

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA**



**EXPRESIÓN DE FOXP3 EN CÉLULAS TUMORALES Y SU IMPLICACIÓN
EN EL PRONÓSTICO DEL CÁNCER.**

ADRIANA LUCÍA ESPINOSA SANDOVAL.

**TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar por el título de**

BACTERIOLOGA

**BOGOTÁ, D.C
MAYO DEL 2013**

Nota de Advertencia

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia.”

Artículo 23 de la Resolución N°13 de julio de 1946

Agradecimientos:

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a:

Dios por mantenerme con vida, haber puesto a disposición todas las herramientas necesarias para la realización de este trabajo de grado y guiarme en cada momento de mi vida.

A mi familia que son el motor de mi vida, por su apoyo incondicional, porque gracias a ellos pude afrontar un reto más en mi vida, basándome siempre en los valores que ellos me inculcaron y sobre todo por enseñarme amar y valorar mi carrera.

A mi novio por sus enseñanzas, colaboración y apoyo en todo momento.

La Doctora Sandra Quijano por su acompañamiento, entrega, dedicación, interés y en especial por la confianza que depositó en mí para la realización de este trabajo.

Adriana Lucía Espinosa Sandoval.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
Resumen	6
1. Introducción, justificación y planteamiento del problema	7
2. Objetivos.	8
2.1 Objetivo General	8
2.2 Objetivos específicos.	8
3. Marco teórico	9
3.1 El factor de transcripción FOXP3.	9
3.1.1 Propiedades generales de FOXP3.	9
3.1.2 Regulación de la expresión de FOXP3.	11
3.2 Expresión de FOXP3 en células tumorales y su implicación en el pronóstico.	12
3.2.1 Cáncer de seno.	13
3.2.2 Cáncer de páncreas.	16
3.2.3 Cáncer gástrico.	20
3.2.4 Cáncer de ovario.	22
3.2.5 Tumores de origen hematológico.	25
3.3 Tabla resumen del papel de FOXP3 en células tumorales.	32
4. Conclusiones.	34
5. Bibliografía.	35

Resumen.

El factor de transcripción FOXP3, característico de las células T reguladoras (Tregs), se ha encontrado recientemente expresado por células tumorales de diferentes tipos de cáncer. Distintos estudios han reportado que la expresión de FOXP3 en células tumorales se ha asociado a un mal pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, la importancia pronóstica que posee la expresión de FOXP3 en células tumorales y su relación con las células Tregs sigue sin estar clara. Con el fin de describir la relación entre la expresión del factor de transcripción FOXP3 en células tumorales y parámetros clínicos y biológicos de valor pronóstico de la enfermedad, se realizó una revisión bibliográfica de la literatura reciente sobre la expresión de FOXP3 en células tumorales, en artículos científicos publicados en revistas de alto impacto.

En esta revisión se observó la expresión de FOXP3, en células tumorales de cáncer de seno, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de ovario y en leucemia/linfoma T del adulto (LLTA), con distintos patrones de expresión e implicación en el pronóstico de la enfermedad. Además se evidenció el papel dual de FOXP3 como un mecanismo adicional de evasión inmune en cáncer de páncreas y su papel como un represor de oncogenes en algunos estudios en cáncer seno.

1. Introducción, planteamiento del problema de investigación y justificación.

FOXP3, es un factor de transcripción característico de las células T reguladoras (Tregs), que se encuentra involucrado en su activación y diferenciación (1). Pero estudios recientes han reportado que FOXP3, no sólo se encuentra involucrado en el desarrollo y regulación de las células Tregs, sino que también es expresado por células tumorales de distintos tipos de cáncer (2). Recientemente se ha venido observando que la expresión de FOXP3+ por parte de células tumorales se ha asociado a un mal pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, la importancia pronostica que posee la expresión de FOXP3 en células tumorales y su relación con las células Tregs sigue sin estar claro.

Por esta razón, es importante identificar si la expresión de FOXP3 en cáncer, está asociada a la presencia de las Tregs infiltradas en el tumor o está directamente asociado a células tumorales, para poder tener más claro la asociación con el pronóstico. Así mismo también se deberá reconocer si el factor de transcripción FOXP3, expresado por células tumorales, podría ser diferente al factor de transcripción FOXP3, expresado por las células Tregs (3).

Diferentes estudios clínicos han demostrado que FOXP3, ha sido expresado por células tumorales de diferentes orígenes tanto T (leucemia/linfoma T del adulto, linfoma T periférico), como en tumores y líneas celulares derivadas de tumores de origen "no-T" (cáncer de pulmón, cáncer de seno, melanoma maligno, cáncer de colón, cáncer de páncreas, cáncer de ovario entre otras). Asociándose la expresión de FOXP3, al pronóstico y progresión de la enfermedad (4).

Teniendo en cuenta lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo realizar una revisión sobre los estudios actuales acerca de la expresión del factor de transcripción FOXP3, en las células tumorales, con el fin de poder tener una asociación más clara entre la expresión de FOXP3 y el pronóstico de la enfermedad, para así poder tener un mejor manejo y evolución de la enfermedad.

2. Objetivos.

2.1 Objetivo general.

Describir la relación entre la expresión del factor de transcripción FOXP3 en células tumorales y parámetros clínicos y biológicos de valor pronóstico de la enfermedad.

2.2 Objetivos específicos.

- ✓ Describir los diferentes tipos de tumores en los que se ha reportado expresión de FOXP3.
- ✓ Determinar la implicación a nivel pronóstico de la expresión de FOXP3 en células tumorales de pacientes con cáncer.

3. Marco teórico.

3.1 El factor de transcripción FOXP3.

3.1.1 Propiedades generales de FOXP3.

FOXP3 es un factor de transcripción que pertenece a la subfamilia FOX (*Forkhead/winged-helix*) y se encuentra implicado como un gen central en la diferenciación de linfocitos T reguladores (Tregs) CD4+CD25++ naturales e inducidos en timo y en tejidos periféricos (5). El gen es expresado principalmente en tejidos linfoides como timo, bazo y ganglios linfáticos, en linfocitos T reguladores (Tregs) CD4+CD25++ y en menor proporción en linfocitos T CD4+CD25-, CD4+CD8+, CD8+ y en timocitos CD4-CD8- $\alpha\beta$ TCRhi (6,7).

Las células Tregs expresan dos isoformas de FOXP3, que incluyen FOXP3 y FOXP3 Δ 2 (carece del exón 2). La transducción de FOXP3 en linfocitos T CD4+CD25- con una de las dos isoformas puede inducir un estado de hiperrespuesta y una disminución en la producción de IL-2 y solo cuando son transducidas las dos isoformas, se induce el fenotipo y la función reguladora (6).

Diferentes estudios demuestran que FOXP3 es un marcador muy específico para la identificación y cuantificación de linfocitos Tregs en diferentes tejidos (8); sin embargo, otros estudios han reportado que FOXP3, también puede ser expresado de forma transitoria en células T humanas CD4+ no reguladoras, en linfocitos T activados y en células no linfoides normales o tumorales (9), por lo que para la identificación de linfocitos Tregs es necesario realizar combinaciones más amplias de anticuerpos que incluyan además de FOXP3, CD25 y CD127 entre otros (10). A nivel funcional este factor de transcripción también puede reprimir genes implicados en la activación y función de linfocitos T como la producción de IL-2, IL-4 e IFN- γ mediante su asociación con factores de transcripción de la familia Rel, NF- κ B y NFAT bloqueando su unión a los promotores de estas citocinas mencionadas (11).

La principal evidencia que soporta que FOXP3 actúa como un represor de la transcripción se encuentra descrita en las células T del modelo de ratón "Scurfy" (ratones con mutación recesiva ligada al cromosoma X en el gen FOXP3) que conduce a deficiencia de la proteína FOXP3. Esta anomalía genética conduce a la proliferación descontrolada de células T CD4+ activadas resultando en una infiltración celular multiorgánica (11,12). En humanos la deficiencia de FOXP3 causada por mutación en el gen induce el síndrome autoinmune IPEX (inmunodeficiencia, poliendocrinopatía, enteropatía, ligado al X) que se manifiesta durante los primeros años de vida, resultando en

deficiencia de linfocitos Tregs y a enteropatía autoinmune, dermatitis, tiroiditis, anemia y diabetes tipo I. Los niños afectados también desarrollan manifestaciones alérgicas con niveles elevados de IgE, eosinofilia y alergia a las comidas (1). Estos hallazgos demuestran la relevancia del papel de FOXP3 en la diferenciación de Tregs y el control del sistema inmune.

Se han descrito mediante análisis filogenéticos, al menos 15 clases de proteínas FOX que son clasificadas en términos de estructura y no de función (1). El gen *FOXP3* se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma X a nivel de Xp11.23 y contiene 11 exones codificantes de una proteína de aproximadamente 411 aminoácidos (9). A nivel estructural, desde el extremo N terminal, contiene un dominio rico en prolina necesario para reprimir la expresión de genes diana, seguido de un dedo de Zinc y una cremallera de leucina que permite la homo o heterodimerización de FOXP3 y finalmente el dominio de unión al DNA (FKH) en el extremo C terminal que es estructuralmente conservado entre miembros de la familia (Figura 1). A pesar de que existe una homología en los dominios de unión al DNA, los factores de transcripción de la familia FOX presentan poca o ninguna homología en la secuencia de los dominios de activación o represión entre sí (1,13).

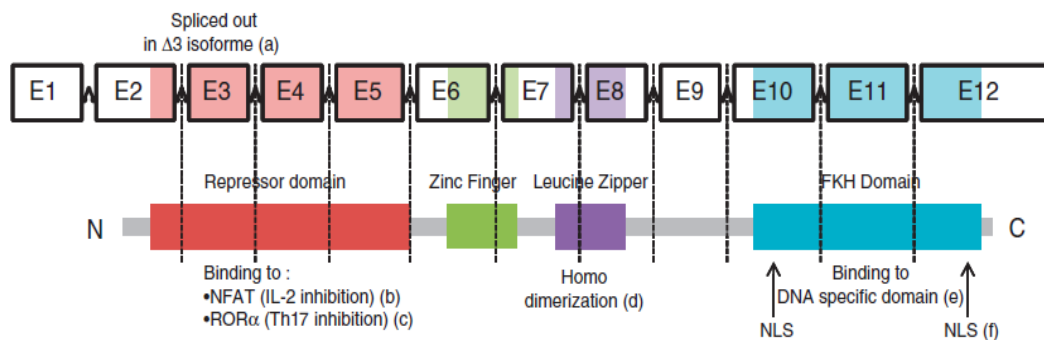


Figura 1. Estructura de los genes y proteínas y las principales funciones de FOXP3 humano (Tomada de Martin F et al Oncogene 2010).

El nombre del dominio “forkhead” (FKH) se deriva del producto del gen *forkhead* (*fkh*) identificado en *Drosophila melanogaster*, indispensable para la diferenciación terminal del embrión. Poco después de este descubrimiento se identificó la estructura del dominio FKH, en un grupo de factores de transcripción específicos del hígado con dominios de unión al DNA, que dio lugar a la conformación del grupo de factores de transcripción con dominios FKH, los cuales se han identificado en diversos organismos (1,13).

Aunque todas las proteínas FOX se unen al DNA, algunas ejercen efectos transactivadores y otras, efectos inhibidores de la transcripción. El dominio FKH de FOXP3 está localizado muy cerca del extremo carboxiterminal de la

proteína, lo que sugiere que carece de dominio transactivador y se llega a postular que podría actuar como un inhibidor transcripcional (1).

3.1.2 Regulación de la expresión de FOXP3

Aunque se han identificado varias vías de señalización que pueden inducir la expresión de FOXP3, los mecanismos por los cuales las células normales o tumorales controlan la expresión de esta proteína todavía no se encuentran bien definidos. Hasta el momento, se ha establecido que la transcripción de *FOXP3* es inducida a través de la señalización regulada por TCR, moléculas coestimuladoras y receptores de citocinas (Figura 2) (14).

