Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Efecto del antiinflamatorio no esteroideo indometacina sobre las células mieloides supresoras en microambientes inflamatorios normales y tumorales

Blidner, Ada G.

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Blidner, Ada G.. (2012). Efecto del antiinflamatorio no esteroideo indometacina sobre las células mieloides supresoras en microambientes inflamatorios normales y tumorales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Blidner, Ada G.. "Efecto del antiinflamatorio no esteroideo indometacina sobre las células mieloides supresoras en microambientes inflamatorios normales y tumorales". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Efecto del antiinflamatorio no esteroideo indometacina sobre las células mieloides supresoras en microambientes inflamatorios normales y tumorales

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área de Ciencias Biológicas

ADA G. BLIDNER

Director de tesis: Dra. Slobodanka M. Klein
Director asistente: Lic. María Adela Jasnis
Consejero de estudios: Dr. Eduardo Arzt

Lugar de trabajo: Área de Investigación,
Instituto de Oncología Angel H. Roffo

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2012

Resumen: Efecto del antiinflamatorio no esteroide indometacina sobre las células mieloides supresoras en un microambiente inflamatorio tumoral y no tumoral

Las células mieloides supresoras (CMS) constituyen una población de células con actividad regulatoria que controla las respuestas inflamatorias crónicas y promueve el escape tumoral. En este proyecto de tesis mostramos que el efecto del antiinflamatorio no esteroide indometacina (Indo) sobre las CMS es dependiente del contexto en el que se diferencie esta población celular. Ratones BALB/c inoculados con el adenocarcinoma de pulmón singeneico LP07 ($3x10^5$ células) se trataron *in vivo* con una dosis de 10 μM de Indo en el agua de beber. El tratamiento inhibió la acumulación de CMS en el tumor y en órganos linfáticos secundarios producida durante la progresión tumoral, inhibió la actividad supresora de las CMS esplénicas sobre la respuesta linfocitaria a un aloantígeno e inhibió el crecimiento tumoral en un ensayo de transferencia adoptiva, $p<0.001$. En línea con estos resultados, observamos la misma actividad en las CMS cuando se trataron *in vitro* con Indo (10 μM) en presencia de medio condicionado de células LP07, simulando el microambiente tumoral. Sin embargo, en ausencia del microambiente tumoral, la administración de Indo generó un aumento en la capacidad supresora (MLR; $p< 0.05$) y pro-tumoral (transferencia adoptiva, $p<0.01$) de las CMS. Además, las CMS de ratones normales tratadas con Indo en ausencia del microambiente tumoral suprimieron el desarrollo de la encefalomielitis aguda experimental (EAE), un modelo de esclerosis múltiple en ratones C57BL/6, mientras que las CMS tumorales tratadas con Indo aumentaron la severidad de los síntomas e impidieron su resolución ($p<0.05$). Analizando los mecanismos de inmunosupresión, Indo redujo la actividad arginasa (4,794 vs 2,077 μg urea/ mg total proteína, $p<0.001$) y la producción de óxido nítrico (9.2 vs 4.4 μM; $P<0,05$) y de especies reactivas de oxígeno (124 vs 87 MFI $P<0.05$) en CMS tumorales pero no en CMS normales. Este estudio revela el rol dual de un agente antiinflamatorio en el control de una población celular regulatoria con implicancias críticas en cáncer y en desórdenes autoinmunes.

Palabras clave: Células mieloides supresoras; Indometacina; agentes antiinflamatorios no esteroides; inmunidad tumoral; desórdenes autoinmunes; Inflamación.

Abstract: The non-steroidal anti-inflammatory agent indomethacin differentially controls the regulatory activity of myeloid-derived supressor cells in normal and tumor-associated microenvironments

Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) have emerged as a regulatory cell population that controls chronic inflammatory responses and promotes tumor-immune escape. To date no specific immunomodulatory drug has proven efficacy in targeting the expansion and/or function of these cells. Here we show a context-dependent effect of the non-steroidal anti-inflammatory drug indomethacin (Indo) on MDSCs. BALB/c mice were injected with $3x10^5$ LP07 lung adenocarcinoma cells and treated with a non-cytotoxic dose of Indo (10 μM; IC50 LP07: 60 μM). Indo treatment inhibited the suppressive activity of splenic MDSCs in mixed lymphocyte reactions (MLR) (p<0.05), and restrained tumor growth in adoptive transfer experiments (p<0.001). Accordingly, the same effect was observed when MDSCs were treated with Indo *in vitro* (10 μM; IC50 MDSCs: 125 μM) in the presence of conditioned media from LP07 cells. However, in the absence of a tumoral context, Indo administration increased the suppressive activity of these cells (MLR; p< 0.05) and their pro-tumoral effect (p<0.01). In keeping with these observations, Indo-treated normal MDSCs suppressed the development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE), a model of multiple sclerosis in C57BL/6 mice, while Indo-treated tumoral MDSCs enhanced the severity of EAE and delayed its resolution (p<0.05). Mechanistically, Indo reduced arginase activity (4,794 vs 2,077 μg urea/ mg total protein,p<0.001) and production of nitric oxide (9.2 vs 4.4 μM; p<0,05) and reactive oxygen species (ROS) (124 vs 87 MFI P<0.05) in tumoral MDSCs, but not in normal MDSCs. Our study unveils the dual role of a widely used anti-inflammatory agent in the control of regulatory cell compartments with critical therapeutic implications in cancer and autoimmune disorders.

