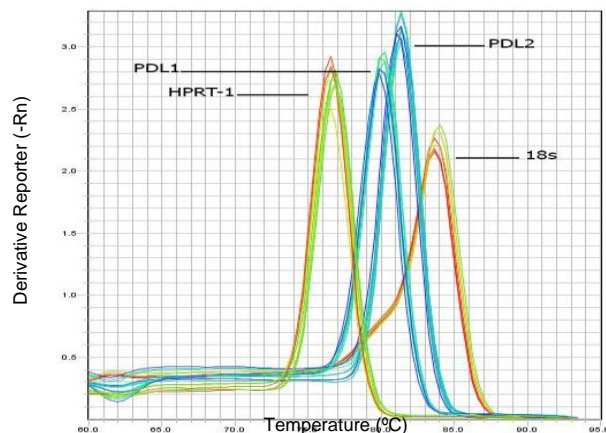


Figura 3.- Curva de disociación de los oligonucleótidos HPRT-1, 18s, PD-L1 y PD-L2.

c) Curva estándar

Mediante la elaboración de una serie de diluciones a partir de un stock de cDNA (ver Tabla 8), se realizó la curva estándar para evaluar la eficiencia de la reacción de PCR que se calcula mediante la siguiente ecuación $10^{-(1/m)-1}$.

d) Rango dinámico

Con base en esta curva de rango dinámico se determinó el gen endógeno óptimo (HPRT-1 o 18s) para los genes de interés (PD-L1 y PD-L2).

Tabla 8 Serie de diluciones estándar, para realizar curva estándar para cada gen.

Muestra estándar	Factor de dilución	Dilución
Muestra 1	1:10	6µl stock cDNA + 54µl H ₂ O
Muestra 2	1:3	20µl muestra 1 + 40µl H ₂ O
Muestra 3	1:3	20µl muestra 2 + 40µl H ₂ O
Muestra 4	1:3	20µl muestra 3 + 40µl H ₂ O
Muestra 5	1:3	20µl muestra 4 + 40µl H ₂ O

e) Cuantificación relativa

Una vez validado los ensayos de eficiencia, el rango dinámico y la elección del gen endógeno, se llevó a cabo la cuantificación relativa de PD-L1 y PD-L2 para las líneas celulares de estudio A-549, SKLU-1, Calu-1, A-427, MRC5, 1.3.11 y MCF-7. Como

se mencionó anteriormente la líneas celulares fueron sometidas a tratamientos de normoxia e hipoxia por 48 h.

El cDNA de cada línea celular fue cuantificado usando un NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). La concentración empleada para la cuantificación relativa fue de 75.5 ng/μl de cDNA.

La cuantificación se realizó por triplicado, empleando el kit SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems) y dos controles sin muestra fueron incluidos como NTC, con un volumen final para cada reacción de 15μl.

8.9 Análisis estadístico

La expresión de los genes de interés fue normalizado respecto al gen HPRT-1. La expresión relativa de los genes de interés se llevó a cabo comparando su expresión en: (1) las células en hipoxia respecto a las células en normoxia; (2) en las células tumorales respecto a su expresión en fibroblastos; además del (3) nivel de expresión de PD-L2 respecto al nivel de expresión de PD-L1 en la misma célula. Dichas comparaciones se llevaron a cabo utilizando el método $\Delta\Delta C_t$ y analizados posteriormente de acuerdo al método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$. (Romero-García et al., 2014).

$$\Delta\Delta C_t = (CT_{\text{problema}} - CT_{\text{HPRT-1}})_{\text{tratada}} - (CT_{\text{calibrador}} - CT_{\text{HPRT-1}})_{\text{control}}.$$

Los cambios en los niveles del transcrito PD-L1 y PD-L2 de normoxia e hipoxia respecto a MRC-5 fueron analizados usando el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y como prueba post hoc se utilizó la prueba de Dunnet.

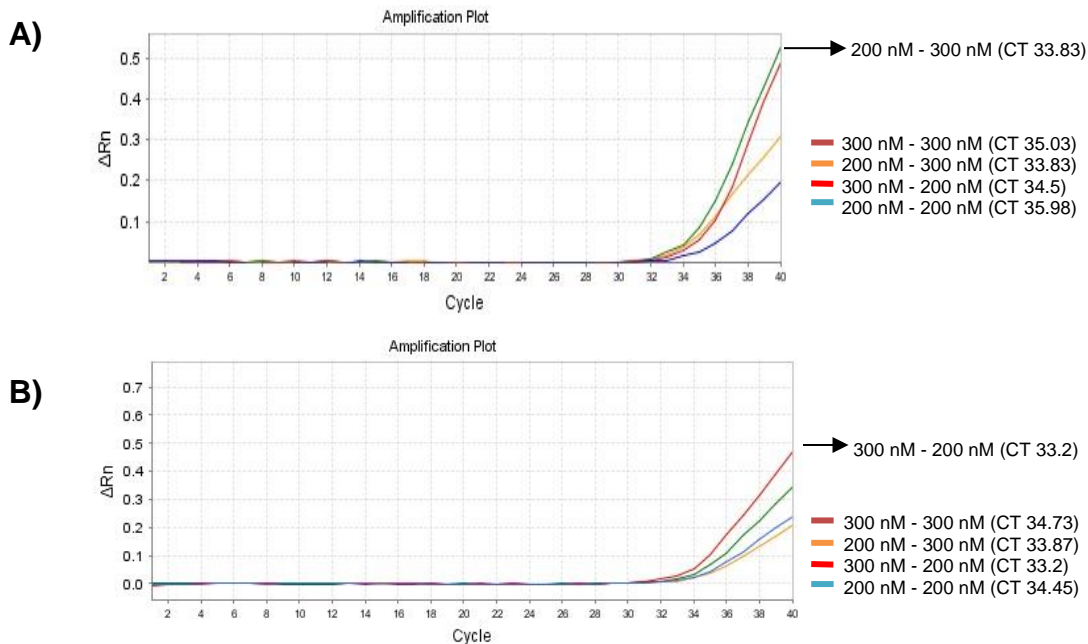
Los cambios en los niveles del transcrito PD-L1 y PD-L2 en hipoxia respecto a normoxia fueron analizados mediante la t-Student, al igual que los niveles de expresión del transcrito PD-L2 respecto a PD-L1 en condiciones de normoxia e hipoxia.

9. RESULTADOS

Se llevó a cabo la estandarización de la cuantificación relativa de los transcritos para PL-L1 y PD-L2 mediante RT-PCR en tiempo real. Se empleó el cDNA obtenido de la línea de cáncer pulmonar SKLU-1 debido a que la expresión de los transcritos PD-L1 y PD-L2 fue observada en esta línea por trabajos previos realizados en el laboratorio.

9.1 Elección de la concentración óptima de los oligonucleótidos

Se definió la concentración óptima de los oligonucleótidos para los amplicones 18s, HPRT-1 como posibles genes endógenos así como los genes de interés PD-L1 y PD-L2, donde se realizó una matriz con diferentes concentraciones para cada par de oligonucleótidos (ver Tabla 6). La concentración óptima de los oligonucleótidos se seleccionó de acuerdo a la intensidad de la fluorescencia emitida y el ciclo umbral (CT) generado, lo que nos indica un mayor número de copias de amplificado (ver Figura 4). Las concentraciones seleccionadas para cada primer fueron las siguientes: PD-L1 200 nM – 300 nM (Oligo sentido – Oligo anti sentido), PD-L2 (300 nM - 200 nM), 18s (300 nM - 300 nM), el valor de la concentración de los oligonucleótidos para HPRT-1 fueron estandarizadas anteriormente por el grupo de trabajo (300 nM – 300 nM).