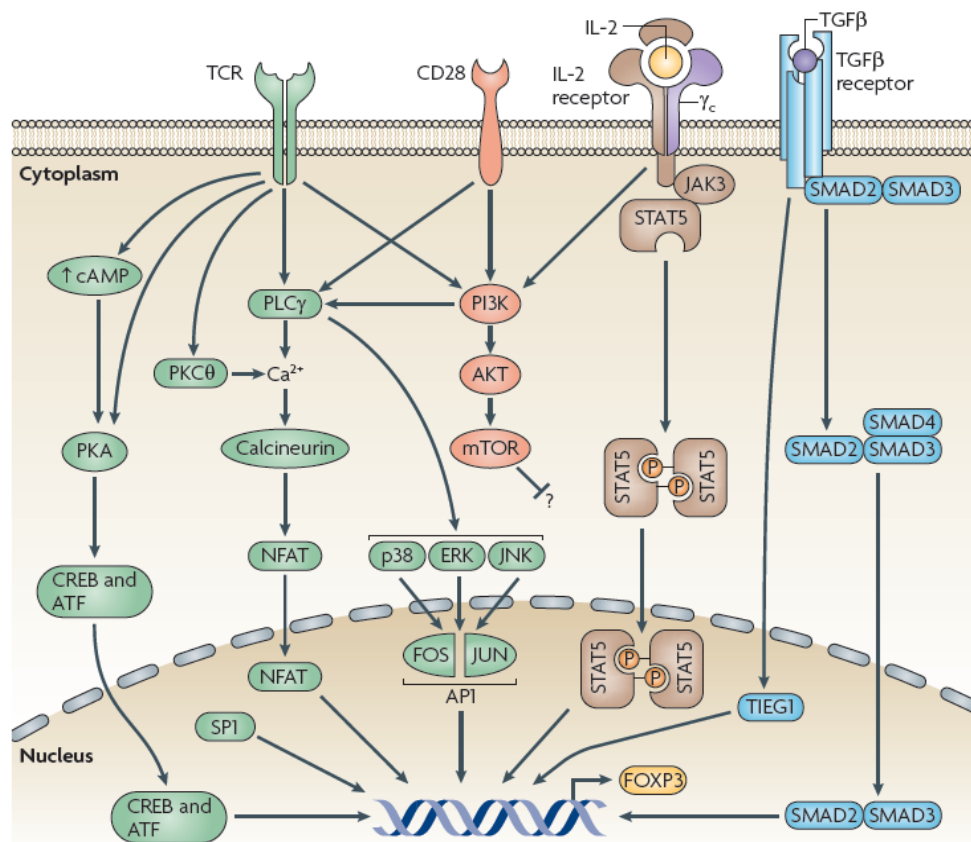


Figura 2. Múltiples vías de señalización convergen para la inducción de la expresión de FOXP3. La expresión de *Foxp3* depende de la señalización a través del TCR, CD28 y de receptores de citocinas que comparten la cadena gamma común γ (γ_c) (interleucinas 2, 4, 7, 9, 15, y 21) y del receptor del factor estimulante de crecimiento β (TGF- β R). Resultando en la activación de los siguientes factores de transcripción CREB, ATF, SP1, NFAT, AP1, TIEG1, SMAD3, y STAT5. Cada vía de señalización puede variar en los distintos tipos de células (Tomado y adaptado de Huehn *J Nat. Rev. Immunol*).

La vía de señalización del TCR, puede contribuir a la inducción de la expresión de FOXP3 en las células Tregs naturales y en las células Tregs inducidas. En humanos, la activación de las células T a través del TCR conduce a la unión

de los factores nucleares de células T activados (NAFT) y a la proteína activadora 1 (AP1) al promotor de FOXP3 (14,15).

Otra de las proteínas que se encuentra involucrada en la activación de FOXP3 a través de la vía de señalización del TCR es la proteína kinasa C- θ (PKC- θ), que promueve el desarrollo de las Tregs potenciando la expresión de FOXP3 mediante la activación de la vía de Ca²⁺- Calmodulina-NFAT (14).

Además de la señalización del TCR, se requieren de señales coestimuladoras específicas, que son necesarias para la expresión de FOXP3 en las células T, por ejemplo la señalización regulada por CD28 durante la sinapsis inmunológica estimula los timocitos TCR activados e induce la expresión de FOXP3 (14).

La señalización mediada por citocinas también es esencial en la expresión de FOXP3, a través de diversos receptores de citocinas que comparten la cadena común γ (γ c), como es el caso del receptor de IL-2, que se ha visto involucrado en la inducción de la expresión de FOXP3, mediante la activación de diferentes vías de señalización que involucra las proteínas JAK/STAT y el receptor de TGF- β que activa corriente abajo proteínas de la familia SMAD (14).

3.2 Expresión de FOXP3 en células tumorales y su implicación en el pronóstico.

Diferentes reportes en la literatura describen que la expresión de la proteína FOXP3 se restringe únicamente al linaje linfóide (12); Sin embargo, recientes estudios han demostrado la presencia de FOXP3 en células hematopoyéticas de otros linajes y además en células normales de origen epitelial y en tumores sólidos (16).

En diferentes modelos de cáncer se ha descrito que el incremento significativo de células Tregs en el microambiente tumoral (nódulos linfoides, médula ósea, sangre periférica, ascitis, etc.) está asociado a altos niveles de expresión de FOXP3 en las células neoplásicas y a un curso clínico más agresivo de la enfermedad por el ambiente inmunosupresor que se genera a nivel local a través del contacto directo entre células Tregs, linfocitos T y células dendríticas o a través de la secreción de mediadores solubles como IL-10 y TGF- β (17,18). Estos hallazgos sugieren que FOXP3 además de inducir un microambiente inmunosupresor por parte de las Tregs, también por sí mismo expresado en las células tumorales podría tener un papel directo en la carcinogénesis modulando la función de células T (19). Estos hallazgos soportan la hipótesis que FOXP3 puede representar un potencial marcador pronóstico en cáncer.

Los siguientes modelos de cáncer son aquellos en los que se ha reportado y descrito la expresión de FOXP3 en células tumorales, su implicación en el pronóstico y su relación con las características clínico biológicas de la enfermedad.

3.2.1 Cáncer de seno.

En el estudio publicado por Merlo A, et al. (2009) (19), se evaluaron los patrones de expresión de FOXP3 en muestras tumorales de pacientes con carcinoma de mama, mediante inmunohistoquímica empleando el clon PCH101 (*eBioscience*) y correlacionaron los niveles de expresión de FOXP3 (negativo, débil y fuerte) con parámetros de significado pronóstico como supervivencia global, tipo de tratamiento, metástasis y recaídas de la enfermedad. Es importante resaltar que el punto de corte establecido para diferenciar casos positivos de negativos, fue arbitrario definiendo como casos positivos si >25% de las células tumorales expresaban FOXP3.

En este estudio se incluyeron dos grupos de pacientes; al primero se le denominó Milan 3, en el cual se estudió la eficacia de la terapia de radiación después de una cirugía conservadora de seno en mujeres con cáncer de mama localizado; de este grupo se incluyeron 183 muestras de mujeres con un rango de edad entre 30-70 años. Al segundo grupo de pacientes se le denominó Milan 1, en el cual se comparó la mastectomía radical, disección axilar y la radioterapia en pacientes con tumores de mama pequeños; en este grupo se tomaron las muestras de 214 mujeres y la mediana de seguimiento de estos pacientes fue de 20 años.

Los resultados revelaron que aproximadamente el 57% y 73% de los casos en los grupos Milan 3 y Milan 1, respectivamente, fueron positivos para FOXP3 en las células tumorales con patrones de localización celular a nivel de citoplasma, núcleo o en ambos compartimentos de forma simultánea. Los autores discuten que la localización citoplasmática y no sólo nuclear de la proteína puede ser el resultado de modificaciones post-traduccionales que afectan su localización.

En cuanto al pronóstico los autores describen que la expresión de FOXP3 se asoció de forma significativa con menor supervivencia global, con metástasis a distancia incluyendo ganglios linfáticos axilares (ganglio centinela) y se asoció además con positividad para Ki67 (MIB1) (proteína nuclear presente en células que entran en ciclo celular y es una variable clínica de pronóstico independiente en cáncer) (Figura 3).

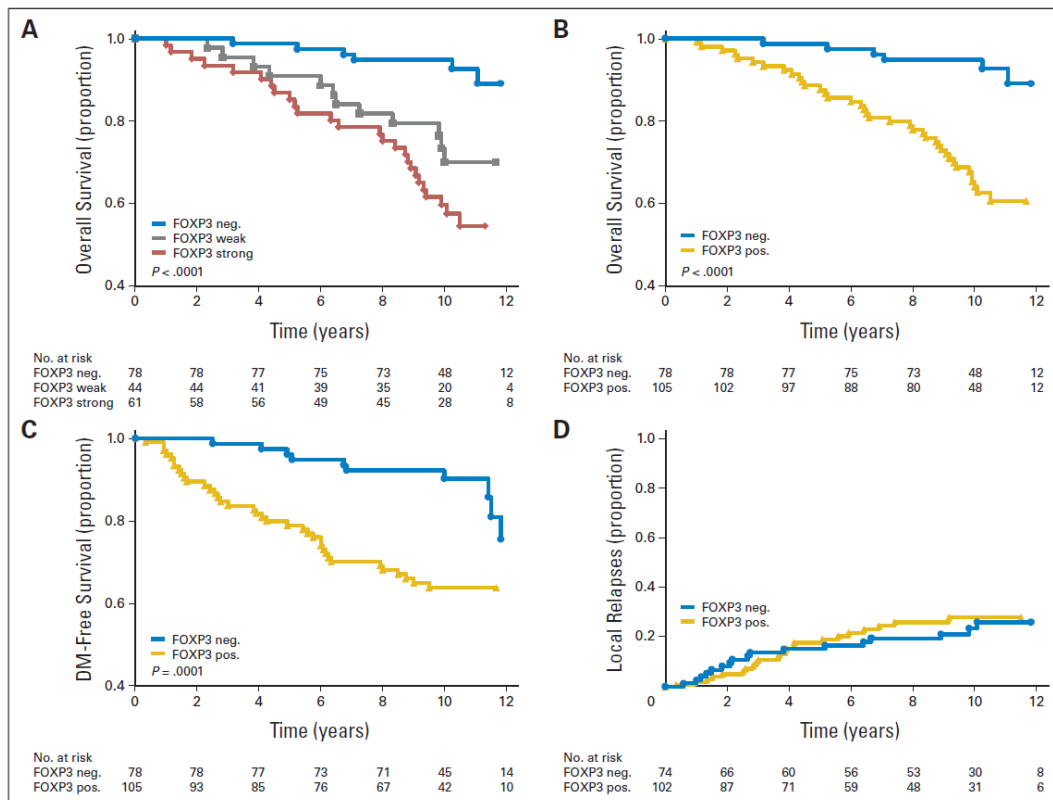


Figura 3. Influencia de FOXP3 en el pronóstico de cáncer de seno. Esta figura es representativa de las pacientes con cáncer de seno incluidas en el grupo Milan 3. La figura (A) muestra la asociación significativa entre los niveles de expresión de FOXP3 (negativo, débil y fuerte) con la supervivencia global. En la figura (B) se observa la asociación entre la presencia o ausencia de FOXP3 con la supervivencia global. En la figura (C) se demuestra la asociación clara de la presencia de FOXP3 con peor supervivencia libre de metástasis a distancia; y finalmente en la figura (D) la incidencia de recidiva local. (Tomado y adaptado de Merlo A, et al *J Clin Oncol* 2009).

Los mecanismos que regulan la expresión de FOXP3 en células tumorales de cáncer de seno pueden incluir la inducción por genes como *PDE3B* (fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos 3B) el cual confiere una ventaja de supervivencia y una mayor resistencia a la apoptosis (20). Adicionalmente se ha descrito que FOXP3 en estas células regula la transcripción de los genes que codifican para los receptores de quemoquinas CCR7 y CXCR4, que llegan a desempeñar un papel fundamental en la biología tumoral como reguladores de los procesos de invasión y metástasis (21). La relevancia de este estudio radica en que FOXP3, nunca se había descrito como un marcador molecular de valor pronóstico independiente en cáncer de mamá (22).

A pesar de la demostración clara del papel de FOXP3 en conferir un peor pronóstico en cáncer de seno, otros estudios han descrito resultados contradictorios debido a que se ha demostrado que FOXP3 también puede actuar como un represor transcripcional de oncogenes implicados en el desarrollo y progresión de la enfermedad como *HER-2/ErbB2*. Hallazgos que

soportan que la expresión de FOXP3, podría estar asociada a un mejor pronóstico de la enfermedad.