Keywords: Myeloid-derived suppressor cells; Indomethacin; Non-steroidal anti-inflammatory agents; Tumor immunity; Autoimmune Disorders; Inflammation.

ÍNDICE

RESUMEN **2**

ABSTRACT **3**

ABREVIATURAS **7**

AGRADECIMIENTOS **8**

INTRODUCCIÓN **10**

Cáncer de Pulmón 11

Inmunología tumoral: Breve reseña histórica 12

Inmunología y cáncer 14

Células del sistema inmunológico y microambiente tumoral 17

Células Mielodes Supresoras 17

Antiinflamatorios no esteroides 26

Modelo experimental: Adenocarcinoma de Pulmón Murino LP07 28

OBJETIVOS **31**

OBJETIVOS ESPECÍFICOS **32**

MATERIALES Y MÉTODOS **33**

Drogas 34

Líneas celulares 34

Animales 34

Crecimiento subcutáneo de los tumores 35

Preparación de tejidos para estudios de citometría 35

Ensayo de actividad de la enzima arginasa 36

Ensayo de hipersensibilidad retardada (HR) 37

Obtención de CMS de bazo 37

Preparación del factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) 38

Preparación de medio condicionado de LP07 y B16 38
Obtención de CMS a partir de medula ósea 38
Producción de CMS a partir de progenitores de médula ósea....39
Reacción mixta leucocitaria (RML)....39
Transferencia adoptiva....40
Inducción de la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) 40
Western Blot....41
Determinación de la producción de Óxido Nítrico 41
Producción de Especies Reactivas de Óxígeno 42
Arreglo de genes de inmuno-tolerancia e inflamación 42
Análisis estadístico....42
RESULTADOS....44
La Indo reduce la progresión tumoral....45
La acción de la Indo posee mecanismos independientes de la COX-2 tumoral....46
La Indo inhibe el microambiente inmunosupresor....48
El tratamiento con Indo disminuye la capacidad supresora de CMS en RPT....59
El efecto de la Indo sobre las CMS depende del microambiente en el que se diferencian....63
Las CMS normales y tumorales tratadas con Indo controlan de manera diferente la evolución de un desorden inflamatorio crónico 74
La Indo modifica los mecanismos de supresión utilizados por las CMS....79
DISCUSIÓN....83
Tumor LP07....85
Actividad de las CMS 87
Efecto de la Indo sobre CMS “inflamatorias” y CMS “tumorales”....88
Expresión del marcador GR1 y mecanismos de inmunosupresión....92
Hipótesis para aplicaciones en terapias antitumorales 96

CONCLUSIONES.....99

BIBLIOGRAFÍA.....102

Abreviaturas

AINE antiinflamatorio no esteroide (una buena parte de la bibliografía incluye en esta categoría a los inhibidores clásicos de la ciclooxigenasas, como la aspirina, la indometacina, el ibuprofeno, etc., mientras que dejan el celecoxib y demás inhibidores selectivos de la COX-2 fuera de ella; en este trabajo utilizamos la sigla en forma general incluyendo todos los inhibidores de las ciclooxigenasas)

ARG Enzima Arginasa

ARNhc ARN horquillado corto (*shRNA, short hairpin RNA* en inglés)

CMS células mieloides supresoras

CMS_{norm} CMS diferenciadas en presencia de GM-CSF

$CMS_{norm+Indo}$ CMS diferenciadas en presencia de GM-CSF+ Indo

CMS_{tum} CMS diferenciadas en presencia de GM-CSF+ Medio condicionado de células tumorales

$CMS_{tum+Indo}$ CMS diferenciadas en presencia de GM-CSF+ Medio condicionado de células tumorales + Indo

COX-1/-2 ciclooxigenasa-1 /-2

EROs especies reactivas del oxígeno

GM-CSF factor de crecimiento de granulocitos y macrófagos

IL interleuquina (IL-1, IL-6)

Indo Indometacina

I.p. administración intraperitoneal

LPS lipopolisacárido

M.o. médula ósea

NF-κB factor nuclear del gen de la cadena kappa liviana en linfocitos B

ON óxido nítrico

PGE_2 prostaglandina E2

RPT ratones portadores de tumor

Sc. administración subcutánea

SFB Suero fetal bovino

TNF-α factor de necrosis tumoral alfa

Treg linfocitos T regulatorios $CD4^+CD25^+FOXP3^+$

Tr1 linfocitos T regulatorios $CD4^+CD25^+FOXP3^-$

Agradecimientos

A Danka Klein y Madela Jasnis por aceptarme en el laboratorio como becaria doctoral, por apoyarme en cada paso y permitirme trabajar en libertad.