C)

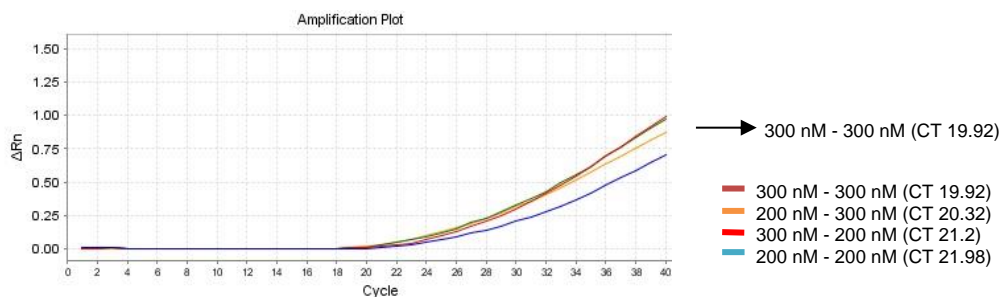


Figura 4. Curvas de amplificación de PCR en tiempo real para la determinación de la concentración óptima de los oligonucleótidos, se observan diferentes curvas de amplificación usando diferentes concentraciones de Oligos **A)** PD-L1, **B)** PD-L2 y **C)** 18s. La concentración óptima para los oligonucleótidos se seleccionó de acuerdo a una alta señal de fluorescencia emitida y el menor CT generado, indicándonos un mayor número de copias de amplificado y un rendimiento óptimo para el ensayo.

9.2 Comprobación de la especificidad de los oligonucleótidos para la reacción en PCR en tiempo real

Se corroboró que los oligonucleótidos empleados 18s, HPRT-1, PD-L1, PD-L2 fueran específicos para las reacciones de PCR, asegurando el nivel de confiabilidad en los datos de cuantificación. Para esto, se realizó una curva de disociación en la que se incrementó gradualmente la temperatura hasta los 95°C, hasta conseguir la desnaturalización de la doble cadena de los productos obtenidos durante la PCR, seguido de una disminución drástica en la temperatura hasta los 60°C para renaturalizar las cadenas de DNA. De esta manera se corroboró que en las reacciones de PCR en tiempo real no se generó ningún producto inespecífico para cada uno de los genes evaluados, donde se observó un solo pico de disociación, y se observó que los productos amplificados para las reacciones son específicas (ver Figura 5).

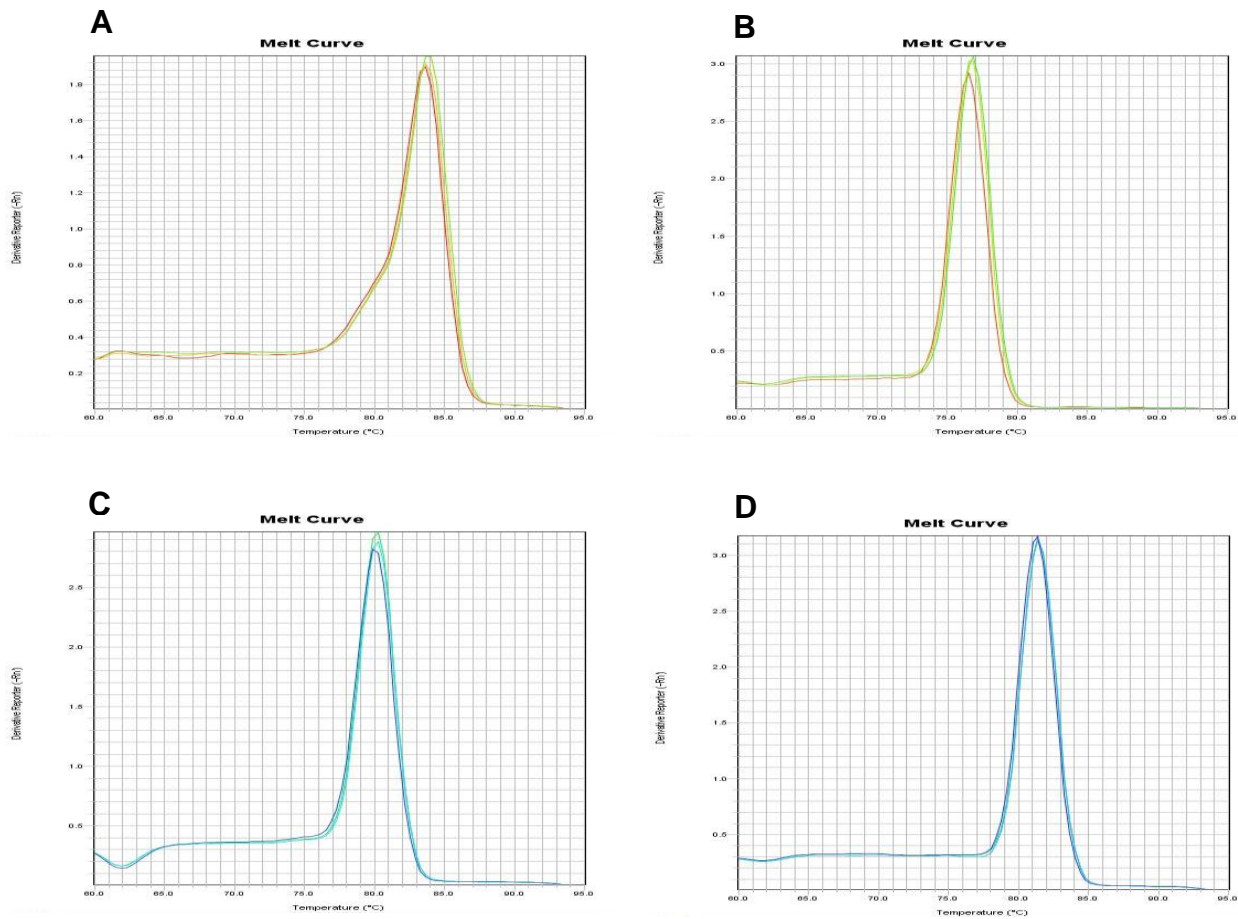


Figura 5. Curva de disociación de los oligonucleótidos **A)** 18s, **B)** HPRT-1, **C)** PD-L1, **D)** PD-L2

9.3 Curva estándar de los diferentes genes analizados

Se realizaron 5 diluciones seriadas (ver Tabla 8) del cDNA de la línea celular de cáncer pulmonar SKLU-1 para cada gene endógeno (18s y HPRT-1) así como para los genes de interés PD-L1 y PD-L2. Las diluciones se realizaron por triplicado y se evaluó la amplificación de las reacciones mediante PCR en tiempo real.

Al finalizar la reacción de PCR se obtuvieron los CT de las diluciones y se calcularon los promedios del CT de los triplicados de cada dilución. Posteriormente se realizó una curva estándar para cada uno de los genes antes mencionados, y se realizó la gráfica del logaritmo de la concentración de cDNA vs el promedio del CT. La pendiente obtenida de cada gráfica nos permitió calcular la eficiencia de la reacción

de la amplificación para cada gen, las eficiencias fueron para PD-L1: 75%, PD-L2: 75%, HPRT-1: 61% y 18s: 48% (ver Figura 6).

Para los genes de interés PD-L1, PD-L2 y el gen endógeno HPRT-1 se calculó una pendiente y eficiencia de amplificación parecida, mientras que el gen endógeno 18s la pendiente fue mayor, lo que generó una eficiencia menor.