Zuo et al. (2007) (4), demostraron que FOXP3 actúa como un represor transcripcional de *HER-2/ErbB2* en el modelo de ratón BALB/c *scurfy* (portador de mutaciones en el gen FOXP3 -*Foxp3^{sf/+}*- ligadas al X). En este modelo los ratones con pérdida funcional de FOXP3 sobre-expresaban los oncogenes *HER-2/ErbB2* y desarrollaron cáncer de mama (Figura 4).

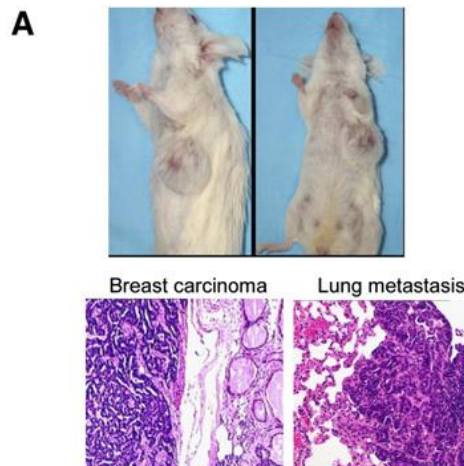


Figura 4. Mayor susceptibilidad a desarrollar cáncer de mama en ratones heterocigotos para *Foxp3^{sf/+}*. El panel superior muestra la anatomía macroscópica de los ratones con el tumor primario y la metástasis, mientras que en el panel inferior se observan los cortes histológicos de las lesiones de cáncer de mama local y metastásica (A) (Tomado y adaptado de Zuo T. et al cell 2007).

Con el fin de comprobar si el papel de FOXP3 en células tumorales de ratón es similar en las células de cáncer de mama en humanos, realizaron tinción por inmunohistoquímica a los tejidos normales y tumorales, para la detección de la expresión de FOXP3 (Figura 5). De manera contraria a lo esperado, los resultados mostraron que alrededor del 80% de las muestras de tejidos normales expresaron FOXP3 y sólo el 20% de los tejidos tumorales analizados mostraron una tinción a nivel nuclear.

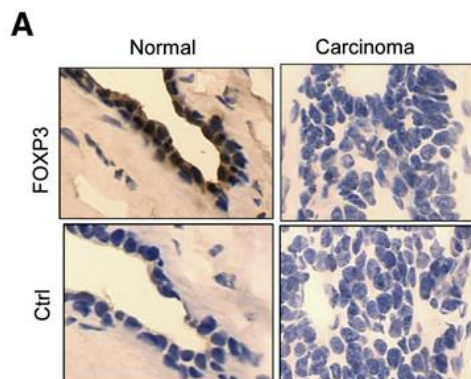


Figura 5. Detección de FOXP3 en cáncer de seno en humanos. Se observa una baja expresión de FOXP3 en las células tumorales. En el panel superior se muestra la tinción con anti-FOXP3 en tejido normal y tumoral del mismo paciente, empleando un control de especificidad mostrado en la parte inferior (A). (Tomado y adaptado de Zuo T. et al cell 2007).

Luego, realizaron hibridación in situ fluorescente (FISH) empleando sondas complementarias de FOXP3 (locus Xp11), para determinar si los patrones de expresión de este gen en las muestras de cáncer de mama se encontraban alterados con cambios estructurales como deleciones. Los resultados obtenidos en este ensayo mostraron que de las 223 muestras analizadas, 28 casos (12,6%) presentaban deleciones en el locus FOXP3. Estos datos sugieren que la delección de FOXP3 puede estar asociada en estos casos a la baja expresión de la proteína en el tejido tumoral.

Finalmente, los autores evaluaron el papel de FOXP3 en la sobre-expresión de *HER-2*, transfectando células epiteliales de mama normales con siRNA para silenciar FOXP3, encontrando que la baja regulación de FOXP3 está fuertemente asociada con la sobre-expresión de *HER-2*, lo cual evidencia el papel de FOXP3 en la inactivación de este oncogén en cáncer de mama. Sin embargo, como muchas de las células FOXP3- mantuvieron *HER-2*-, es probable que la desregulación de FOXP3 no sea el único mecanismo regulador de *HER-2* (Figura 6).

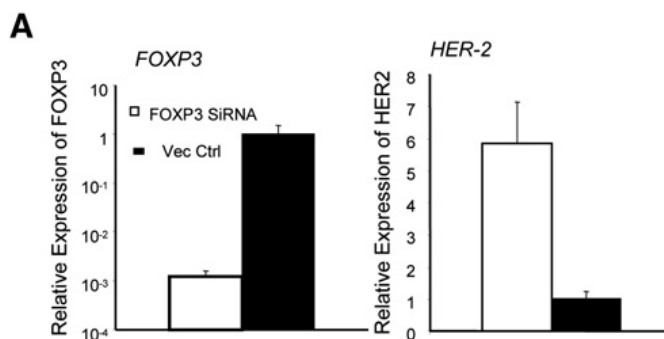


Figura 6. FOXP3 es un importante represor de *HER-2*. El silenciamiento de FOXP3 dio como resultado la sobre-expresión de *HER-2* en células epiteliales de mama en humanos (A) (Tomado y adaptado de Zuo T. et al cell 2007).

En conclusión, este estudio demostró que FOXP3 es un supresor del cáncer de seno ligado al cromosoma X y un importante represor de los oncogenes *HER-2/ErbB*, siendo un importante hallazgo en cuanto a la función de FOXP3 en células tumorales del cáncer de seno.

3.2.2 Cáncer de páncreas

Distintos estudios han descrito que existe un incremento en la frecuencia de linfocitos Tregs en la sangre periférica (SP) y en el microambiente de diversos

tumores que incluyen adenocarcinoma de páncreas, entre otros (23,24). A nivel clínico las frecuencias elevadas de Tregs en SP de pacientes con cáncer de páncreas representan un marcador de metástasis (25). La presencia de Tregs en el microambiente tumoral y la inhibición de la maduración de células dendríticas pueden ser debidas a la secreción de TGF- β por las células tumorales, constituyendo un mecanismo adicional de evasión de la respuesta inmune (26).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, Hinz et al. (2007) (23), investigaron por primera vez si las células de adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) pueden expresar o no FOXP3 y si la expresión podría representar un mecanismo adicional de evasión de la respuesta inmune en estos pacientes. En este trabajo analizaron un total de 39 muestras mediante inmunohistoquímica empleando un anticuerpo anti-FOXP3 (clon PCH101 o el hFOXY eBioscience) y los niveles de expresión de FOXP3 detectados en las células tumorales fueron clasificados de forma arbitraria en tres grupos: expresión débil, moderada y fuerte. Los resultados mostraron que el 60% de las muestras analizadas de ADP expresaron FOXP3, con positividad a nivel de citoplasma y/o nuclear (Figura 7). Los autores discuten como en trabajos anteriores, que la localización subcelular heterogénea de FOXP3 en cáncer puede ser el resultado de distintas modificaciones post-traduccionales (19).

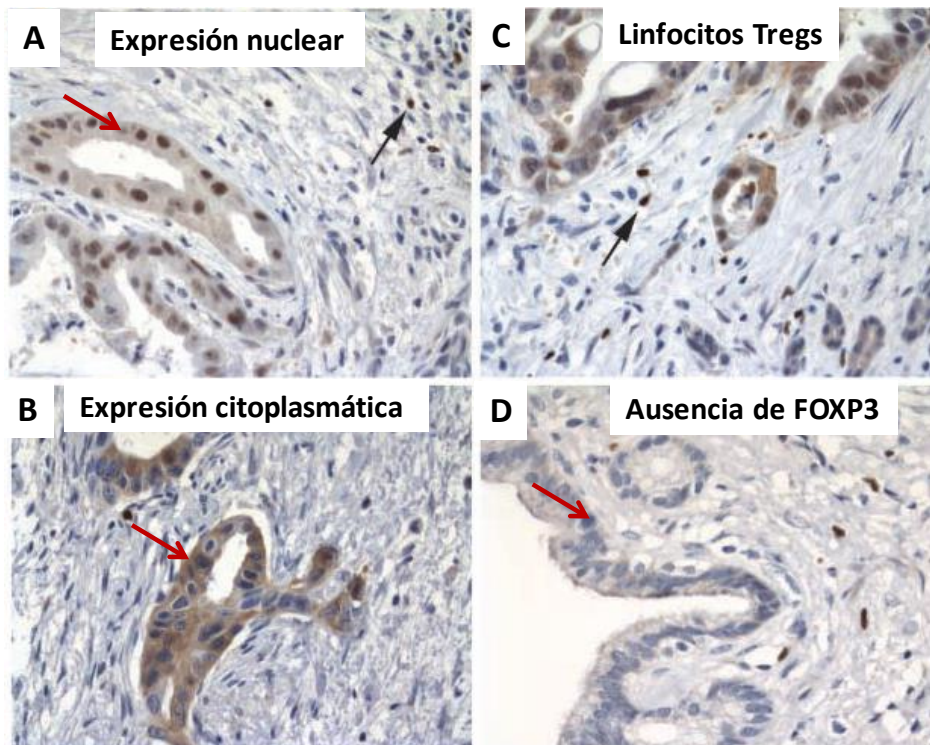


Figura 7. Localización celular de FOXP3 en ADP. Se observó presencia de FOXP3 a nivel nuclear (A) y citoplasmática (B) (flechas de color rojo). Las flechas negras indican la presencia de probables linfocitos Tregs FOXP3+ (C). En el panel D se muestra tejido peritumoral

pancreático no maligno donde no se observa la presencia de FOXP3 en células ductales (flecha roja). (Tomado y adaptado de Hinz et al, Cancer Research 2007).

En una segunda fase del estudio, evaluaron la expresión de FOXP3 mediante RT-PCR y Western-Blot en líneas celulares de carcinoma de páncreas (Panc89, Capan1, y Panc1) y analizaron si el estímulo de estas células con TGF- β 1 y TGF- β 2 recombinante puede inducir la expresión de FOXP3. Los resultados muestran que las 3 líneas celulares tienen expresión basal de FOXP3 tanto a nivel de *RNAm* (Figura 8A) como de proteína (Figura 8B). Por otra parte, al estimular las líneas celulares con TGF- β recombinante, se observó que el tratamiento específicamente con TGF- β 2 induce mayores niveles de expresión de FOXP3 en comparación con TGF- β 1 (Figura 8C y 8D), a pesar que TGF- β 1 es la molécula que se ha reportado como principal inductor de FOXP3 en células T CD4+/CD25- y en Tregs CD4+/CD25 ++ (27). De acuerdo a lo anterior, la expresión de FOXP3 en las células Panc89 tratadas con TGF- β 2 fue 13 veces mayor que en las células tratadas con TGF- β 1 (Figura 8C). Con el fin de confirmar el papel de TGF- β 2 en la inducción de FOXP3, las líneas celulares fueron incubadas con anticuerpos bloqueantes anti-TGF- β 2 encontrando que los niveles de FOXP3 se reducen de forma significativa (Figura 8C). Adicionalmente, los autores demostraron por ELISA que los sobrenadantes de cultivo de las líneas celulares de cáncer de páncreas secretan TGF- β 2, lo cual se correlacionó de forma significativa con la expresión de FOXP3.