A Elisa Bal, por estar siempre dispuesta a enseñar y corregirme a conciencia.

A los becarios del Roffo, a todos y cada uno de ellos, por su ayuda, alegría y fuerza para trabajar y aportar a la ciencia argentina. Sus palabras de afecto en momentos difíciles y su humor como herramienta de trabajo diario hicieron mis días mucho más felices. He aprendido de Uds. más que de nadie.

A los investigadores del Roffo, por tratarnos como iguales, por su generosidad a la hora de enseñar y discutir, por sus palabras de aliento.

A la gente del Bioterio, por formarme en el manejo de animales, por los asaditos patrios y por la mejor de las predisposiciones siempre.

Al cuerpo técnico del Roffo, por su ayuda diaria y gran manejo del “backstage” de la investigación.

A la biblioteca del Roffo, por brindarme incansablemente toda la bibliografía pedida.

Al Dr. Gabriel Rabinovich, por creer en mí y apostar por esta tesis. Por su colaboración constante, inspiración continua y abrazos intelectuales.

A la Dra. Mariana Salatino, por interesarse antes que nadie en mi trabajo, por apoyarme con alegría y por tirarme siempre, siempre “la posta”.

Al Dr. Ivan Mascanfroni, por confiar en mí más que yo misma y tirar siempre para adelante.

Al Dr. Juan Pablo Cerliani, por iniciarme en las técnicas de RML y por su ayuda continua.

Al Dr. Diego Croci, por su ayuda a lo largo de la tesis y excelente predisposición.

Al laboratorio del Dr. Rabinovich a Tommy, Marta, Seba, JuanK, Vero, Santi, Clau Gatto, Clau Leishman, Marcos, Vicky, Kari y los chicos de Exactas; y al laboratorio del Dr. Zwirner,

a Norberto, Germán, Damián, Lucas, Andre, Mer, Xime y Caro. Gracias por su ayuda siempre!!

A mamá y papá, por criarme rodeada de libros, ideas y creatividad, por apoyarme en mi carrera en todo momento y enseñarme a reír, ante todo.

A mi hna. Bren, por mirarme con cara de admiración cada vez que hablo de mi trabajo y llenarme de cariño.

A mis amigas Lau, Lour, Teté, Carlot, Beti, Caro y Fer, por las reuniones de catarsis, y su amistad constante.

A mis amigas de la vida, Marce y Ceci, por demostrar que el tiempo no es nada más que momentos de encuentro y a mis amigos China, Leo, Ale y Bele, Chapu, Seba y Barby, Charly y Vir, por ser una fuente de alegría y cariño en mi vida y por Mai, Milo, Justi, Salvador y la preciosísima Francesca.

A Pp, por embellecer mis presentaciones y mi vida.

A Eric Satie, Beethoven, Tchaikovski, Thom Yorke, Björk y Atahualpa Yupanki, por ayudar con su arte al proceso de escritura.

A los profesores que inspiran e investigadores valientes.

Gracias.

INTRODUCCIÓN

Cáncer de Pulmón

El cáncer de pulmón es una de las la principales causa de muerte por cáncer en hombres y mujeres a nivel mundial. En los Estados Unidos, es la principal causa de mortalidad por cáncer con una tasa de supervivencia (de 5 años) del 15%. Se estiman 160.340 muertes por esta enfermedad en el 2012 (28% de las muertes totales por cáncer) sólo en este país (1). En América Central y del Sur la incidencia del cáncer de pulmón está entre los cánceres más frecuentes como el de próstata en los hombres y de mama y cérvix en las mujeres, siendo Argentina el país con mayor incidencia comparado con el resto de los países latinoamericanos (2). En Argentina, a raíz de la escasa información sobre tasas de incidencia, se utilizan las tasas de mortalidad. En cáncer de pulmón la sobrevida es muy baja, por lo tanto las tasas de mortalidad pueden estimar correctamente las tasas de incidencia. En hombres, es el cáncer con mayor tasa de mortalidad (tasa ajustada sobre 100.000 varones), en mujeres es la cuarta causa de mortalidad (tasa ajustada sobre 100.000 mujeres), siendo más frecuentes los tumores de mama, útero y colon-recto (3).

El factor de riesgo más importante es el hábito tabáquico, que aumenta con la cantidad y duración del mismo. Otros factores de riesgo incluyen la exposición al gas Radón, junto con la exposición ambiental o laboral al humo (fumadores pasivos), asbestos, ciertos metales como cromo, cadmio y arsénico, químicos orgánicos, radiación, polución o tóxicos presentes en ciertas pinturas. La preexistencia de otras enfermedades pulmonares como la enfermedad obstructiva pulmonar crónica, la fibrosis pulmonar idiopática y la tuberculosis se asocian a un incremento del riesgo de padecer cáncer de pulmón. Por otro lado la susceptibilidad genética contribuye al desarrollo del cáncer de pulmón, especialmente si se desarrolla a edad temprana (1).