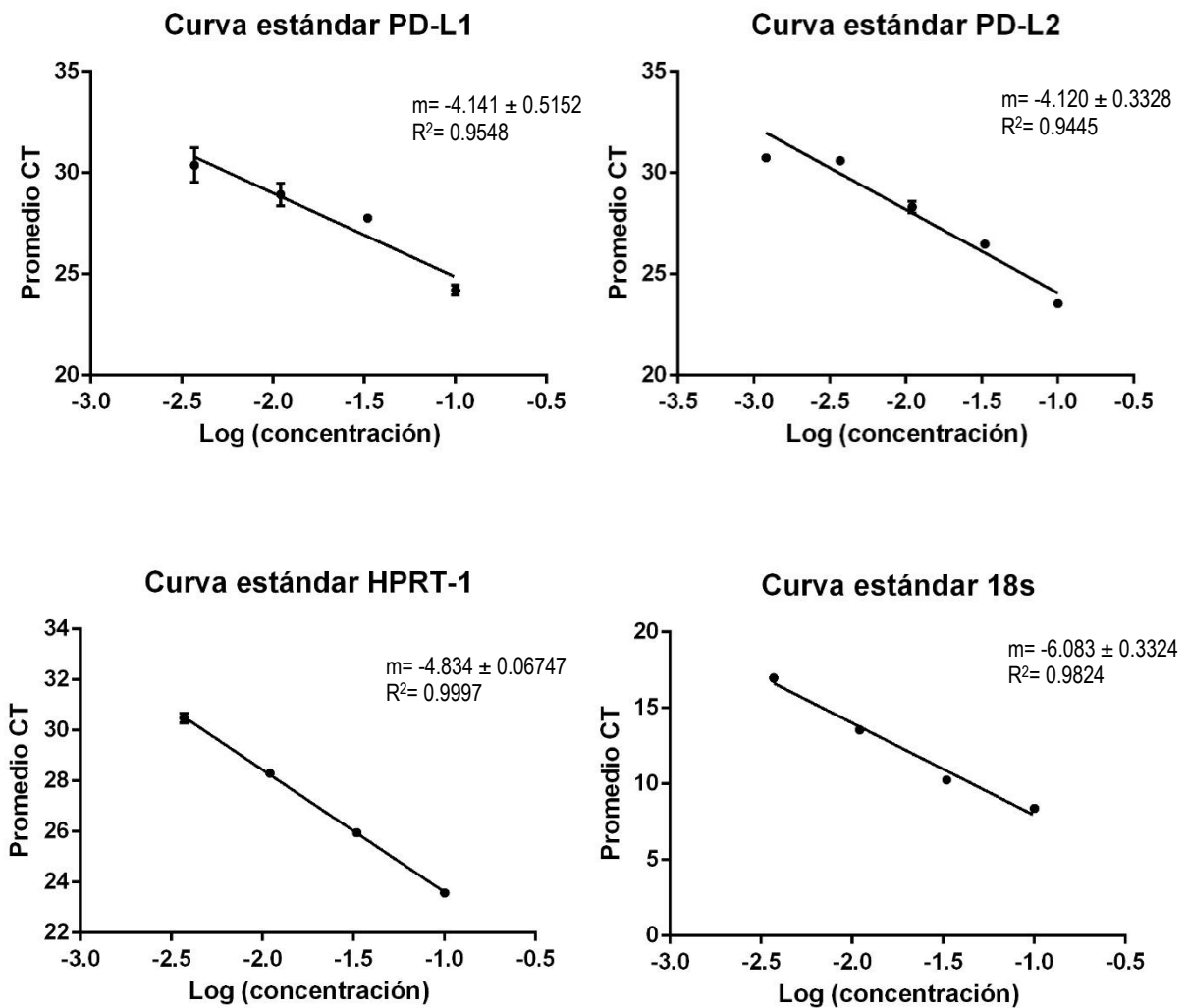


Figura 6. Curvas estándar de las diluciones seriadas, que se obtiene de graficar el logaritmo de la concentración de cDNA vs promedio del CT para cada uno de los genes analizados, donde se muestra el valor de la pendiente (m) así como su desviación estándar.

9.4 Elección del gen endógeno

Una vez obtenida la curva estándar para cada gen, se realizó la normalización de la cantidad relativa de los genes de interés respecto a los genes endógenos, donde los promedios del CT de cada dilución se utilizaron para calcular el ΔCT (Promedio del gen de interés – Promedio del gen endógeno). Posteriormente se graficaron los valores del ΔCT vs el logaritmo de la concentración donde se obtuvo una curva de rango dinámico. Esta evaluación tiene como propósito determinar la eficiencia de amplificación entre diferentes concentraciones tanto para el gen de interés como para el control endógeno. Si la eficiencia de amplificación del gen de interés y el endógeno son similares, el resultado de esta gráfica debe ser una pendiente prácticamente igual a 0 ó menor a 0.1 (ver Figura 7).

Se observó que la pendiente para la gráfica HPRT-1/PD-L1 fue 0.009 y la pendiente para HPRT-1/PD-L2 fue -0.029. Esto nos indica que la variación de los ΔCT en el rango de diluciones empleado fue mínima, en comparación con las del gen endógeno 18s y los genes de interés lo cual descarta la utilización de este gen endógeno para calcular los niveles de expresión relativa de PD-L1 y PD-L2 mediante el método de $\Delta\Delta CT$. La dilución 2 fue elegida para los cálculos de expresión relativa que corresponde a la concentración de 75.5 ng/ μ l de cDNA.

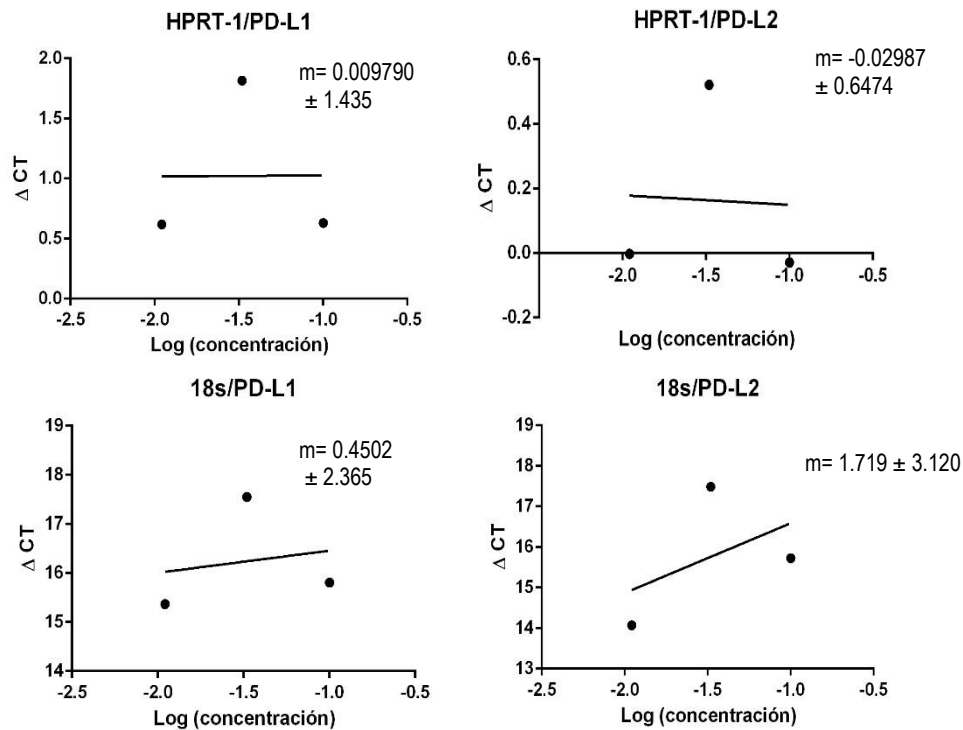


Figura 7. Rango dinámico de la amplificación de HPRT-1/PD-L1 y HPRT-1/PD-L2 así como 18s/PD-L1 y 18s/PD-L2, que se obtuvo al graficar el logaritmo de la concentración del cDNA vs el Δ CT.

9.5 En condiciones de normoxia e hipoxia, la expresión de PD-L1 y PD-L2 fue menor en las líneas tumorales respecto a MRC-5

Primero se determinó los niveles de los transcritos PD-L1 y PD-L2 se modificaban en las líneas celulares SKLU-1, Calu-1, 1.3.11, A-427, A-549 y MCF-7 en condiciones de normoxia e hipoxia usando como calibrador a los fibroblastos de pulmón MRC-5, que se ajustaron a un valor igual a 1. Todas las líneas fueron cultivadas en medio RPMI-1640 y sometidas a condiciones de normoxia e hipoxia por 48 horas.

Se observó que los niveles de expresión del ARNm de PD-L1 fueron significativamente menores en las líneas celulares SKLU-1, Calu-1, 1.3.11, A-427, A-549 y MCF-7 respecto a MRC-5 en condiciones de normoxia e hipoxia. Por otro lado, los niveles de expresión del ARNm de PD-L2 también fueron

significativamente menores en ambas condiciones en todas las líneas celulares con respecto a MRC-5 (ver Figura 8).