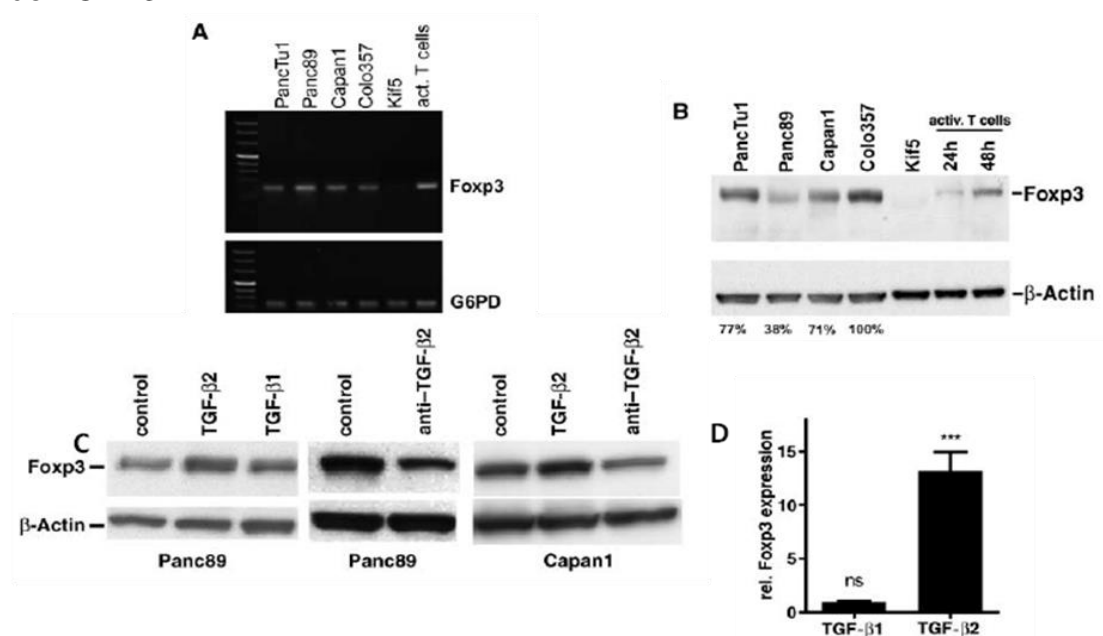


Figura 8 Expresión de Foxp3 en diferentes líneas celulares de cáncer de páncreas: detección de *RNAm* por RT-PCR (A) y detección de proteína por Western-Blot (B). Como control negativo para los dos técnicas se emplearon fibroblastos de piel (Kif5) y como control positivo emplearon linfocitos T CD4+/CD25- activados durante 24 y 48 horas con anti-CD3 y anti-CD28. Evaluación de la expresión de FOXP3 en líneas celulares tratadas con TGF- β 1 y TGF- β 2 recombinante (C

y D) o post-tratamiento con anti- TGF- β 2 (C). (Tomado y adaptado de Hinz et al, Cancer Research 2007)

El papel de FOXP3 como regulador de la transcripción de citoquinas proinflamatorias fue evaluado en la línea celular de cáncer de páncreas Panc89 bloqueando FOXP3 mediante la transfección de las células con siRNA (Figura 9A y 9B). La baja regulación de FOXP3 conlleva al incremento en los niveles de expresión de las citoquinas IL-6 (aumento de 3,8 veces) e IL-8 (aumento de 4,6 veces) (Figura 9C). Una posible explicación a la inducción de IL-6, es que en condiciones normales la expresión de IL-6 se activa por la ruta NF- κ B y FOXP3 interactúa con este factor de transcripción en Tregs, secuestrándolo y por lo tanto reprimiendo la expresión de genes que codifican para algunas citoquinas (11,28); adicionalmente la IL-8 es un factor angiogénico, cuya expresión también depende de NF- κ B (29). Otros estudios han demostrado que IL-8 promueve el crecimiento tumoral en cáncer de páncreas, sin embargo, el significado de la supresión mediada por FOXP3 de la secreción de IL-8 en estas células tumorales se desconoce.

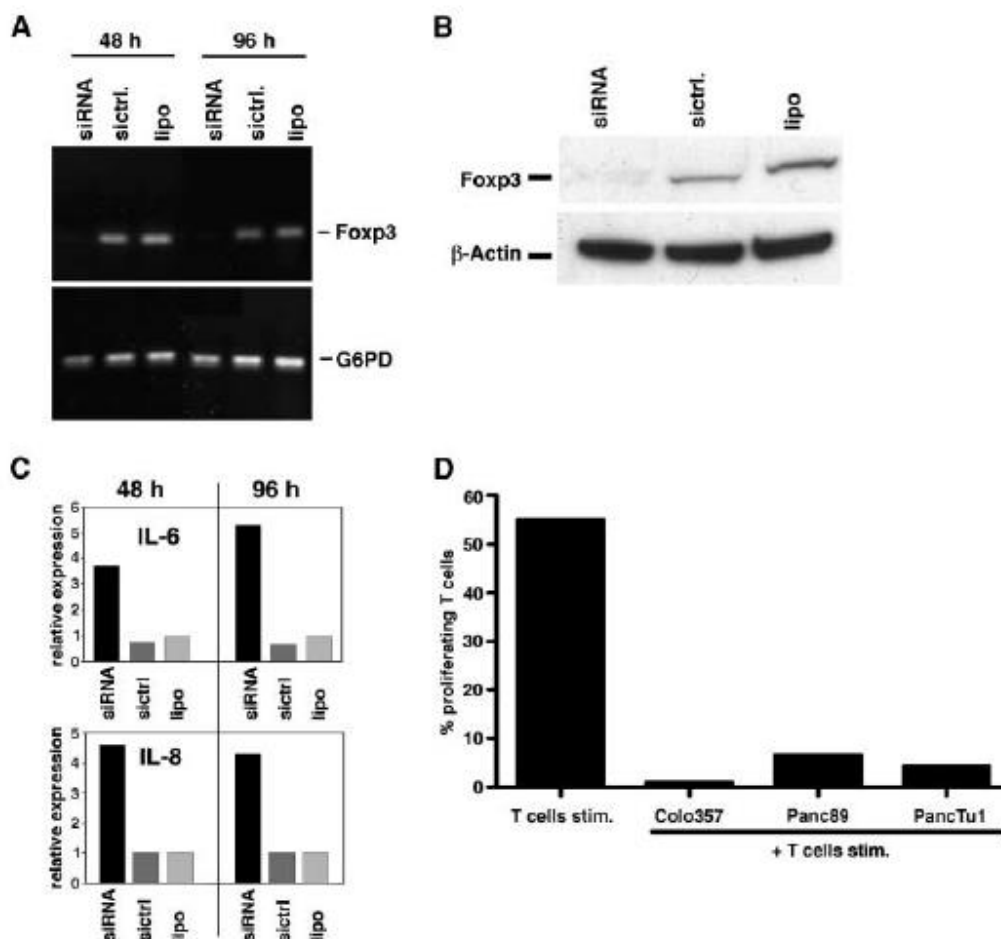


Figura 9. Consecuencias del bloqueo de la expresión de FOXP3 mediante si-RNA en células Panc89. Análisis de la expresión de FOXP3 por RT-PCR (A) y Western-Blot (B). Como control negativo para las dos técnicas las células se trataron con si-RNA control y con lipofectamina. Evaluación de los niveles de expresión de IL-6 e IL-8 por RT-PCR en células Panc89 transfectadas con siRNA contra FOXP3 (C). Proliferación de linfocitos T CD4+/CD25- en

cocultivo con células tumorales pre y post-silenciamiento de FOXP3 (D) (Tomado y adaptado de Hinz et al, Cancer Research 2007).

Por último, para evaluar el efecto de FOXP3 presente en células tumorales de cáncer de páncreas, en la activación y proliferación de linfocitos T, las líneas celulares de cáncer de páncreas con expresión intacta de FOXP3 o transfectadas con si-RNA-FOXP3 fueron cocultivadas con linfocitos T convencionales CD4+/CD25- de donantes sanos tratados previamente con carboxifluoresceína succinimidil éster (CSFE) + los estímulos anti-CD3 + anti-CD28 durante 3 días. Los resultados revelaron que las células tumorales en condición basal (FOXP3+) inhiben la proliferación T, mientras que el silenciamiento de FOXP3 induce una recuperación de la proliferación T del 28% (Figura 9D).

En conclusión este estudio, es muy importante ya que por primera vez se observa la expresión de FOXP3 en células de carcinoma pancreático y se demostró que la expresión de FOXP3 no se encuentra restringida únicamente a células y tejidos hematopoyéticos. Esta expresión en las células tumorales, puede representar un ejemplo de mimetismo molecular imitando la función de Tregs evadiendo la respuesta anti-tumoral en cáncer de páncreas. Debido a que la resistencia a la apoptosis es una característica de los tumores de páncreas, en este estudio se especula que FOXP3 pueden conferir ventajas en la supervivencia de las células tumorales y que estos resultados pueden ser útiles para diseñar nuevas estrategias de inmunoterapia.

3.2.3 Cáncer gástrico.

Debido a la evidencia del papel dual de FOXP3 como un mecanismo adicional de evasión inmune descrito previamente en el modelo de carcinoma de páncreas (23) y su papel como supresor tumoral de los oncogenes HER-2/ErbB2 (4), c-Myc (30), Skp2 (31) en cáncer de seno, algunos estudios evaluaron si FOXP3 podría influir en las rutas celulares reguladoras de crecimiento celular y apoptosis en el modelo de cáncer gástrico.

En el trabajo publicado por Ma G et al. (2013) (32), se evaluó la expresión de FOXP3 en distintas líneas celulares de cáncer gástrico (CG), mediante técnica de inmunofluorescencia y microscopía confocal encontrando que la proteína se localiza de forma simultánea en núcleo y citoplasma (Figura 10).

Con el fin de evaluar el efecto de FOXP3 en la proliferación celular y el crecimiento tumoral en ensayos de proliferación con MTT y ensayos de formación de colonias en metilcelulosa, se transfectaron las líneas celulares de CG (AGS y MKN45) con FOXP3 empleando el plásmido FOXP3-shRNA. En estos ensayos encontraron que la sobre-expresión de FOXP3 inhibe la

proliferación y retrasa el crecimiento celular tumoral en comparación con células transfectadas con el vector vacío (Figura 11A y 11B).

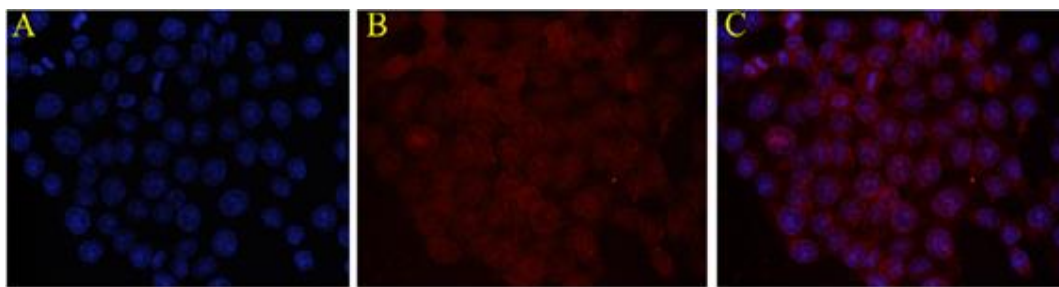


Figura 10. Localización Celular de FOXP3 en la línea celular de Cáncer Gástrico (AGS). Tinción nuclear con DAPI (color azul) (A); Tinción de FOXP3 (color rojo); “Merge” donde se demuestra co-localización de FOXP3 nuclear y citoplasmática (C). (Tomado y adaptado de Ma GF et al *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013).

Adicionalmente, analizaron el efecto de FOXP3 en la inducción de apoptosis por citometría de flujo mediante la detección de Anexina V y yoduro de propidio, observando que FOXP3 induce la acumulación significativa de células apoptóticas Anexina V+ en comparación con células transfectadas con el vector vacío (Figura 11C). A nivel funcional, la inducción de apoptosis por FOXP3 se acompaña del incremento en los niveles de expresión de las proteínas proapoptóticas PARP, caspasa 3 y caspasa 9 con disminución significativa de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y c-IAP1 demostrado mediante Western-Blot (Figura 11D).

Finalmente los autores para corroborar que FOXP3 es el responsable de los cambios en los niveles de expresión de proteínas reguladoras de la apoptosis, las líneas celulares de CG fueron transfectadas con siRNA para silenciar FOXP3, encontrando que cuando hay ausencia de FOXP3 los niveles de PARP y de caspasas disminuyen significativamente (Figura 11E).