Se encuentran predominantemente dos tipos de cáncer de pulmón, el microcítico (a células pequeñas, SCLC, 14%) y el no microcítico (a células no pequeñas, NSCLC, 85%). El carcinoma de pulmón no microcítico suele detectarse en estadios avanzados lo que coincide con un mal pronóstico. El mismo puede ser dividido en tres tipos histológicos principales: carcinoma epidermoide (que incluye al de células escamosas), adenocarcinoma (incluyendo al bronquioloalveolar) y cáncer

de pulmón de células grandes. Si bien el carcinoma microcítico y el carcinoma escamoso son los más ligados al hábito tabáquico, el adenocarcinoma es el tipo más común en pacientes que nunca han fumado. (4)

Inmunología tumoral: Breve reseña histórica

En 1904 Paul Ehrlich en su teoría de las “Cadenas Laterales”, propuso la existencia de sustancias químicas en la membrana celular que al detectar otras sustancias extrañas pertenecientes a microbios o células tumorales, se liberaban a la sangre para neutralizarlas. De esta primera teoría deriva una segunda llamada “bala mágica” en la que Ehrlich afirmaba que era posible desarrollar químicos capaces de neutralizar toxinas al ser inoculados en pacientes. Ambas teorías fueron muy revolucionarias para la época ya que describían por un lado lo que hoy conocemos como “expansión clonal” y, por otro lado, sentó las bases de la quimioterapia (5). Al mismo tiempo en 1909 predijo que el sistema inmunológico podría prevenir la aparición de carcinomas que, de otra manera, serían mucho más frecuentes (6). Esta idea fue retomada por F. Macfarlane-Burnet y Lewis Thomas. Burnet creía que las células tumorales poseían neo-antígenos, es decir antígenos o proteínas que no se expresaban en células normales, que podrían generar una respuesta anti-tumoral eficiente que permitiera la eliminación de un tumor incipiente. Al mismo tiempo sugerían que organismos longevos deberían poseer mecanismos que los protegieran de neoplasias, similares a los mecanismos que participan del rechazo frente a un trasplante. Finalmente, Lewis Thomas y Frank MacFarlane Burnet publican un trabajo sobre la teoría de “Inmunovigilancia tumoral”, revelando la presencia de células tímicas que constantemente inspeccionan los tejidos en busca de células transformadas. Sin embargo, esta teoría cayó en desuso luego de que Osías Stutman observó igual incidencia de tumores en ratones atímicos y en ratones con genotipo salvaje (7). La teroría de la “inmunovigilancia tumoral” permaneció controversial hasta que, con el avance de la biotecnología, el desarrollo de ratones transgénicos y anticuerpos monoclonales, fue posible mediante evidencias experimentales, apoyar las teorías de Ehrlich, Mac-farlane Burnet y Thomas (8). Sin embargo, la inmunovigilancia representaba sólo una faceta de la compleja relación entre el sistema inmunológico y el tumor.

A comienzos del 2000 se desarrollo teoría de la “Inmunoedición” o de las “tres E” (8). Se describe un proceso dinámico dividido para su simplificación en tres etapas: eliminación, equilibrio y escape (tres E). La primera consiste en el reconocimiento y eliminación de las células tumorales por el sistema inmunológico. La segunda etapa describe la existencia de un balance entre esta eliminación y la proliferación de las células tumorales que sobrevivieron a la eliminación. Por último, la etapa del escape comprende la supervivencia y proliferación de aquellas células que no fueron eliminadas por el sistema inmunológico en las etapas anteriores.

Estas células, se denominaron “inmunoeditadas” y son las que generarían el desarrollo del tumor primario y una subpoblación podría formar metástasis.

Inmunología y cáncer

El proceso de carcinogénesis se desarrolla en múltiples etapas y es impulsado por el daño genético o epigenético inducido por agentes carcinogénicos (o en cierto casos alteraciones intrínsecas heredadas) en células susceptibles que desarrollan una ventaja selectiva de crecimiento o que se expanden en forma clonal como resultado de la activación de proto-oncogenes o de la inactivación de genes supresores de tumor (9, 10).

El genoma humano es muy estable, por lo tanto para que puedan acumularse los eventos mutagénicos necesarios para desarrollar cáncer, tiene que aumentar la tasa de mutación lo que conlleva a la inestabilidad genómica. Esto implica que ciertas mutaciones necesarias para el desarrollo de la carcinogénesis se producen en genes que participan en el mantenimiento de la estabilidad genómica, en procesos tales como la recombinación, reparación y metilación del ADN (11). Los eventos de mutación que suceden durante el proceso de carcinogénesis le otorgan a la célula transformada una ventaja adaptativa determinada por la ganancia de características que deviene en su crecimiento selectivo y predominio frente a otras células dentro de un tejido determinado y resulta indispensable para el establecimiento y la progresión del tumor.

En el año 2000 Hanahan y Weinberg describieron seis alteraciones de la fisiología celular indispensables para la progresión tumoral. 1) Evasión a la muerte celular programada (apoptosis), 2) autosuficiencia respecto a señales de crecimiento, 3) evasión ante señales inhibitorias del crecimiento, 4) potencial replicativo ilimitado, 5) angiogénesis sostenida y 6) invasión tisular y metástasis (12).