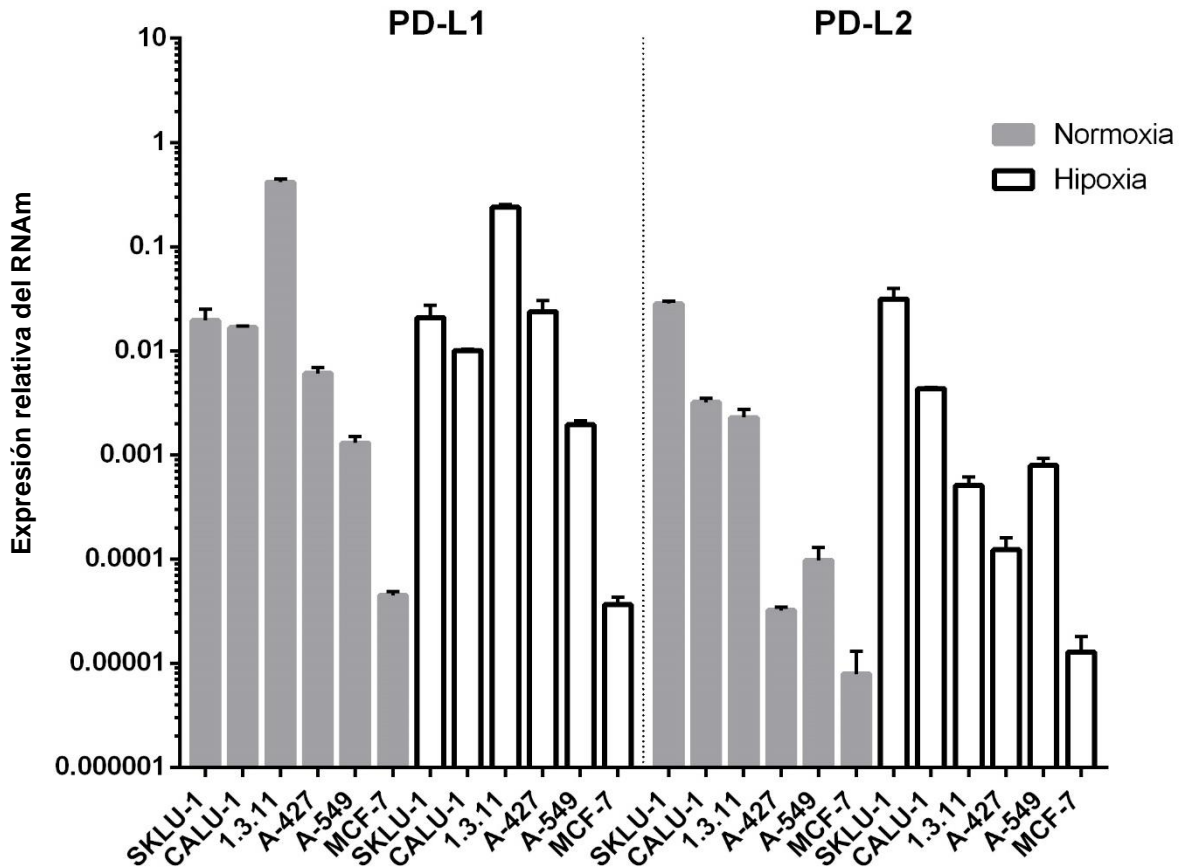


Figura 8. Expresión del ARNm de PD-L1 y PD-L2 en condiciones de normoxia e hipoxia en las líneas celulares por PCR en tiempo real. Los valores de MRC-5 fueron ajustados a 1 y utilizados como control para comparar los niveles de expresión del ARNm, los ensayos se realizaron por triplicado. En todas las líneas la diferencia significativa fue $p < 0.001$ con respecto a MRC-5.

9.6 Modificación de los niveles de expresión del ARNm de PD-L1 en las líneas celulares tumorales y los fibroblastos MRC-5 en hipoxia respecto a normoxia.

Después se determinó si los niveles de expresión del ARNm de PD-L1 en las líneas celulares y los fibroblastos se modificaban en hipoxia con respecto a normoxia.

Se encontró que la expresión del ARNm de PD-L1 en las líneas celulares SKLU-1, A-427, A-549 y en las células MRC-5 se incrementó significativamente en hipoxia, mientras que en la línea celular Calu-1 disminuyó significativamente la expresión del ARNm de PD-L1 en esta condición. Sin embargo, en las líneas celulares 1.3.11 y MCF-7 no se modificó la expresión del transcrito PD-L1 en hipoxia respecto a normoxia (ver Figura 9).

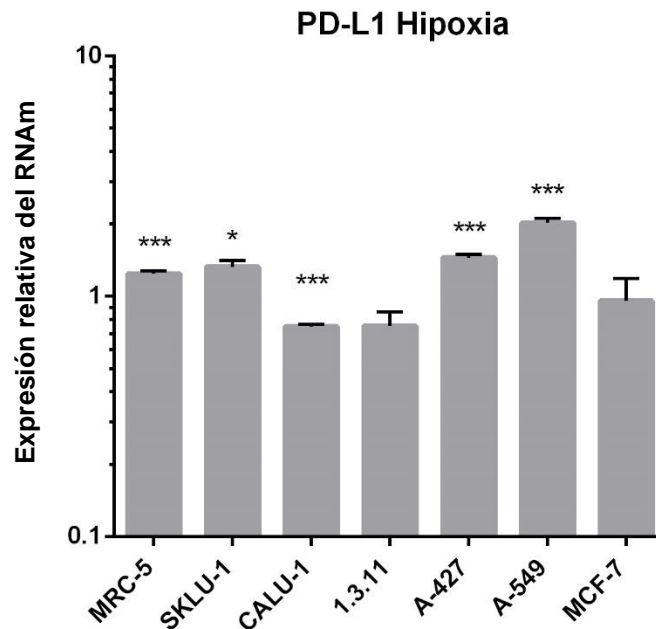


Figura 9. Análisis de la expresión del ARNm de PD-L1 en las líneas celulares de cáncer pulmonar y las células MRC-5 en condiciones de hipoxia respecto a normoxia. Los valores de expresión en normoxia fueron ajustados a 1 y utilizados como calibrador para comparar la expresión del ARNm, los ensayos se realizaron por triplicado. Diferencias significativas de * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ con respecto a normoxia.

9.7 Modificación de los niveles de expresión del ARNm de PD-L2 en las líneas celulares y los fibroblastos MRC-5 en hipoxia respecto a normoxia

Se analizaron los niveles de expresión del ARNm de PD-L2 en las líneas celulares y los fibroblastos MRC-5 sometidas a hipoxia con respecto a normoxia. Se encontró que los niveles de expresión del ARNm de PD-L2 en la línea celular A-549 se incrementó significativamente en hipoxia, mientras que en la línea celular 1.3.11 y los fibroblastos MRC-5 disminuyeron significativamente la expresión del ARNm bajo esta misma condición.

Por otro lado, las líneas celulares SKLU-1, Calu-1, A-427 y MCF-7 no tuvieron diferencias significativas en los niveles de expresión del ARNm de PD-L2 sometidas a hipoxia (ver Figura 10).

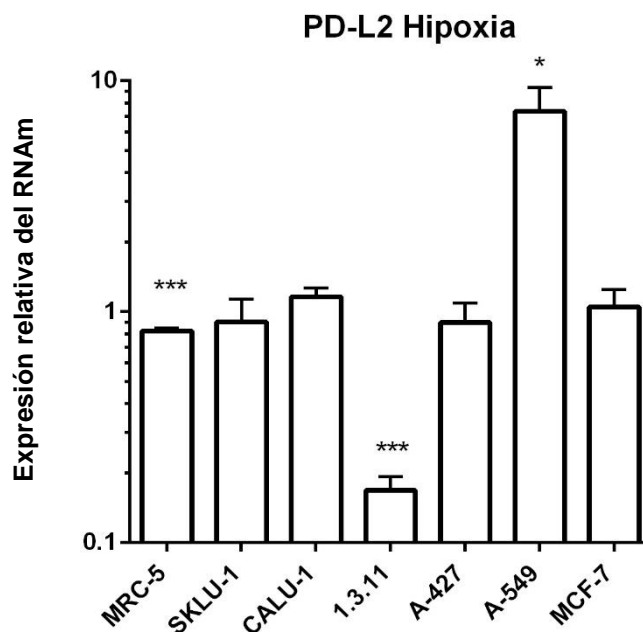


Figura 10. Análisis de la expresión del ARNm de PD-L2 en las líneas celulares SKLU-1, Calu-1, 1.3.11, A-427, A-549, MCF-7 y las células MRC-5 en condiciones de hipoxia respecto a normoxia mediante PCR en tiempo real. Los valores de expresión en normoxia fueron ajustados a 1 y utilizados como control para comparar la expresión del ARNm, los ensayos se realizaron por triplicado. Diferencias significativas de * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ con respecto a normoxia.