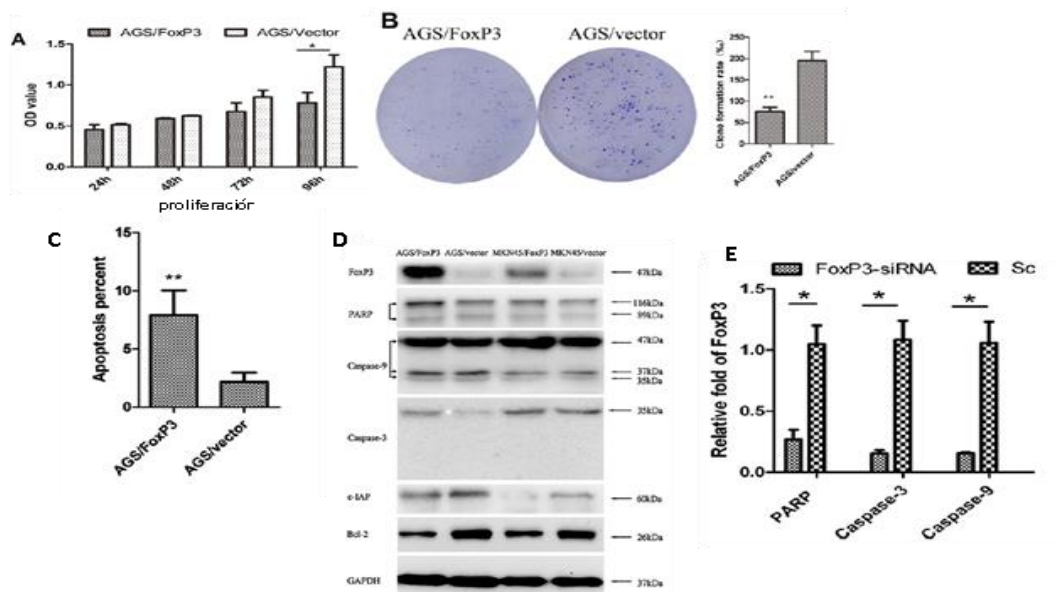


Figura 11. Regulación de proliferación (A), crecimiento (B) y apoptosis (C, D y E) por FOXP3 en Cáncer Gástrico (líneas celulares AGS y MKN45). (Tomado y adaptado de Ma GF et al *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013).

En conclusión, este estudio demuestra la regulación de vías apoptóticas celulares por FOXP3, lo cual puede representar a futuro un nuevo blanco terapéutico en cáncer gástrico.

3.2.4 Cáncer de ovario.

Existe una limitada evidencia de la expresión de FOXP3, en tejidos diferentes al timo, el bazo y ganglios linfáticos. Sin embargo, estudios recientes, han descrito la expresión de FOXP3 en células tumorales de diferentes líneas celulares, aunque en niveles variables y no relacionados con el tejido de origen. La expresión de FOXP3 se correlaciona además con los niveles de expresión de IL-10 y TGF- β 1 (3). De acuerdo con lo anterior, también se ha evidenciado el papel dual de FOXP3, como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune descrito en el modelo de cáncer de páncreas (23), y su papel como represor transcripcional del oncogén *HER2/ERBB2* (4) y *SKP2* (31) en cáncer de seno. Dado que el papel y el mecanismo molecular de FOXP3 en cáncer de ovario sigue siendo desconocido, algunos estudios han evaluado la expresión y función de FOXP3 en cáncer de ovario.

En el estudio publicado por Zhang H et al. (2010) (33), se evaluó la expresión de FOXP3 en 27 muestras de cáncer de ovario y en 7 muestras de epitelio ovárico sano, mediante inmunohistoquímica, empleando el anticuerpo anti-FOXP3 236A/E7 (eBioscience). Los resultados revelaron que la expresión de FOXP3 fue débil e incluso negativa en células de cáncer de ovario, mientras que en el epitelio ovárico sano si se observaron células Tregs que expresaban

FOXP3 (Figura 12A-12D). Además se observó la existencia de Tregs infiltrantes de tumor FOXP3+, en 1/27 muestras de cáncer de ovario (Figura 12E) y por medio de RT-PCR confirmaron los resultados obtenidos por inmunohistoquímica (Figura 12F).

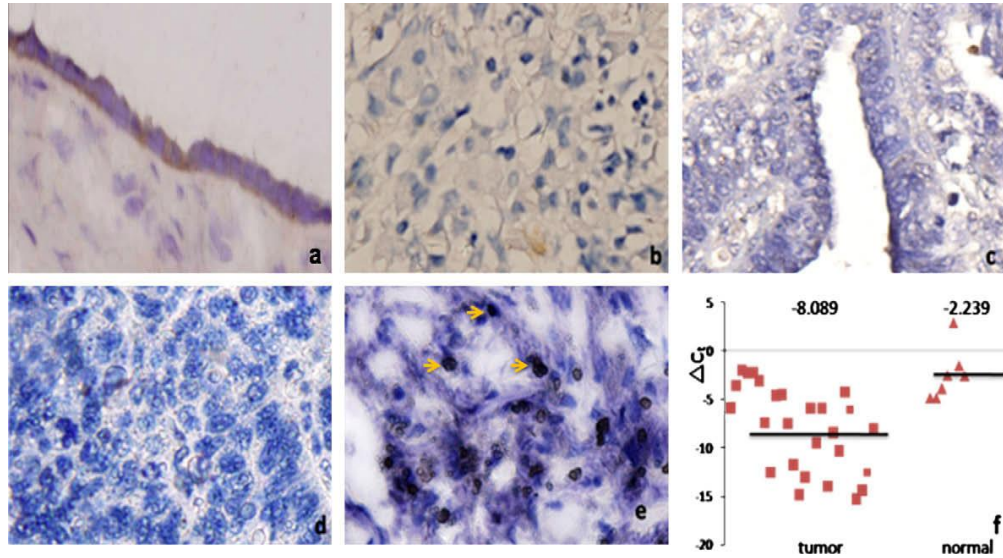


Figura 12. Expresión de FOXP3 en tejidos de cáncer de ovario y en epitelio ovárico sano (A-D). Localización citoplasmática de FOXP3 en epitelio ovárico sano (A), en las muestras de cáncer de ovario no se observaron patrones de localización citoplasmática y nuclear de FOXP3 en células de tipo seroso (B), células claras (C) y tipo mucina (D). Tregs infiltrantes en el tumor FOXP3+ (E) (flechas amarillas), niveles de expresión de FOXP3 por RT-PCR donde se evidencia mayor expresión en tejido normal (F). (Tomado y adaptado de Zhang H et al. cancer letters, 2010).

Con el propósito de evaluar si FOXP3 disminuye el crecimiento celular e inhibe el ciclo celular tal como ha sido descrito en trabajos previos, en el presente estudio utilizaron distintas líneas celulares de cáncer de ovario (SKOV3, OMC685 y ES-2), a las cuales se les detectó FOXP3 únicamente a nivel de *RNA* y no a nivel de proteína, en comparación con las células T activadas utilizadas como control positivo (Figura 13A y 13B). Luego de confirmar la expresión de FOXP3 a nivel de *RNA* pero no a nivel de proteína, se evaluó si FOXP3 puede suprimir el crecimiento tumoral mediante transfección de las líneas SKOV3 empleando los vectores FOXP3 ADNc y vectores vacíos (Figura 13B). En este ensayo se encontró que las células que habían sido transfectadas con el vector vacío no mostraron alteración en el crecimiento celular, a diferencia de las células transfectadas con FOXP3 que presentaron un crecimiento lento (Figura 14A). Además realizaron ensayos de proliferación con MTT, en los que observaron que las células transfectadas con FOXP3 proliferaban menos en comparación con las células transfectadas con el vector vacío (Figura 14B).

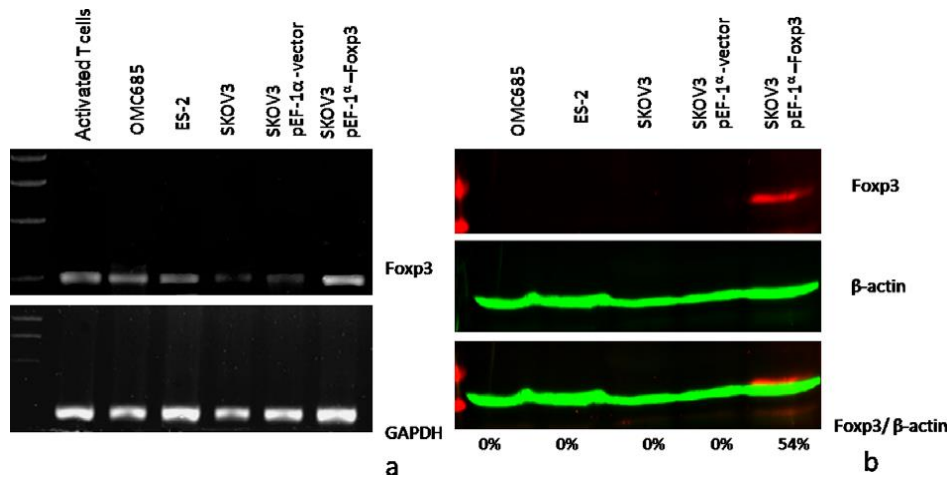


Figura 13. Análisis de la expresión de FOXP3 por RT-PCR (a) y Cell Western-Blot (revelado por fluorescencia) (B) en diferentes líneas celulares de cáncer de ovario. Como control positivo emplearon células T activadas. Sólo se evidencia expresión de FOXP3 a nivel de proteína en las células SKOV3 transfectadas (Tomado y adaptado de Zhang H et al. cancer letters, 2010).

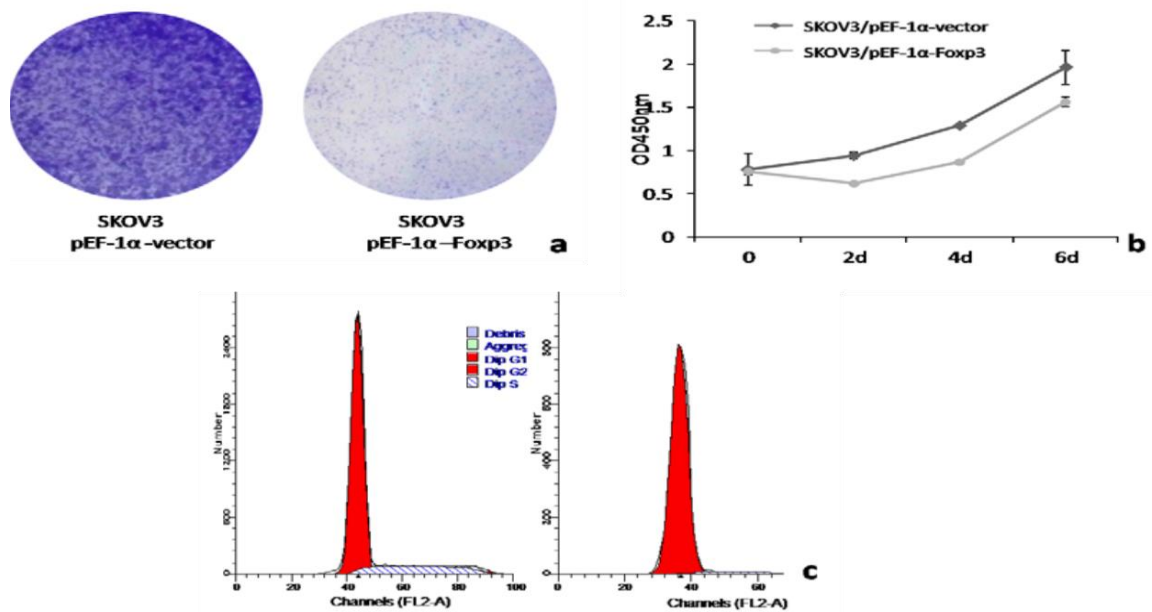


Figura 14. Regulación de crecimiento (ensayo de formación de clones) (A), proliferación (MTT) (B), y ciclo celular (marcaje con yoduro de propidio) (C) por FOXP3 en líneas celulares de cáncer de ovario. (Tomado y adaptado de Zhang H et al. cancer letters, 2010).

El análisis del ciclo celular mostró que la sobre-expresión de FOXP3, causó una acumulación significativa de células en fase G0-G1, con una disminución de células en fase G2-S (Figura 14C) y por Western-Blot se detectó que la sobre-regulación de FOXP3, inhibe los niveles de proteínas asociadas a proliferación celular como Ki-67 y quinasas dependientes de ciclina (CDK), lo cual se correlacionó con la detención del ciclo celular y la supresión de la proliferación. También se detectó una reducción en la expresión de moléculas

involucradas en procesos de metástasis como, la metaloproteinasa de matriz-2 (MMP-2) y el activador tisular del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) lo que sugirió que FOXP3 tiene un potencial anti-metastásico. Por último, evaluaron el mecanismo de FOXP3, en varias vías de señalización por medio de Western-Blot, donde observaron que FOXP3 inhibe la activación de rutas implicadas en progresión tumoral como mTOR y NF-KB sin tener efecto sobre la ruta PI3K/AKT y ERK1/2.

Estos hallazgos sugieren que la sobre-regulación de FOXP3 podría tener un papel anti-tumoral y anti-metastásico en cáncer de ovario. Lo que podría resultar en una nueva alternativa terapéutica enfocado en la inhibición del crecimiento celular, la migración e invasión de cáncer de ovario.