La inflamación puede tener un rol fundamental tanto en la promoción de la carcinogénesis como en la progresión tumoral.

En el primer caso, se ha visto que hasta un 20% de cánceres se asociaron directa o indirectamente con la presencia de infecciones o condiciones inflamatorias desreguladas (13). Este efecto fue reconocido en 1863 por el Dr. Rudolf Virchow, quien postuló que la irritación crónica y las heridas pueden constituir una condición previa para la tumorigénesis (14)

Un ejemplo del papel de la inflamación en la promoción de la carcinogénesis es la expresión del factor NF-KB en numerosos tipos de células tumorales. NF-KB regula la trascripción de genes que participan en la inflamación, la supervivencia y proliferación celular, la invasión, la angiogénesis y la metástasis. Análogamente, la mayor parte de los agentes que promueven inflamación y proliferación celular, activan NF-KB; entre ellos se incluyen la endotoxina, el tabaco y los carcinógenos en general, la radiación, los factores de crecimiento y las citoquinas inflamatorias (15). Por otro lado, las células del sistema inmunológico presentes en el sitio de inflamación producen EROs o citoquinas inflamatorias que inducen la expresión de EROs en las células del estroma tumoral, y generan daños a nivel del ADN de la célula tumoral que promueve la carcinogénesis (16, 17)

En segundo lugar, existe otro tipo completamente diferente de inflamación que es aquella que sucede una vez desarrollado el tumor. La gran mayoría de los tumores sólidos disparan respuestas inflamatorias que favorecen el establecimiento de un microambiente pro-tumoral (18). Ciertos oncogenes, como miembros de la familia de RAS y MYC, inducen programas transcripcionales que remodelan el microambiente tumoral, reclutando leucocitos y promoviendo la producción de citoquinas y quemoquinas pro-tumorales (19, 20). A causa de la continua renovación celular inducida por la inflamación tumoral, los tumores han sido considerados como “heridas que nunca sanan” (Dvorak, 1986).

La importancia de la inflamación en la progresión tumoral permitió que se incorporara a partir del 2011 como uno de los principales factores indispensables para su desarrollo (Figura I-1; 21).

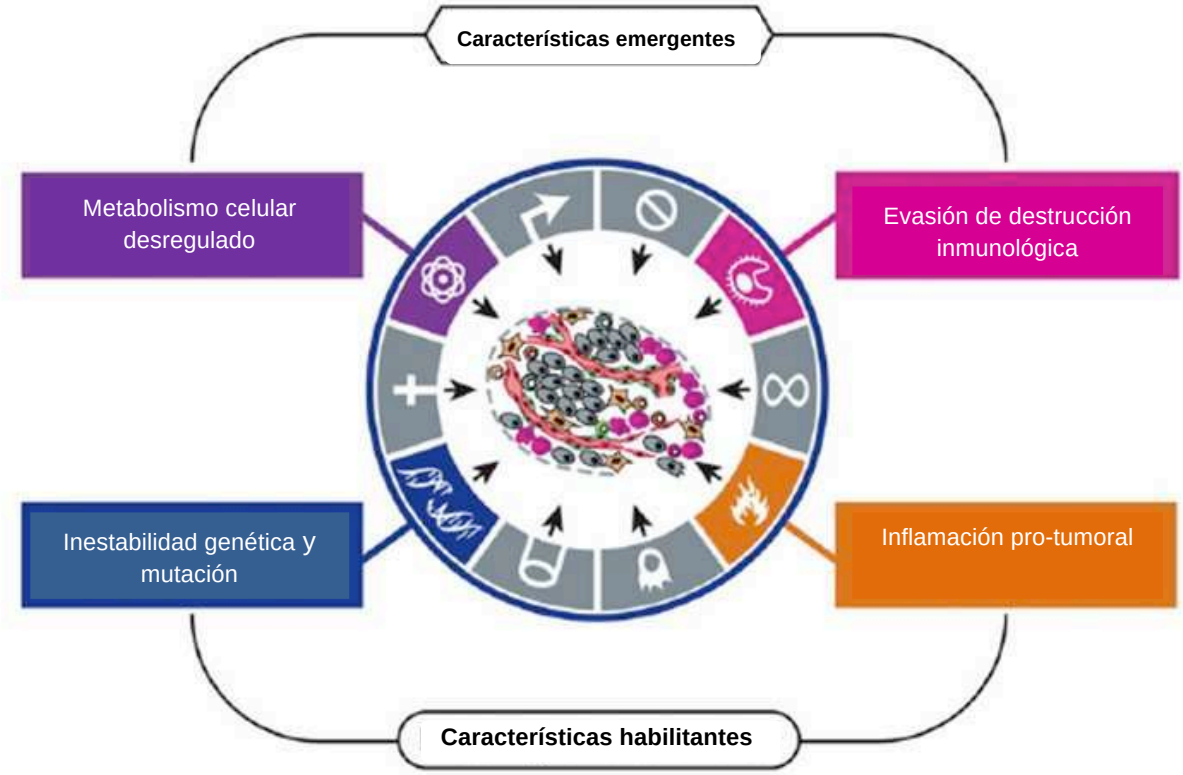


Figura I-1. Adaptada de "Hallmarks of cancer: the next generation", Hanahan D, Weinberg RA, Cell. 2011.