9.8 Modificación de los niveles de expresión del ARNm de PD-L2 en las líneas celulares respecto a PD-L1 en condiciones de normoxia e hipoxia

Se analizaron los niveles de expresión del ARNm de PD-L2 respecto a PD-L1 en las líneas celulares SKLU-1, Calu-1, 1.3.11, A-427, A-549, MCF-7 y en las células de fibroblasto MRC-5 en normoxia.

Se encontró que en condiciones de normoxia las células MRC-5 y la línea celular SKLU-1 mostraron mayores niveles de expresión del ARNm de PD-L2 respecto a PD-L1. Además, en las líneas celulares Calu-1, 1.3.11, A-427 y A-549 los niveles de expresión del ARNm de PD-L2 fueron significativamente menores con respecto a PD-L1. Por otro lado, en la línea celular MCF-7 no se observaron diferencias en los niveles del transcrito PD-L2 respecto a PD-L1 en condiciones de normoxia (ver Figura 8).

Una vez determinados los niveles de expresión de PD-L2 respecto a PD-L1 en condiciones de normoxia, se compararon los niveles de expresión de PD-L2 respecto a PD-L1 en condiciones de hipoxia.

Se encontró que en condiciones de hipoxia la línea celular SKLU-1 y las células de fibroblasto MRC-5 mostraron mayor nivel de expresión del ARNm de PD-L2 respecto a PD-L1. Además, las líneas celulares 1.3.11 y A-427 mostraron bajos niveles de expresión del transcrito PD-L2 respecto a PD-L1. Por otro lado, los niveles del transcrito de PD-L2 en las líneas celulares Calu-1, A-549 y MCF-7 fueron similares a los niveles del transcrito de PD-L1 (ver Figura 11).

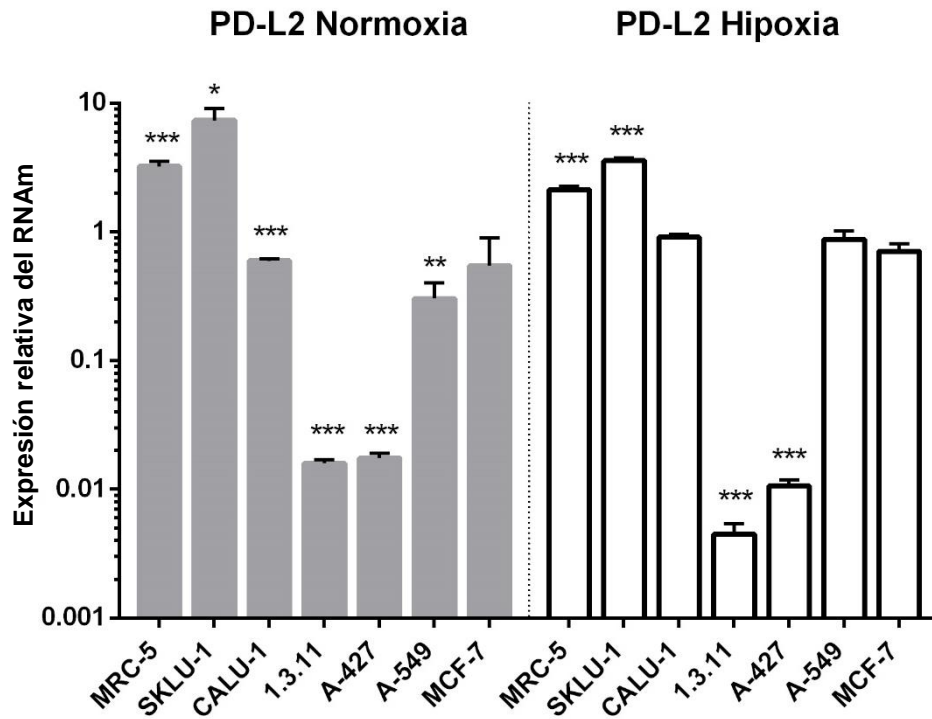


Figura 11. Expresión relativa del ARNm de PD-L2 en las líneas celulares SKLU-1, Calu-1, 1.3.11, A-427, A-549, MCF-7 y las células MRC-5 respecto a PD-L1 en condiciones de normoxia e hipoxia. Los valores de expresión de PD-L1 en normoxia e hipoxia fueron ajustados a 1 y utilizados como calibrador para comparar los niveles de expresión del ARNm de PD-L2 en ambas condiciones, los ensayos se realizaron por triplicado. Las líneas celulares mostraron diferentes niveles de expresión con diferencias significativas de * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ con respecto a PD-L1 en condiciones de normoxia e hipoxia.

10. DISCUSIÓN

Uno de los hallmarks que presentan las células tumorales, es aquella relacionada a la evasión a la respuesta inmune (Hanahan and Weinberg., 2011). Las células tumorales muestran mecanismos que les permiten evadir la respuesta inmune antitumoral, como es la expresión en membrana de las moléculas co-inhibidoras PD-L1 y PD-L2.

Varios estudios han reportado la expresión de la proteína PD-L1 y PD-L2 en diferentes tipos de cáncer de humano. Así mismo, se ha reportado la expresión del ARNm de PD-L1 y PD-L2 en diferentes tipos de cáncer. Aunque los mecanismos que regulan la expresión de los transcritos PD-L1 y PD-L2 no han sido completamente aclarados, diferentes estudios han reportado un aumento en la expresión de los transcritos mediante diferentes factores como son el IFN- γ (Pérez-Hernández., 2010), STAT-3 (Chen et al., 2015), HIF-1 α (Noma et al.,2014, Barsoum et al., 2013) para PD-L1 e IL-4 y STAT-6 para PD-L2 (Rozali et al., 2012).

En el presente estudio, se encontraron diferentes niveles de expresión de los transcritos PD-L1 y PD-L2 en todas las líneas celulares tumorales, así como en MRC-5 en condiciones de normoxia. Resultados similares obtenidos por nuestro grupo de trabajo, mediante RT PCR en punto final, demostraron que estas mismas líneas celulares de cáncer de pulmón expresaron el ARNm de PD-L1. Sin embargo, usando dicha metodología la expresión del ARNm de PD-L2 sólo se observó en las células SKLU-1, Calu-1 y 1.3.11, mientras que en las células A-549 y A-427 no se detectó el ARNm (Perez-Hernández., 2010). Probablemente las diferencias encontradas con respecto al presente trabajo se debe a los bajos niveles de expresión del ARNm de PD-L2 observados en las células A-549 y A-427 en comparación con las otras líneas celulares, y que su detección fue posible gracias a que la técnica de RT-PCR en tiempo real es altamente sensible en comparación con la de punto final.

Por otro lado, en condiciones de normoxia se observó que la expresión del transcrito de PD-L1 fue mayor que PD-L2 en las líneas celulares Calu-1, 1.3.11, A-427 y A-549, mientras que SKLU-1 y MRC-5 expresaron mayores niveles del transcrito de PD-L2 que PD-L1. Estos resultados concuerdan con lo reportado por nuestro grupo

de trabajo, donde mediante citometría de flujo se observó mayor expresión de la proteína PD-L1 en todas las líneas de cáncer pulmonar (Sandoval-Vázquez 2009). Así mismo, se observó una menor expresión de la proteína PD-L2 en las líneas celulares SKLU-1, Calu-1 y 1.3.11 mientras que en las líneas A-549 y A-427 no se expresó la proteína, lo que indica que la expresión de PD-L2 puede estar regulado por mecanismos post-transcripcionales (Chen., 2004).