3.2.5 Tumores de origen hematológico.

Se ha documentado recientemente, que las células tumorales de leucemia/linfoma T del adulto (LLTA), expresan el receptor de quimiocina CCR4 (molécula inducida por FOXP3) (34) y comparten el mismo fenotipo de las células Tregs CD4+ CD25++ (35). Dado que las Tregs tienen una actividad supresora de la respuesta inmune pueden llegar a favorecer el desarrollo y progresión de tumores malignos (36,37). FOXP3, GITR y CTLA-4, son algunas de las moléculas que se expresan de forma abundante en las células Tregs (38). Varios estudios han postulado la asociación entre las células LLTA con las células Tregs, debido a que el fenotipo tumoral es similar al fenotipo de las Tregs y además porque los pacientes con este tumor en las fases más agresivas cursan con marcada inmunodeficiencia. La expresión de FOXP3 ha sido detectada en niveles variables en células LLTA y su expresión se correlaciona con la presencia de las moléculas GITR y CTLA-4 (39,40). También, se ha descrito que algunas células de LLTA presentan funciones supresoras. Sin embargo, sigue siendo polémico si estas células a nivel funcional actúan de la misma manera que las Tregs.

Teniendo presente estos antecedentes, Shimauchi T et al (2007) (41), investigaron la relación entre la expresión de CTLA-4 y FOXP3 en células tumorales de LLTA, su función reguladora y su importancia clínica en 21 pacientes (rango de edad: 41-88 años) con enfermedad en fase aguda (enfermedad agresiva) o latente (menos agresiva) y como control analizaron 8 individuos sanos. La evaluación de estas moléculas en conjunto con CD25 y CCR4 fue realizada mediante citometría de flujo e inmunohistoquímica. De manera similar que reportes anteriores (42), encuentran que el porcentaje de células T tumorales CD4+/CD25++/CCR4+ fue mayor en pacientes con LLTA en comparación con los voluntarios sanos (Figura 15A y 15B). Además en 2 y 3 pacientes se observó expresión elevada de CTLA-4 y FOXP3, respectivamente (Figura 15C y 15D). Es importante resaltar que en 4 de 5 pacientes con

metástasis en piel, las células tumorales expresaban altos niveles de CTLA-4 y de FOXP3 en comparación con las células tumorales circulantes, hallazgo que sugiere que el microambiente tumoral puede modular la expresión de estas moléculas.

Por medio de inmunohistoquímica, analizaron la expresión de CTLA-4 en 11 muestras, encontrando que las células tumorales de 6 pacientes (54%), presentaban una aparente inmunoreactividad para esta molécula en comparación con el control de isotipo. A nivel funcional, al estimular las células T CD4+CD25++ de 8 pacientes con LLTA y 3 individuos sanos, con anti-CD3 y anti-CD28, se observaron mayores niveles de expresión de CTLA-4 en las células de los pacientes en comparación con los individuos sanos en respuesta al estímulo. En este caso la expresión de CTLA-4 no es una molécula de células Tregs pero sí es un marcador de activación en células LLTA.

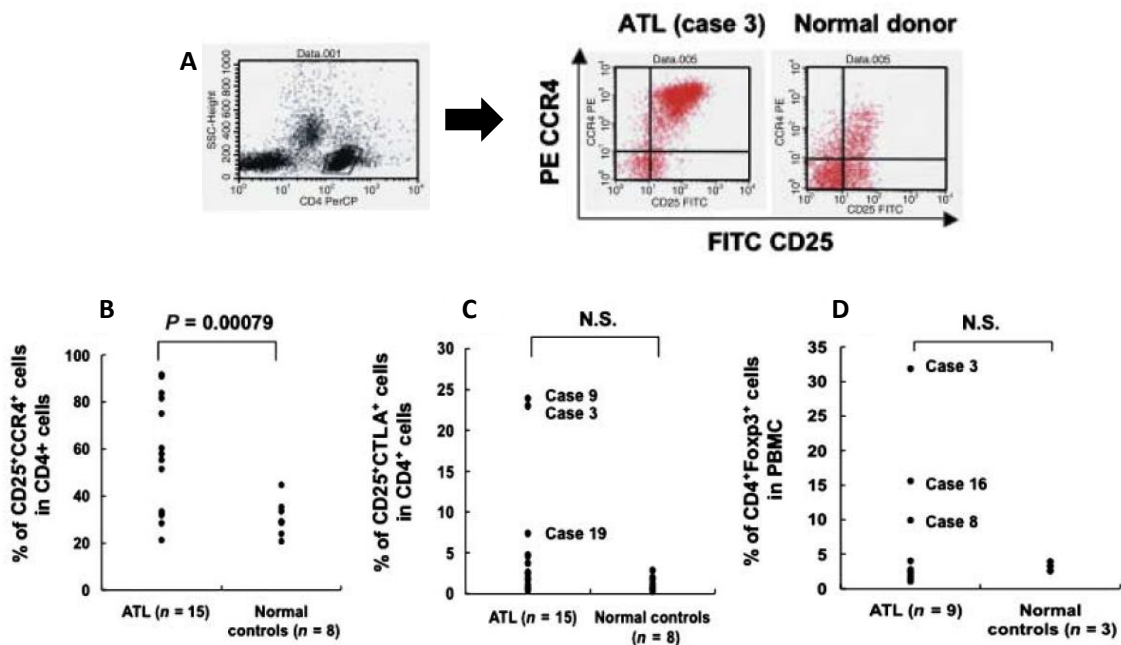


Figura 15. Cuantificación de células T CD4+ de LLTA y de individuos sanos que expresan CD25/CCR4 (A y B), CD25/CTLA-4 (C) y FOXP3 (D) mediante citometría de flujo. Las figuras muestran claramente que los pacientes con LLTA tienen mayores frecuencias de células T CD4+ que co-expresan CD25 y CCR4 y en algunos pacientes mayor expresión de CTLA-4 y FOXP3. (Tomado y adaptado de Shimauchi T et al, Cancer Sci 2008).

Con el fin de evaluar la función reguladora de las células LLTA sobre linfocitos T CD8+ y CD4+ autólogos, se aislaron las células CD4+/CD25++ de SP y lesiones cutáneas de los pacientes con LLTA y se cocultivaron con linfocitos T CD8+ y CD4+ (reacción mixta de leucocitos) estimulados con mitomicina C. Para evaluar la proliferación de los linfocitos T CD8+ y CD4+ se midió la incorporación de timidina- H^3 por espectroscopia de centelleo líquido. Como control positivo de inhibición de la proliferación, cocultivaron células Tregs CD4+/CD25++ con linfocitos T. Los resultados mostraron que las células

tumorales CD4+/CD25++ a pesar de expresar altos niveles de CTLA-4 y FOXP3 no fueron capaces de suprimir la proliferación de los linfocitos T autólogos (Figura 16), lo que contradice la hipótesis que las células de LLTA a nivel funcional se comportan como Tregs. Por el contrario, las Tregs como era de esperarse inhibían de forma significativa la proliferación de las células T.

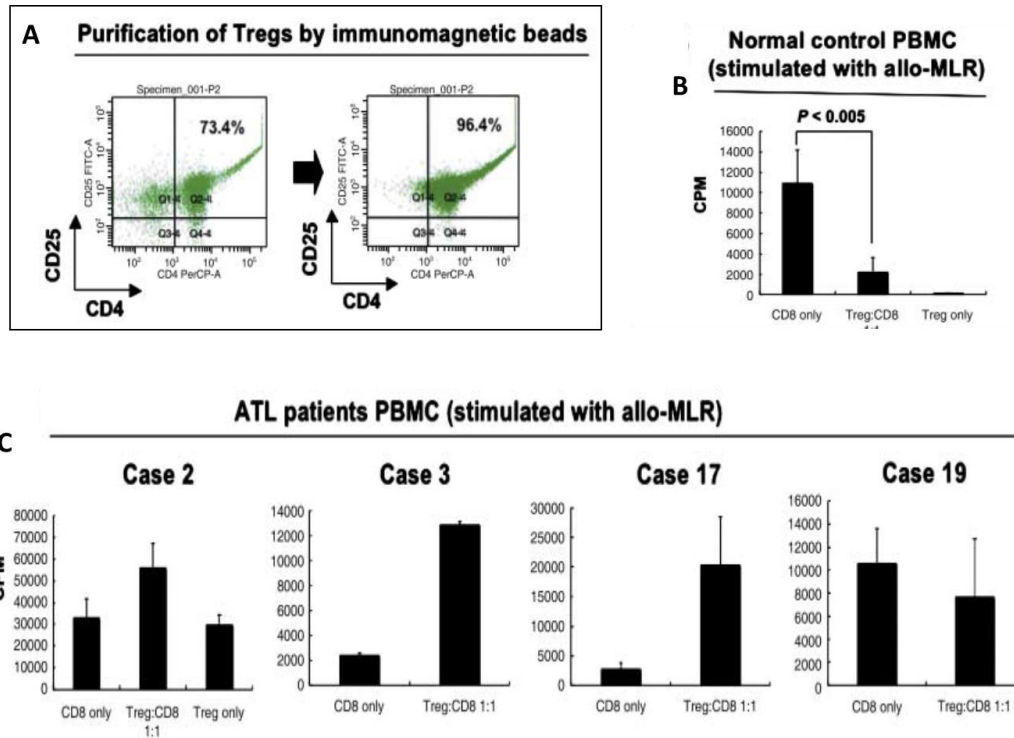


Figura 16. Función reguladora de las células LLTA circulantes. Células CD4+CD25++ aisladas con perlas magnéticas (A), células normales Tregs CD4+CD25++ suprimen la proliferación de células T CD8+ alo-estimuladas (B), células LLTA CD4+CD25+ no suprimen la proliferación de las células T CD8+ (C). (Tomado y adaptado de Shimauchi T et al, Cancer Sci 2008).

Los autores discuten que desde el punto de la inmunología tumoral, los resultados sugieren que el estado de inmunodeficiencia que presentan los pacientes no depende de la actividad supresora de las células tumorales sino que puede estar asociada por ejemplo a la infección por HTLV-I y las diferencias respecto a otros trabajos (43,44), pueden ser debidas a los subtipos clínicos de LLTA que se evaluaron.

De forma similar, en el trabajo de Karube et al. (2008) (45), evaluaron la expresión de FOXP3 en células de LLTA y su asociación con las características clínico-patológicas de la enfermedad. En primer lugar, analizaron la expresión de FOXP3 mediante inmunohistoquímica, empleando el anticuerpo anti-FOXP3 (eBioscience), en 169 casos de LLTA, encontrando que 60 (36%) eran FOXP3+ con un punto de corte de positividad $\geq 30\%$ (Figura 17).

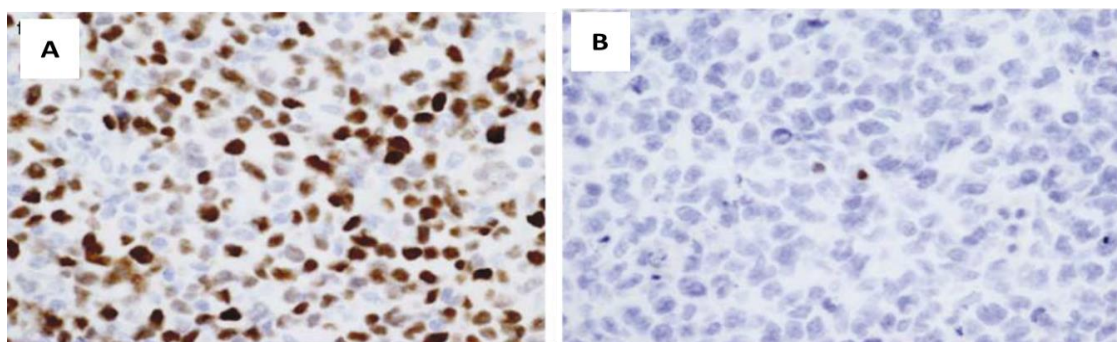


Figura 17. Expresión de FOXP3 en células LLTA. (a) Ejemplo representativo de un caso con 70% de positividad para FOXP3 en las células tumorales, (b) Ejemplo representativo de un caso FOXP3- (Tomado y adaptado de Karube K et al, *Modern Pathology* 2008).

En una segunda fase del estudio, analizaron otros marcadores fenotípicos encontrando que las células tumorales fueron positivas principalmente para CD4 y CD25 en el 83% de los casos.