Células del sistema inmunológico y microambiente tumoral

La existencia de linfocitos T que reconozcan antígenos tumorales es un pre-requisito para el establecimiento de una respuesta inmunológica anti-tumoral (22). Sin embargo, el reconocimiento del antígeno tumoral por linfocitos T CD4 parece devenir en la anergia más que en la activación de dichas células (23, 24, 25). Este efecto se produce además en etapas tempranas de la progresión tumoral, generando un estado de insensibilidad al antígeno tumoral y favoreciendo el avance del tumor (26). Además otro posible resultado de la interacción entre los linfocitos T CD4 y el antígeno tumoral es la generación de linfocitos T CD4 regulatorios (Tregs, Tr1), lo que complica aún más la instauración de una respuesta anti-tumoral eficiente (27, 28, 29, 30, 31). Se demostró que para que se produzca la anergia de los linfocitos T que reconocen antígenos tumorales, los mismos deben ser presentados por células presentadoras de antígenos (CPA) y no por la célula tumoral directamente (23, 32). El fenotipo de la CPA al momento de la presentación antigénica es crucial para la activación del linfocito T (23, 33, 34, 35); por lo tanto, la caracterización de las CPA durante la progresión tumoral es fundamental para comprender la inmunosupresión mediada por el tumor. Las células de origen mieloide juegan un rol en la promoción de la progresión del tumor, el escape inmune, la angiogénesis y la metástasis. Algunos de los subgrupos de las células mieloides, incluyendo las células dendríticas tolerogénicas, los macrófagos tipo M2 y las células mieloides supresoras funcionan como una red que puede determinar si la respuesta inmune será a favor o en contra de una respuesta inmunológica anti-tumoral (36).

Células Mielodes Supresoras

Alrededor del 2004 (37, 38) surgió una nueva denominación para un grupo heterogéneo de células inmunosupresoras de origen mieloide. Estas células se originan en médula ósea y en condiciones fisiológicas dan origen a monocitos, células dendríticas y neutrófilos. Sin embargo, en situaciones patológicas tales como sepsis, traumas o infecciones, se previene su diferenciación y permanecen como un

grupo heterogéneo de células mieloides inmaduras activadas (39; Figura I-2). Por lo tanto se las denominó “Células Supresoras de Origen Mieloide” (del inglés: MDSCs; 40). En ratones, se caracterizan por co-expresar los marcadores GR1 y CD11b. GR1 también es conocido como Ly-6G, una proteína de entre 21-25 kDa anclada a glifosfatidilinositol de membrana que se utiliza como marcador de diferenciación y maduración de granulocitos en médula ósea. Suele expresarse transitoriamente durante la diferenciación de células monocíticas pero no eritroides. En la periferia, este marcador, se expresa en neutrófilos, eosinófilos y monocitos, sin embargo el nivel de expresión no siempre es el mismo en los diferentes tipos celulares.

El marcador CD11b, también conocido como integrina αM, es una de las dos subunidades de la integrina αMβ2, llamada también antígeno de macrófagos 1 (Mac-1) o receptor del complemento 3 (CR3). Esta integrina heterodimérica media la adhesión de las células al componente del complemento 3 inactivo (C3bi) e ICAM-1 (CD54). El primero es parte del sistema de complemento y su unión a CR3 en la célula aumenta su capacidad fagocítica. Por otro lado, la unión de ICAM-1, presente en células endoteliales, a la integrina αMβ2 permite la extravasación del leucocito al sitio de inflamación. Este receptor puede expresarse en granulocitos, macrófagos, células dendríticas y células NK (37). La médula ósea de ratones normales contiene entre un 20-30% de CMS, sin embargo en el bazo, sólo se encuentran en porcentajes de entre 2-4% y están ausentes en ganglios linfáticos. En humanos las CMS se definen normalmente como CD14 negativas (Co-receptor del receptor tipo Toll 4, que se une a la proteína transportadora de LPS) y positivas para CD11b positivas. También pueden definirse como células positivas para CD33, (marcador común de células de origen mieloide, y se une a ácido siálico como parte del grupo SIGLEC, dentro de las lectinas), pero negativas para marcadores de células mieloides y linfoides maduras y para la molécula de histocompatibilidad II, HLA-DR (41, 42). En sangre periférica se caracterizaron como positivas para CD15 (carbohidrato expresado en células granulocíticas y monocíticas; 43). En individuos sanos, las CMS constituyen alrededor de un 0,5% de las células mononucleares de sangre periférica (41).