Sin embargo, el incremento de la expresión del transcrito de PD-L2 respecto a PD-L1 en las células MRC-5 en condiciones de normoxia, pueda deberse a que en el pulmón se ha observado que PD-L2 inhibe procesos de inflamación de las vías aéreas, así como de hiperreactividad bronquial que pudieran generar alergias y asma (Shing et al., 2011). También, se observó que en todas las líneas celulares, el nivel de expresión relativa del ARNm de PD-L1 y PD-L2 fueron menores en ambas condiciones con respecto a MRC-5. Lo que sugiere que las células no transformadas del tejido pulmonar expresan los transcritos de PD-L1 y PD-L2 como mecanismo de tolerancia inmunológica para evitar un daño en el tejido y las células tumorales ya no sobreexpresan los transcritos como mecanismo de evasión.

Por otro lado, los tumores sólidos frecuentemente crecen en condiciones hipóxicas, donde se ha reportado que esta condición altera diferentes genes involucrados en la progresión del tumor (Höckel and Vaupel, 2001). No obstante, el efecto de la hipoxia en el escape inmune del tumor sigue siendo poco conocida, además, son pocos los estudios relacionados en cómo la hipoxia modifica los niveles de expresión de PD-L1. Además a la fecha, no hay estudios relacionados en cómo la hipoxia modifica los niveles del transcrito PD-L2 en las células tumorales. Por lo anterior se hicieron diferentes comparaciones de la expresión relativa de los transcritos PD-L1 y PD-L2 de las líneas celulares tumorales en condiciones de normoxia e hipoxia.

En cuanto a cómo la hipoxia modifica los niveles de expresión de los transcritos de PD-L1 en las células tumorales, Barsoum *et al.* (2013) reportaron que la hipoxia incrementa la expresión del transcrito PD-L1 en las células de cáncer próstata, cáncer de mama y células de cáncer de mama de ratón, y observaron que HIF-1 α

es requerido para inducir la expresión del ARNm de PD-L1. Adicionalmente, Noman *et al.* (2014), reportaron que la hipoxia incrementa la expresión del ARNm y la proteína PD-L1 en células supresoras de origen mieloide (MDSC) y la línea celular MSC-1. También se reportó que la hipoxia incrementa la expresión de la proteína PD-L1 mediada por HIF-1 α en la línea celular de cáncer de pulmón IGR-Heu, mientras que MCF-7 no mostró ningún cambio en su expresión. Nuestros resultados en cuanto a la expresión del transcrito PD-L1 en MCF-7 son similares a lo reportado, ya que no se observó ningún cambio en la expresión del ARNm de PD-L1.

En el presente trabajo, se observó que la hipoxia incrementó ligeramente los niveles del ARNm de PD-L1 en las líneas celulares SKLU-1, A-427, A-549 y las células MRC-5, mientras que en la línea celular Calu-1 el nivel del ARNm disminuyó bajo esta condición. Por otra parte, la hipoxia no modificó la expresión del transcrito PD-L2 en las células SKLU-1, Calu-1, A-427 y MCF-7, lo que nos hace pensar, que esos ligeros cambios en los niveles de expresión de los transcritos no representan un cambio biológico significativo para las células. Esto puede ser debido a que las células tumorales están bajo el efecto Warburg favoreciendo su metabolismo energético hacia la glicólisis, donde uno de los principales mecanismos reguladores de la glicólisis aeróbica es HIF-1 α (Rankin and Giaccia, 2008). De modo que estas alteraciones puedan estar presentes en las células tumorales de cáncer pulmonar favoreciendo la expresión constitutiva del transcrito PD-L1 y al ser sometidas a hipoxia éstas no presenten un cambio importante en la expresión del transcrito. Por otro lado, en la línea celular A-549 la expresión del transcrito incrementó considerablemente en condiciones de hipoxia. Estudios realizados por Phillips *et al.* (2005), reportaron que la línea A-549 no expresa a nivel intranuclear HIF-1 α en condiciones de normoxia; sin embargo, al someter a la línea celular en hipoxia la proteína se localizó en el núcleo durante las primeras horas de tratamiento. Posiblemente el aumento de la expresión de los transcritos PD-L1 y PD-L2 a las 48 h de tratamiento sea debido a que en este tiempo HIF-1 α pueda traslocarse al núcleo y de esta manera inducir la expresión de los transcritos. Se ha visto que a 48 y 72 h de hipoxia la línea A-549 expresa la proteína HIF-1 α (Liao *et al.*, 2014).

Estudios realizados por Noma *et al.* (2014), reportaron que la hipoxia no modificó la expresión del ARNm y la proteína de PD-L2 en células supresoras de origen mieloide (MDSC) y la línea celular MSC-1, mientras que en las células de cáncer de pulmón IGU-Heu y MCF-7 la proteína no se modificó respecto a normoxia. En el presente este estudio se observó que la hipoxia incremento la expresión del transcrito PD-L2 en la línea celular A-549, este incremento en la expresión de PD-L2 puede deberse a que en condiciones de hipoxia, la célula incremente la expresión del transcrito para la síntesis de la proteína ya que en condiciones de normoxia, se ha visto que las células A-549 no expresan la proteína.

Por lo tanto, se requiere estudiar la expresión de la proteína PD-L1 y PD-L2 en las células tumorales bajo estas condiciones, para asociarlos con los niveles de expresión del ARNm. De igual modo, el factor de transcripción HIF-1 α debe ser investigado debido a que este factor pudiera estar involucrado en la expresión constitutiva de los transcritos PD-L1 y PD-L2.

11. CONCLUSIÓN

En este estudio reportamos que las líneas celulares tumorales y los fibroblastos MRC-5 expresaron constitutivamente los transcritos para PD-L1 y PDL-2 en condiciones de normoxia y que la expresión dichos transcritos en las células tumorales fue menor en comparación con las de los fibroblastos en condiciones de normoxia e hipoxia. Este fenómeno pudiera deberse a que las células del tejido pulmonar expresan constitutivamente los transcritos como un mecanismo de tolerancia para evitar el daño en los tejidos.

La hipoxia modificó ligeramente la expresión del transcrito PD-L1 en SKLU-1, Calu-1, A-427 y los fibroblastos, mientras que en la línea A-549 se incrementó considerablemente la expresión de ambos transcrito. La expresión del transcrito PD-L2 disminuyó en la línea 1.3.11 sometida a hipoxia.

En general las células tumorales de pulmón pudieran estar bajo el efecto Warburg que mantienen la expresión constitutiva de HIF-1 α y que pudiera regular la expresión de los transcritos para PD-L1 y PD-L2; por lo que las células tumorales no presentan un cambio biológico importante en los niveles de los transcritos en condiciones de hipoxia. Por todo lo anterior, es necesario estudiar la expresión de las proteínas bajo estas condiciones y así asociarla con los niveles de expresión de los transcritos.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Adachi, K., & Tamada, K. (2015). Immune checkpoint blockade opens an avenue of cancer immunotherapy with a potent clinical efficacy. *Cancer Science*, 106, 945-950.
2. Akbay, E. A., Koyama, S., Carretero, J., Altabef, A., Tchaicha, J. H., Christensen, C. L., & Wilkerson, M. D. (2013). Activation of the PD-1 pathway contributes to immune escape in EGFR-driven lung tumors. *Cancer Discovery*, 3, 1355-1363.
3. Atefi, M., Avramis, E., Lassen, A., Wong, D. J., Robert, L., Foulad, D., & Comin-Anduix, B. (2014). Effects of MAPK and PI3K pathways on PD-L1 expression in melanoma. *Clinical Cancer Research*, 20, 3446-3457.
4. Barsoum, I. B., Smallwood, C. A., Siemens, D. R., & Graham, C. H. (2014). A mechanism of hypoxia-mediated escape from adaptive immunity in cancer cells. *Cancer Research*, 74, 665-674.
5. Bhatia, A., & Kumar, Y. (2014). Cellular and molecular mechanisms in cancer immune escape: a comprehensive review. *Expert Review of Clinical Immunology*, 10, 41-62.
6. Bhatia, A., & Kumar, Y. (2015). Cancer Immunoediting: Immunosurveillance, immune equilibrium, and immune escape. In *Cancer Immunology*, Springer Berlin Heidelberg, 195-208.
7. Chen, D. S., Irving, B. A., & Hodi, F. S. (2012). Molecular pathways: next-generation immunotherapy--inhibiting programmed death-ligand 1 and programmed death-1. *Clinical Cancer Research*, 18, 6580-6587.
8. Chen, J., Jiang, C. C., Jin, L., & Zhang, X. D. (2015). Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer. *Annals of Oncology*, 27, 409-416
9. Chen, L. (2004). Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nature Reviews Immunology*, 4, 336-347.
10. Cooper, W. A., Lam, D. C., O'Toole, S. A., & Minna, J. D. (2013). Molecular biology of lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*, 5, S479-S490.