Con el fin de buscar asociación con otras variables clínicas y biológicas, evaluaron la presencia de infección por Epstein-Barr (VEB) en las células tumorales por hibridación *in situ* y compararon la frecuencia de infección entre los casos FOXP3+ y FOXP3-. Los autores reportan una frecuencia de infección por VEB en el 38% de los casos FOXP3+ y del 11% en los FOXP3- ($p < 0.001$). Estos hallazgos sugieren que las células tumorales FOXP3+/VEB+ pueden mostrar un mayor efecto supresor de la respuesta inmune en estos pacientes.

A pesar de estos hallazgos, clínicamente no se encontraron diferencias significativas entre los casos FOXP3+ y FOXP3- en cuanto a la edad al momento del diagnóstico, la respuesta al tratamiento, niveles de LDH, estadios clínicos, compromiso extranodal, supervivencia global, etc. (Figura 18). Sin embargo, estudios anteriores (46) si reportan que los casos LLTA FOXP3+ presentan un curso clínico más agresivo y recalcan que las células LLTA FOXP3+, pueden suprimir la inmunidad anti-tumoral promoviendo el crecimiento del tumor, y otros factores que pueden influir en el pronóstico como edad menor en el momento del diagnóstico y tratamiento con trasplante de células madre, podría compensar algunas desventajas como el estado de inmunodeficiencia.

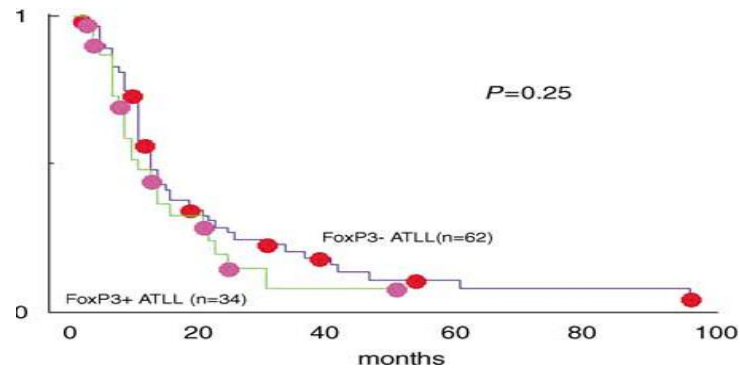


Figura 18. Supervivencia global de los 96 casos analizados. No se observaron diferencias significativa en la supervivencia global de los pacientes al comparar los casos FOXP3- y FOXP3+ (Tomado y adaptado de Karube K et al, *Modern Pathology* 2008).

Por último, el análisis citogenético reveló que los casos FOXP3- tenían mayor frecuencia de aneuploidía de DNA y otras anomalías cromosómicas que los casos FOXP3+. En las muestras analizadas, se detectaron cariotipos normales o anomalías simples en el momento del diagnóstico, mientras que los cariotipos complejos aparecían principalmente en el momento de la recaída. Estos resultados son compatibles con la hipótesis que la carcinogénesis de LLTA presenta diversas etapas. Por lo tanto la aparición de simples anomalías citogenéticas en los casos FOXP3+, pueden indicar una fase temprana de la carcinogénesis, lo que implica que la expresión de FOXP3 se pierde a medida que la enfermedad avanza.

En conclusión, la asociación entre la expresión de FOXP3 y el estado de inmunosupresión es variable en la literatura en relación a esta enfermedad. Sin embargo, si podría estar asociada a la mayor frecuencia de infección por VEB-positivas en células tumorales en tejidos infiltrados y con menor frecuencia de cambios citogenéticos. Estos hallazgos revelan que la expresión de FOXP3 refleja funciones biológicas distintas en LLTA.

Debido a que estudios anteriores se habían centrado únicamente en la expresión de FOXP3 en células T, tanto normales como tumorales en especial las células LLTA. Yamamoto M et al, en 2008 (47), evaluaron los patrones de expresión de FOXP3 en distintas líneas celulares hematopoyéticas T y de origen no T.

En primer lugar, evaluaron la expresión FOXP3 a nivel de *RNAm* por RT-PCR en un total de 111 líneas celulares. Las líneas celulares T se agruparon en líneas celulares infectadas por HTLV-I y líneas no infectadas. Las líneas celulares no T, se clasificaron en líneas B, plasmocitoides, mieloides, monocíticas, megacariocíticas, eritroides y NK. Como controles normales utilizaron células Tregs y células T convencionales. Los resultados revelaron que las líneas celulares HTLV-I+, presentaban una expresión de FOXP3

relativamente alta, en comparación con las líneas celulares T HTLV-I negativas o las líneas celulares no T (Figura 19). Estos hallazgos confirman que la expresión de FOXP3 no se limita únicamente al linaje T.

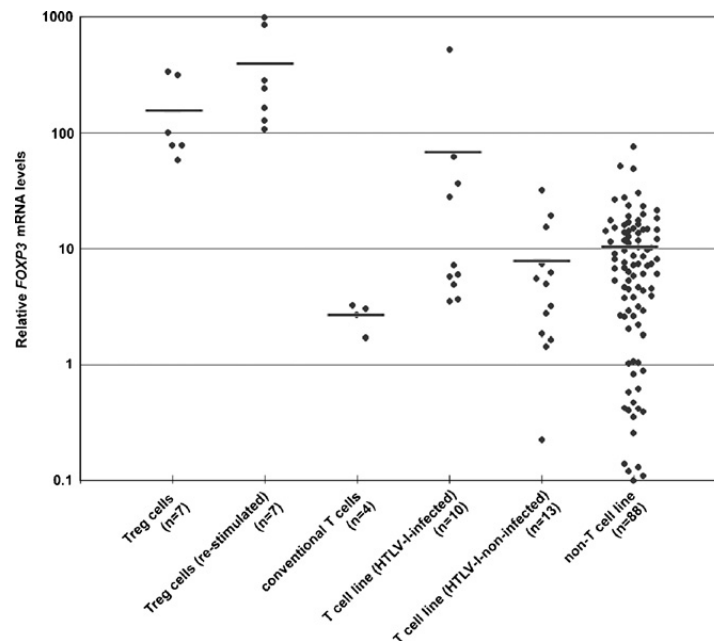


Figura 19. Análisis cuantitativo de la expresión de FOXP3 RNAm por RT-PCR en distintas líneas celulares de origen hematopoyético. Analizaron las células Treg y las células T convencionales como control positivo y todas las líneas celulares expresaron niveles variables de RNAm (Tomado y adaptado de Yamamoto M et al *Leukemia Research* 2008).

En una segunda fase del estudio, analizaron la expresión de FOXP3 en estas líneas por Western-Blot. Los resultados mostraron que la proteína FOXP3 fue detectada sólo en tres líneas celulares T (ATL-16T, ATL-35T, y MT-2) con altos niveles de RNAm. Las otras líneas T, incluyendo aquellas que presentaron mayor expresión de RNAm, fueron negativas para la expresión de la proteína. Los autores discuten que la discordancia entre la expresión de RNAm de FOXP3 y los niveles de proteína, se debe a los mecanismos de control post-transcripcional o a que el RNAm no sea un RNA codificante.

Con el fin de evaluar si existía una correlación entre la expresión de la proteína FOXP3 con otros marcadores de células Treg, evaluaron los niveles de expresión de CD4, CD25, GITR, y CTLA-4 y observaron que las 3 líneas que expresaron la proteína, también fueron positivas para CD4, CD25, GITR, y CTLA-4, lo que podría indicar una correlación entre la expresión de la proteína FOXP3 y estos marcadores asociados a Tregs.

Adicionalmente, también confirmaron la expresión de FOXP3 por citometría de flujo, en paralelo con doble tinción para CD4 y CD25. La línea celular ATL-16T, presentó una alta expresión de FOXP3 y CD25 (98,6%), sin ningún tipo de

estimulación y el nivel de expresión fue comparable con el de las células Tregs estimuladas (figura 20).

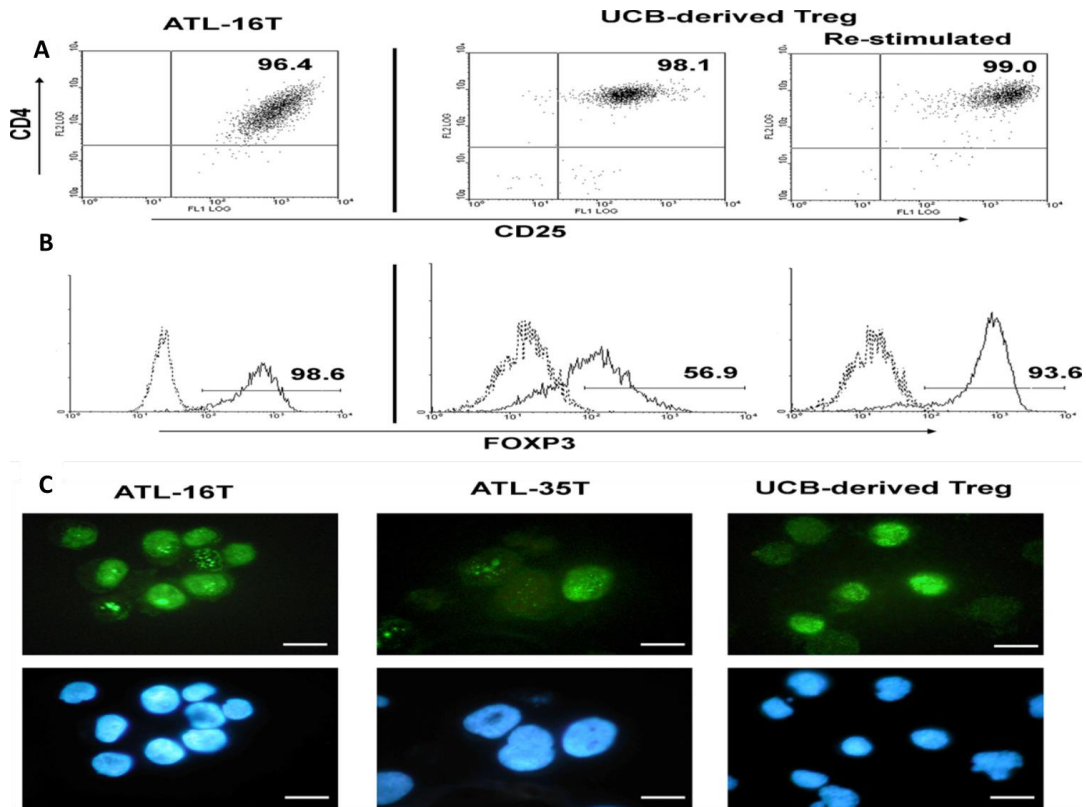


Figura 20. Detección de FOXP3 por citometría de flujo e inmunofluorescencia. Expresión de CD25 y CD4, en la línea celular ATL-16T y células Treg derivadas de cordón umbilical y estimuladas que fueron usadas como control positivo (A), detección por citometría de FOXP3 en la línea celular ATL-16T (B). Detección de FOXP3 por inmunofluorescencia en las líneas celulares ATL-16T y ATL-35T y células Tregs sin estimular. Se tiñeron con anti-FOXP3 seguido de anti-IgG de ratón conjugada con FITC (panel superior). Los núcleos se contra-tiñeron con el colorante Hoechst 33258 (panel inferior) (Tomado y adaptado de Yamamoto M et al *Leukemia Research* 2008).

Estos resultados sugieren que la regulación de la expresión de FOXP3 en células de diferente origen puede depender de mecanismos de regulación post-transcripcional o también puede depender de las señales o estímulos que las células reciben en el microambiente en el que se encuentran en condiciones normales o en condiciones patológicas. Se requieren de más estudios que evalúen la asociación entre FOXP3 y el pronóstico de otros tumores hematológicos más frecuentes como leucemia linfocítica aguda.