CMS en enfermedades inflamatorias

A pesar de que en sus comienzos, las CMS se ligaron al cáncer, posteriormente se las asoció con varios procesos de inflamación crónica y aguda. Se ha descrito su actividad regulatoria de la respuesta inmune durante infecciones bacterianas o parasitarias, estrés traumático, sepsis y trasplantes (39).

V. Bronté y col. (44) describieron un aumento de células $GR1^+CD11b^+$ en el bazo de ratones que sufrieron sepsis polimicrobiana. Estas células también eran positivas para CD31, marcador del desarrollo del linaje mieloide que se pierde en células maduras. Algunas también mostraron inmunorreactividad para el receptor de membrana de macrófagos F4/80. Esta variedad de marcadores estaría relacionada con la presencia de un grupo heterogéneo de células $GR1^+CD11b^+$ en distintos estados de diferenciación. Estas células producían factores inmunomoduladores como IL-10 y TNF-α, sesgando la respuesta inflamatoria hacia un perfil Th2 (45).

Las CMS también regulan la inflamación producida luego de un trasplante. Se observó que la transferencia de CMS mejoró la tolerancia al injerto de piel alogeneico de los ratones transplantados. El estudio identificó una enzima de respuesta a estrés (Hemooxigenasa-1, HO-1) como mecanismo principal de supresión utilizado por las CMS para regular a los linfocitos T reactivos, siendo este mecanismo independiente de arginasa -1 (ARG-1) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (45). Por otro lado, ratones transgénicos deficientes en SHIP (SH2-domain containing 5 inositol phosphatase, gen que regula el repertorio de receptores de células NK, su deficiencia aumenta la proporción de receptores inhibitorios), no rechazan trasplantes alogeneicos ya que poseen mayor cantidad de CMS y linfocitos T regulatorios (Treg) (46).

En ratones portadores de la Encefalomielitis Autoinmune Experimental (EAE), modelo experimental de Esclerosis Múltiple, se ha descrito un aumento de la población de CMS con función supresora de Linfocitos T tanto en el bazo, como en el sistema nervioso central y en sangre periférica (47).

Morfológicamente, las CMS son similares a células polimorfonucleares y monocitos. Dado que constituyen un grupo heterogéneo de células de origen mieloide en distinto estado de diferenciación, en una misma muestra se pueden observar diferentes tipos celulares (Figura I-3).

Si analizamos la expresión de marcadores, las CMS granulocíticas (morfológicamente similares a PMN) poseen mayor expresión del marcador GR1, denominadas $GR1^{high}CD11b^{+}$, que también puede expresarse como $Ly\text{-}6G^{+}CD11b^{+}$. Las CMS monocíticas (morfológicamente similares a monocitos) poseen una baja expresión de GR1, siendo $GR1^{low}CD11b^{+}$ o $Ly\text{-}6C^{+}CD11b^{+}$.