11. Crespo, J., Sun, H., Welling, T. H., Tian, Z., & Zou, W. (2013). T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Current Opinion in Immunology*, 25, 214-221.
12. Cunha, L. L., Marcello, M. A., Morari, E. C., Nonogaki, S., Conte, F. F., Gerhard, R., & Ward, L. S. (2013). Differentiated thyroid carcinomas may elude the immune system by B7H1 upregulation. *Endocrine Related Cancer*, 20, 103-110.
13. Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D. B., & Lennon, V. A. (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nature Medicine*, 8, 793-800.
14. Driessens, G., Kline, J., & Gajewski, T. F. (2009). Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity. *Immunological Reviews*, 229, 126-144.
15. Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annual Reviews. Immunology*, 22, 329-360
16. Duraiswamy, J., Freeman, G. J., & Coukos, G. (2013). Therapeutic PD-1 pathway blockade augments with other modalities of immunotherapy T-cell function to prevent immune decline in ovarian cancer. *Cancer Research*, 73, 6900-6912.
17. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136, E359-E386.
18. Finn, O. J. (2012). Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Annals of Oncology*, 23, viii6-viii9.
19. Flies, D. B., Sandler, B. J., Sznol, M., & Chen, L. (2011). Blockade of the B7-H1/PD-1 pathway for cancer immunotherapy. *Yale Journal of Biology Medicine*, 84, 409-421.
20. Francisco, L. M., Salinas, V. H., Brown, K. E., Vanguri, V. K., Freeman, G. J., Kuchroo, V. K., & Sharpe, A. H. (2009). PD-L1 regulates the development,

- maintenance, and function of induced regulatory T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 206, 3015-3029.
21. Fraig, M. M., (2013). Classification of Lung Tumors. En J. H. Ravenel. Ed. *Lunga Cancer Imaging*, pp 17-22. Charleston, SC, USA: Springer.
 22. Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O., & Samali, A. (2010). Cellular stress responses: cell survival and cell death. *International Journal of Cell Biology*, 2010.
 23. Ghebeh, H., Mohammed, S., Al-Omair, A., Qattant, A., Lehe, C., Al-Qudaihi, G., & Ajarim, D. (2006). The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia*, 8, 190-198.
 24. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-674.
 25. Hill, B. T. (2013). Etiology of Cancer. En Arun, DS., Bertil, D., Editor, *Clinical Ophthalmic Oncology*, p 13, New York, Springer
 26. Höckel, M., & Vaupel, P. (2001). Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *Journal of the National Cancer Institute*, 93, 266-276.
 27. Huber, S., Hoffmann, R., Muskens, F., & Voehringer, D. (2010). Alternatively activated macrophages inhibit T-cell proliferation by Stat6-dependent expression of PD-L2. *Blood*, 116, 3311-3320.
 28. Inman, K. S., Francis, A. A., & Murray, N. R. (2014). Complex role for the immune system in initiation and progression of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 20, 11160-11181.
 29. Jadus, M. R., Natividad, J., Mai, A., Ouyang, Y., Lambrecht, N., Szabo, S., & Dacosta-Iyer, M. G. (2012). Lung cancer: a classic example of tumor escape and progression while providing opportunities for immunological intervention. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012.
 30. Jiang, Y., Li, Y., & Zhu, B. (2015). T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death and Disease*, 6, e1792.

31. Jin, H. T., Ahmed, R., & Okazaki, T. (2011). Role of PD-1 in regulating T-cell immunity. In *Negative Co-Receptors and Ligands*. Springer Berlin Heidelberg, 17-37.
32. Justus, C. R., Sanderlin, E. J., & Yang, L. V. (2015). Molecular connections between cancer cell metabolism and the tumor microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 11055-11086.
33. Kalemkerian, G. P., Akerley, W., Bogner, P., Borghaei, H., Chow, L. Q., Downey, R. J., Hughes, M. (2013). Small Cell Lung Cancer: Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 11, 78–98.
34. Karim, R., Jordanova, E. S., Piersma, S. J., Kenter, G. G., Chen, L., Boer, J. M., & van der Burg, S. H. (2009). Tumor-expressed B7-H1 and B7-DC in relation to PD-1+ T-cell infiltration and survival of patients with cervical carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 15, 6341-6347.
35. Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annuals. Review. Immunology*, 26, 677-704.
36. Keir, M. E., Francisco, L. M., & Sharpe, A. H. (2007). PD-1 and its ligands in T-cell immunity. *Current Opinion in Immunology*, 19, 309-314.
37. Kim, R., Emi, M., & Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 121, 1-14.
38. Kinter, A. L., Godbout, E. J., McNally, J. P., Sereti, I., Roby, G. A., O'Shea, M. A., & Fauci, A. S. (2008). The common γ -chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *The Journal of Immunology*, 181, 6738-6746.
39. Larsen, J. E., & Minna, J. D. (2011). Molecular Biology of Lung Cancer: Clinical Implications. *Clinics in Chest Medicine*, 32, 703–740.
40. Latchman, Y., Wood, C. R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., & Greenfield, E. A. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature immunology*, 2, 261-268.

41. Lesterhuis, W. J., Punt, C. J., Hato, S. V., Eleveld-Trancikova, D., Jansen, B. J., Nierkens, S., & van Krieken, J. H. (2011). Platinum-based drugs disrupt STAT6-mediated suppression of immune responses against cancer in humans and mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 121, 3100-3108.
42. Leung, J., & Suh, W. K. (2014). The CD28-B7 Family in Anti-Tumor Immunity: Emerging Concepts in Cancer Immunotherapy. *Immune Network*, 14, 265-276.
43. Liang, S. C., Latchman, Y. E., Buhlmann, J. E., Tomczak, M. F., Horwitz, B. H., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2003). Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *European Journal of Immunology*, 33, 2706-2716.
44. Liao, H. Y., Wang, G. P., Huang, S. H., Li, Y., Cai, S. W., Zhang, J., & Wu, W. B. (2014). HIF-1 α silencing suppresses growth of lung adenocarcinoma A549 cells through induction of apoptosis. *Molecular Medicine Reports*, 9, 911-915
45. Liu, X., Gao, X. J., Wen, J., Yin, L., Li, O., Zuo, T., Gajewski, T. F., Fu, Y. X., Zheng, P., Liu, Y. (2003). B7DC/PD-L2 promotes tumor immunity by a PD-1-independent mechanism. *Journal of Experimental Medicine*, 197: 1721-1730.
46. Loos, M., Giese, N. A., Kleeff, J., Giese, T., Gaida, M. M., Bergmann, F., & Friess, H. (2008). Clinical significance and regulation of the costimulatory molecule B7-H1 in pancreatic cancer. *Cancer Letters*, 268, 98-109.
47. Martin-Orozco, N., & Dong, C. (2007, August). Inhibitory costimulation and anti-tumor immunity. *Seminars in Cancer Biology*, 17, 288-298
48. Medina-Villaseñor, E.A., & Martínez-Macías, R. (2009). *Fundamentos de Oncología*. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, México DF, México.
49. Messal, N., Serriari, N. E., Pastor, S., Nunès, J. A., & Olive, D. (2011). PD-L2 is expressed on activated human T cells and regulates their function. *Molecular immunology*, 48, 2214-2219.

50. Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology*, 27, 16-25.
51. Nirschl, C. J., & Drake, C. G. (2013). Molecular pathways: coexpression of immune checkpoint molecules: signaling pathways and implications for cancer immunotherapy. *Clinical Cancer Research*, 19, 4917-4924.
52. Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., & Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in cancer. *Vascular Health and Risk Management*, 2, 213-219.
53. Noman, M. Z., Desantis, G., Janji, B., Hasmim, M., Karray, S., Dessen, P., & Chouaib, S. (2014). PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *The Journal of Experimental Medicine*, 211, 781-790.
54. Ohaegbulam, K. C., Assal, A., Lazar-Molnar, E., Yao, Y., & Zang, X. (2015). Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. *Trends in Molecular Medicine*, 21, 24-33.
55. Ohigashi, Y., Sho, M., Yamada, Y., Tsurui, Y., Hamada, K., Ikeda, N., & Tsushima, F. (2005). Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clinical Cancer Research*, 11, 2947-2953.
56. Okazaki, T., & Honjo, T. (2007). PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *International Immunology*, 19, 813-824.
57. Okudaira, K., Hokari, R., Tsuzuki, Y., Okada, Y., Komoto, S., Watanabe, C., & Yagita, H. (2009). Blockade of B7-H1 or B7-DC induces an anti-tumor effect in a mouse pancreatic cancer model. *International Journal of Oncology*, 35, 741-749.
58. Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 12, 252-264.
59. Parsa, A. T., Waldron, J. S., Panner, A., Crane, C. A., Parney, I. F., Barry, J. J., & Mischel, P. S. (2007). Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nature Medicine*, 13, 84-88.

60. Pérez, Hernández, E. G. (2010). Efecto de IFN-gamma en la expresión de las moléculas PD-L1 y PD-L2 en las líneas celulares de carcinoma pulmonary y determinación de la funcionalidad de PD-1. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F. México.
61. Pfistershammer, K., Klauer, C., Pickl, W. F., Stöckl, J., Leitner, J., Zlabinger, G., & Steinberger, P. (2006). No evidence for dualism in function and receptors: PD-L2/B7-DC is an inhibitory regulator of human T cell activation. *European Journal of Immunology*, 36, 1104-1113.
62. Phillips, R. J., Mestas, J., Gharaee-Kermani, M., Burdick, M. D., Sica, A., Belperio, J. A., & Strieter, R. M. (2005). EGF and hypoxia-induced expression of CXCR4 on non-small cell lung cancer cells is regulated by the PI3-kinase/PTEN/AKT/mTOR signaling pathway and activation of HIF-1 α . *Journal of Biological Chemistry*, 280, 22473-22481
63. Prado-Garcia, H., Romero-Garcia, S., & Lopez-Gonzalez, J. S. (2015). The Role of Exhaustion in Tumor-Induced T Cell Dysfunction in Cancer. In *Cancer Immunology*. Springer Berlin Heidelberg, 61-75.
64. Quandt, D., Jasinski-Bergner, S., Müller, U., Schulze, B., & Seliger, B. (2014). Synergistic effects of IL-4 and TNF α on the induction of B7-H1 in renal cell carcinoma cells inhibiting allogeneic T cell proliferation. *Journal of Translational Medicine*, 12, 1-12.
65. Rankin, E. B., & Giaccia, A. J. (2008). The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell. Death and Differentiation*, 15, 678-685.
66. Raval, R. R., Sharabi, A. B., Walker, A. J., Drake, C. G., & Sharma, P. (2014). Tumor immunology and cancer immunotherapy: summary of the 2013 SITC primer. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2, 1-11.
67. Riella, L. V., Paterson, A. M., Sharpe, A. H., & Chandraker, A. (2012). Role of the PD-1 pathway in the immune response. *American Journal of Transplantation*, 12, 2575-2587.
68. Ritprajak, P., & Azuma, M. (2015). Intrinsic and extrinsic control of expression of the immunoregulatory molecule PD-L1 in epithelial cells and squamous cell carcinoma. *Oral oncology*, 51, 221-228.

69. Romero-Garcia S, Prado-Garcia H, Lopez-Gonzalez JS. (2014). Transcriptional analysis of hnRNPA0, A1, A2, B1, and A3 in lung cancer cell lines in response to acidosis, hypoxia, and serum deprivation conditions. *Experimental Lung Research*, 40,12–21.
70. Rozali, E. N., Hato, S. V., Robinson, B. W., Lake, R. A., & Lesterhuis, W. J. (2012). Programmed death ligand 2 in cancer-induced immune suppression. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012.
71. Sandoval, Vázquez, N. C. (2009). Determinación de la expresión de los ligandos PD-L1 y PD-L2 en células tumorales y el receptor PD-1 en linfocitos T CD4+ y CD8+ provenientes de pacientes con adenocarcinoma pulmonar. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de México. D.F. México.
72. Sanmamed, M. F., & Chen, L. (2014). Inducible expression of B7-H1 (PD-L1) and its selective role in tumor site immune modulation. *Cancer Journal*, 20, 256-261.
73. Schalper, K. A., Velcheti, V., Carvajal, D., Wimberly, H., Brown, J., Pusztai, L., & Rimm, D. L. (2014). In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased TILs and better outcome in breast carcinomas. *Clinical Cancer Research*, 20, 2773-2782.
74. Schreiber, R. D., Old, L. J., & Smyth, M. J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 331, 1565-1570.
75. Shen, J. K., Cote, G. M., Choy, E., Yang, P., Harmon, D., Schwab, J., & Wang, Y. (2014). Programmed cell death ligand 1 expression in osteosarcoma. *Cancer Immunology Research*, 2, 690-698.
76. Shi, F., Shi, M., Zeng, Z., Qi, R. Z., Liu, Z. W., Zhang, J. Y., & Wang, F. S. (2011). PD-1 and PD-L1 upregulation promotes CD8+ T-cell apoptosis and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients. *International Journal of Cancer*, 128, 887-896.
77. Shi, L., Chen, S., Yang, L., & Li, Y. (2013). The role of PD-1 and PD-L1 in T-cell immune suppression in patients with hematological malignancies. *Journal of Hematology and Oncology*, 6, 74.

78. Shin, T., Yoshimura, K., Shin, T., Crafton, E. B., Tsuchiya, H., Housseau, F., & Pardoll, D. M. (2005). In vivo costimulatory role of B7-DC in tuning T helper cell 1 and cytotoxic T lymphocyte responses. *The Journal of Experimental Medicine*, 201, 1531-1541.
79. Singh, A. K., Stock, P., & Akbari, O. (2011). Role of PD- L1 and PD- L2 in allergic diseases and asthma. *Allergy*, 66, 155-162.
80. Talmadge, J. E., & Fidler, I. J. (2010). AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. *Cancer Research*, 70, 5649–5669.
81. Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65, 87-108.
82. Vicente-Dueñas, C., Romero-Camarero, I., Cobaleda, C., & Sánchez-García, I. (2013). Function of oncogenes in cancer development: a changing paradigm. *The EMBO Journal*, 32, 1502-1513.
83. Visvader, J. E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature*, 469, 314-322.
84. Wei, J., Barr, J., Kong, L. Y., Wang, Y., Wu, A., Sharma, A. K., & Lang, F. F. (2010). Glioma-associated cancer-initiating cells induce immunosuppression. *Clinical Cancer Research*, 16, 461-473.
85. Wintterle, S., Schreiner, B., Mitsdoerffer, M., Schneider, D., Chen, L., Meyermann, R., & Wiendl, H. (2003). Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells a potential mechanism of immune paralysis. *Cancer Research*, 63, 7462-7467.
86. Yang, W., Chen, P. W., Li, H., Alizadeh, H., & Niederkorn, J. Y. (2008). PD-L1: PD-1 interaction contributes to the functional suppression of T-cell responses to human uveal melanoma cells in vitro. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49, 2518-2525.
87. Yotnda, P., Wu, D., & Swanson, A. M. (2010). Hypoxic tumors and their effect on immune cells and cancer therapy. *Immunotherapy of Cancer: Methods and Protocols*, 1-29.

88. Zhang, Y., Chung, Y., Bishop, C., Daugherty, B., Chute, H., Holst, P., & Dong, C. (2006). Regulation of T cell activation and tolerance by PD-L2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 11695-11700.