3.3 Tabla resumen del papel de FOXP3 en células tumorales.

Autor y año	Tumores evaluados	Metodología empleada para la detección de FOXP3	Resultado relevante	Implicación en el pronóstico
Merlo A, et al 2009.	Cáncer de seno. Dos grupos: Milan 3: n (183) Milan 1: n (214)	Inmunohistoquímica empleando el clon PCH101 (eBioscience)	57% y el 73% de las muestras del grupo Milan 1 y Milan 2 expresaron FOXP3.	La expresión de FOXP3 se asoció con menor supervivencia global, metástasis y positividad para Ki67
T. zuo, et al 2007.	Cáncer de seno.	Inmunohistoquímica	El 80% de las muestras de tejidos normales expresaron FOXP3 y sólo el 20% de los tejidos tumorales analizados expresaron FOXP3 a nivel nuclear.	La baja expresión de FOXP3 se asoció a un peor pronóstico del cancer de mama, ya que FOXP3 es un gen represor del oncogen <i>HER-2/ErbB2</i>
Hinze et al 2007.	Cáncer de páncreas. (n=39)	Inmunohistoquímica empleando el anticuerpo anti-FOXP3 (clon PCH101 o el hFOXY eBioscience) RT-PCR Western-Blot	60% de las muestras analizadas expresaron FOXP3, con positividad a nivel de citoplasma, y/o nuclear	No se encontró una correlación significativa entre la expresión de FOXP3 en la células tumorales y el pronóstico de la enfermedad.
Zhang H et al, 2010.	Cáncer de ovario (n=27)	Inmunohistoquímica, empleando el anticuerpo anti-FOXP3 236A/E7 (eBioscience).	La expresión de FOXP3 fue débil e incluso negativa en células tumorales.	La alta expresión de FOXP3 se asoció con actividad anti-tumoral y anti-metastásica.
Ma G et al, 2013.	Líneas celulares de cáncer gástrico (CG) (n=2)	Inmunofluorescencia y microscopía confocal	La expresión de FOXP3 en las líneas celulares de (CG) se localiza de forma simultánea en núcleo y citoplasma.	la regulación de vías apoptóticas celulares por FOXP3, puede representar un nuevo blanco terapéutico en cáncer gástrico favoreciendo el pronóstico.

Shimauchi T, et al 2007.	LLTA (n= 21)	Citometría de flujo Inmunohistoquímica Anticuerpo anti-FOXP3 (PCH101). eBioscience	4 casos expresaron FOXP3 de manera significativa.	La expresión de FOXP3 se asocia con metástasis en piel, lo que sugiere que el microambiente tumoral puede modular la expresión de estas moléculas.
Yamamoto M et al 2008.	LLTA Líneas celulares hematopoyéticas T y de origen no T. (n=111)	RT-PCR Western- Blot. Inmunohistoquímica Empleando anti-FOXP3 seguido de anti-IgG de ratón conjugada con FITC)	Sólo 3 líneas de células T (HTLV-I) expresaron FOXP3 a nivel de <i>RNAm</i> y proteína	La expresión de FOXP3 se asoció principalmente a HTLV-I+. Se requieren de más estudios que evalúen la asociación entre FOXP3 y el pronóstico de otros tumores hematológicos.
Karube K et al 2008.	LLTA (n=169)	Inmunohistoquímica Empleando anticuerpo anti-FOXP3 (eBioscience)	El 36% de los casos expresó FOXP3+	La expresión de FOXP3+ fue asociada a infección por VEB-positivas en células tumorales en tejidos infiltrados y con menor frecuencia de cambios citogenéticos. No hubo diferencias significativa en la supervivencia global de los pacientes al comparar los casos FOXP3- y FOXP3+

4. CONCLUSIONES

1. El papel de FOXP3 en cáncer de seno, sigue siendo contradictorio, en el estudio de Merlo A, et al. la expresión de FOXP3 se asoció con menor supervivencia global, metástasis y positividad para Ki67, a diferencia del estudio de T. zuo et al. que muestra que FOXP3 actúa como un represor de oncogenes, favoreciendo el mejor pronóstico de la enfermedad.
2. En cáncer de páncreas la expresión de FOXP3 en las células tumorales, puede representar un nuevo mecanismo de evasión de la respuesta anti-tumoral asociándose a un peor pronóstico de la enfermedad.
3. En cáncer de gástrico y cáncer de seno la sobre-expresión de FOXP3 podría tener un papel anti-tumoral y anti-metastásico. De forma similar, en el modelo de cáncer de ovario la presencia de FOXP3 inhibe el crecimiento tumoral lo cual podría resultar en nuevas alternativas terapéuticas.
4. En LLTA, los estudios reportados muestran distintos papeles y asociaciones de la expresión de FOXP3 con el estado de inmunosupresión de los pacientes, reportando en algunos trabajos inhibición de la proliferación de linfocitos T CD4+ y CD8+, la asociación con mayor frecuencia de infección por VEB en células tumorales y de forma contradictoria con menor frecuencia de alteraciones citogenéticas a nivel tumoral. Sin embargo aclaran que el estado de inmunodeficiencia que presentan los pacientes puede estar regulado principalmente por la infección por HTLV-I y no sólo a la expresión de FOXP3.
5. El efecto modulador de FOXP3 en distintos modelos tumorales y líneas celulares puede depender del origen tumoral, de las vías de señalización activadas en el tumor y de la interacción directa o indirecta del tumor con el microambiente. No existe un consenso claro en los distintos estudios sobre el papel de FOXP3 en el pronóstico de las enfermedades reportadas.

6. BIBLIOGRAFÍA:

1. Coffey PJ, Burgering BM. Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. *Nature Reviews Immunology* 2004;4:889-899.
2. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor FOXP3. *Science* 2003;299:1057–1061.
3. Karanikas V, Speletas M, Zamanakou M. FOXP3 expression in human cancer cells. *Journal of Translational Medicine* 2008;6:19-26.
4. Zuo T, Wang L.Z, Morrison C. FOXP3 is an X-linked breast cancer suppressor gene and an important repressor of the *HER-2/ErbB2* oncogene. *Cell* 2007;129:1275–1286.
5. Hori S, Sakaguchi S. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes and Infection* 2004;6:745-751.
6. Allan SE, Passerini L, Bacchetta R, Crellin N, Dai M, Orban PC. The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4+ Tregs. *The Journal of Clinical Investigation* 2005;115:3276–3284.
7. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual Review Of Immunology* 2004;22:531-562.
8. Sakaguchi S. Naturally arising FOXP3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature Immunology* 2005;6:345–352.
9. Martin F, Ladoire S, Mignot G, Apetoh L, Ghiringhelli F. Human FOXP3 and cancer. *Oncogene* 2010 ;29: 4121–4129.
10. Shenghui Z, Yixiang H, Jianbo W, Kang Y, Laixi B, Yan Z, Xi X. Elevated frequencies of CD4⁺CD25⁺CD127^{lo} regulatory T cells is associated to poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *International Journal of Cancer* 2011;129: 1373-1381.
11. Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. FOXP3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-κB to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102:5138-5143.

12. Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor FOXP3. *Nature Reviews Immunology* 2005;6:331-337.
13. Ochs HD, Ziegler SF, Torgerson TR. FOXP3 acts as a rheostat of the immune response. *Immunological Reviews* 2005 203:156-164.
14. Huehn J, Polansky JK, Hamann A. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage?. *Nature Reviews Immunology* 2009;9:83-89.
15. Rudensky AY, Gavin M, Zheng Y. FOXP3 and NFAT: partners in tolerance. *Cell* 2006;126:253-256.
16. Hailing Lu. FOXP3 Expression and Prognosis: Role of Both the Tumor and T Cells. *Journal of Clinical Oncology* 2009;27:1735-1736.
17. Strauss L, Bergmann C, Szczepanski M. A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment. *Clinical Cancer Research* 2007;13:4345-4354.
18. Larmonier N, Marron M, Zeng Y. Tumor derived CD4(+)CD25(+) regulatory T cell suppression of dendritic cell function involves TGF-beta and IL-10. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56:48-59.
19. Merlo A, Casalini P, Carcangiu ML. FOXP3 expression and overall survival in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27:1746-1752.
20. Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD. FOXP3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 2007;445:771-775.
21. Kodama J, Hasengaowa, Kusumoto T. Association of CXCR4 and CCR7 chemokine receptor expression and lymph node metastasis in human cervical cancer. *Annals of Oncology* 2007;18:70-76.
22. Paik S, Shak S, Tang G. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *The New England Journal of Medicine* 2004; 351: 2817-2826.
23. Hinz S, Pagerols-Raluy L, Oberg HH. FOXP3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer. *Cancer Research* 2007; 67:8344-8350.

24. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *Journal of Immunological* 2002;169:2756–2761.
25. Ikemoto T, Yamaguchi T, Morine Y. Clinical roles of increased populations of Foxp3+CD4+ T cells in peripheral blood from advanced pancreatic cancer patients. *Pancreas* 2006;33:386–390.
26. Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF- β -secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *Journal of Experimental Medicine* 2005;7:919–929.
27. Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGF- β induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through FOXP3 induction and down-regulation of Smad 7. *Journal of Immunological* 2004;172:5149–5153.
28. Libermann TA, Baltimore D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF- κ B transcription factor. *Molecular Cell Biology* 1990;10:2327–2334.
29. Xiong HQ, Abbruzzese JL, Lin E, Wang L, Zheng L, Xie K. NF- κ B activity blockade impairs the angiogenic potential of human pancreatic cancer cells. *International Journal of Clinical Oncology* 2004;108:181–188.
30. Wang L, Liu R, Li W. Somatic single hits inactivate the X-linked tumor suppressor FOXP3 in the prostate. *Cancer Cell* 2009;16:336–346.
31. Zuo T, R.H. Liu, H.M. Zhang. FOXP3 is a novel transcriptional repressor for the breast cancer oncogene *SKP2*. *Journal of Clinical Investigation* 2007;117:3765–3773.
32. Ma G, Chen S, Sun Z, Miao Q, Liu Y, Zeng X, Luo T, Li-Li Mab, Jing-Jing Lian J, Song D. FOXP3 inhibits proliferation and induces apoptosis of gastric cancer cells by activating the apoptotic signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013;430:804–809.
33. Zhang H, Sun H. Up-regulation of Foxp3 inhibits cell proliferation, migration and invasion in epithelial ovarian cancer. *Cancer Letters* 2010;287:91–97.
34. Iellem A, Mariani M, Lang R et al. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4+CD25+ regulatory T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 2001;194:847–853.

35. Viguier M, Lemaître F, Verola O et al. Foxp3 expressing CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *Journal of Immunology* 2004;173:1444–1453.
36. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057–1061.
37. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nature Immunology* 2002;3:135–142.
38. Sansom DM, Manzotti CN, Zheng Y. What's the difference between CD80 and CD86?. *Trends in Immunology* 2003;24:314–319.
39. Ishida T, Iida S, Akatsuka Y et al. The CC chemokine receptor 4 as a novel specific molecular target for immunotherapy in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Clinical Cancer Research* 2004;15:7529–7539.
40. Walsh PT, Benoit BM, Wysocka M, Dalton NM, Turka LA, Rook AH. A role for regulatory T cells in cutaneous T-cell lymphoma; induction of a CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cell phenotype associated with HTLV-I infection. *Journal of Investigative Dermatology* 2006;126:690–702.
41. Shimauchi T, Kabashima K, Tokura Y. Adult T-cell leukemia/lymphoma cells from blood and skin tumors express cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 and Foxp3 but lack suppressor activity toward autologous CD8⁺ T cells. *Cancer science* 2008;99:98-106.
42. Yoshie O, Fujisawa R, Nakayama T et al. Frequent expression of CCR4 in adult T-cell leukemia and human T-cell leukemia virus type 1-transformed T cells. *Blood* 2002;99:1505–1511.
43. Kohno T, Yamada Y, Akamatsu N. Possible origin of adult T-cell leukemia/lymphoma cells from human T lymphotropic virus type-1-infected regulatory T cells. *Cancer science* 2005;96:527–533.
44. Chen S, Ishii N, Ine S. Regulatory T cell-like activity of Foxp3⁺ adult T cell leukemia cells. *International Immunology* 2006;18:269–277.
45. Karube K, Aoki R, Sugita Y, Yoshida S, Nomura Y, Shimizu K, Kimura Y, Hashikawa K, Takeshita M, Suzumiya J, Utsunomiya A, Kikuchi M and Ohshima K. The relationship of FOXP3 expression and clinicopathological

characteristics in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Modern Pathology* 2008;21:617–625.

46. Takeshita M, Akamatsu M, Ohshima K, et al. CD30 (Ki-1) expression in adult T-cell leukaemia/lymphoma is associated with distinctive immunohistological and clinical characteristics. *Histopathology* 1995;26:539–546.

47. Yamamotoa M, Tsuji-Takayama K, Suzuki M, Harashima A, Sugimoto A, Motodaa R, Yamasaki F, Nakamura S, Kibata M. Comprehensive analysis of *FOXP3* mRNA expression in leukemia and transformed cell lines. *Leukemia Research* 2008;32:651-658.