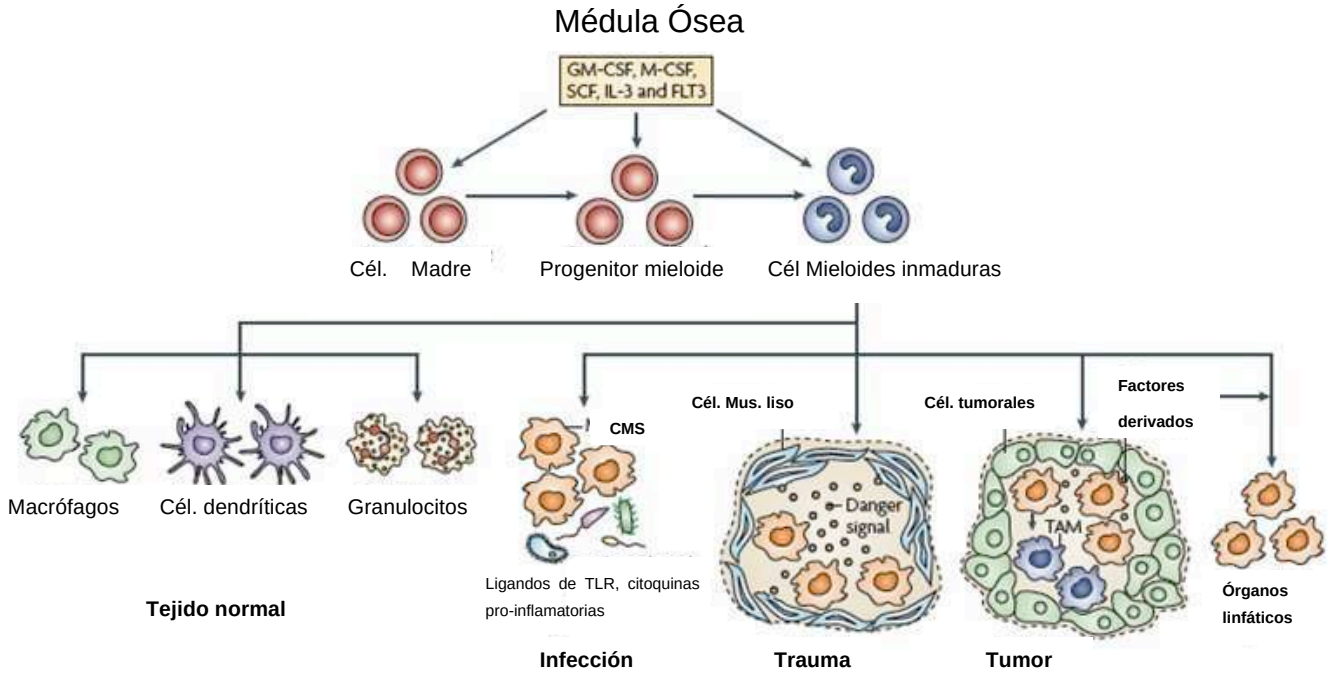


Figura I-2. Adaptada de "Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system"**,** Gabrilovich DI, Nagaraj S. Nat Rev Immunol. 2009.

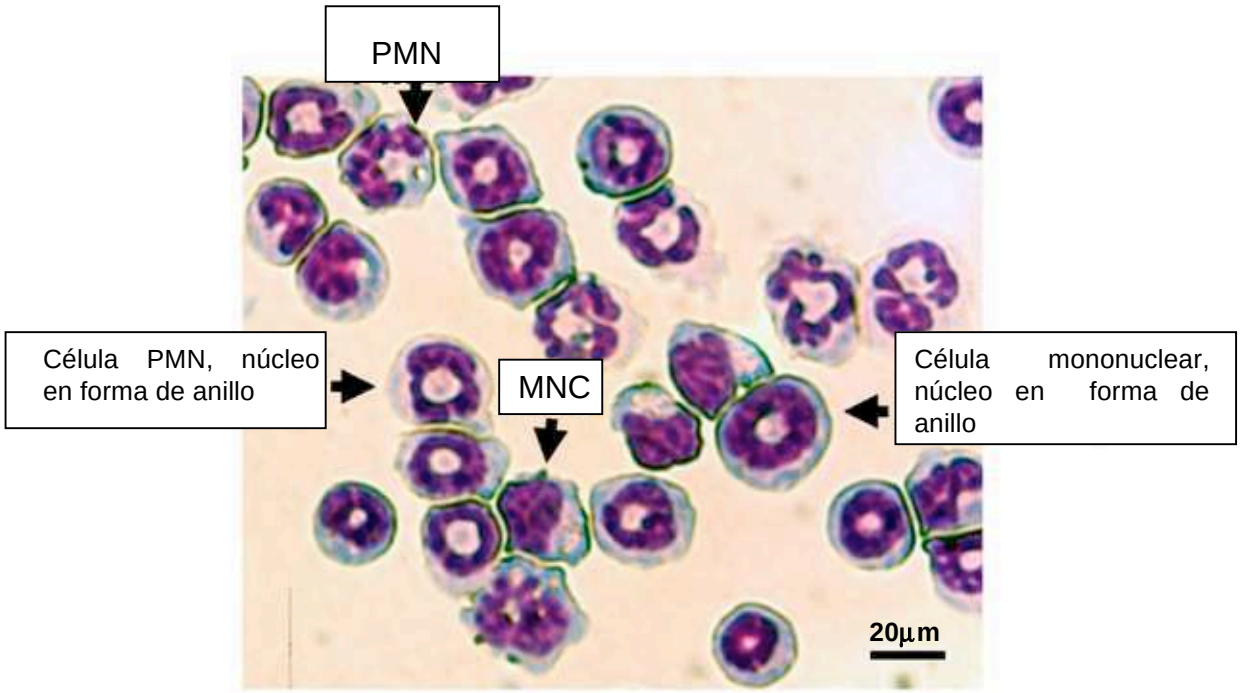


Figura I-3. Adaptada de "MyD88-dependent expansion of an immature $GR1^{+}CD11b^{+}$ population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis", Delano et al., JEM, 2007.

Mecanismos de expansión y activación de CMS

Entre los factores que inducen la expansión de las CMS se encuentra la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2) y su producto la Prostaglandina E_2 (PGE_2), el factor de células stem (SCF), el factor de crecimiento de macrófagos (M-CSF) , el factor de crecimiento de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) la interleuquina 6 (IL-6) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). La mayoría de estos factores activa señales que convergen en proteínas de la familia Janus quinasa (JAK) y finalmente en la molécula transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3), ambas moléculas regulan la supervivencia, proliferación, diferenciación y apoptosis celular (39).

Las CMS, para ejercer su actividad supresora, requieren la presencia de factores activadores, además de los factores que favorecen su expansión. Estos factores pueden ser producidos por células tumorales y estromales, por linfocitos T o pueden ser productos bacterianos o virales (48). El interferón gamma (IFN-γ) es

uno de los principales factores activadores de CMS. Producido mayormente por linfocitos T activados, el IFN-γ activa a STAT1 y como resultado aumenta la expresión de la iNOS y ARG I en CMS. Otros factores activadores son IL-4, IL-13, TGF-β y ligandos de los receptores TLR.

Resumiendo, para promover la capacidad supresora de las CMS debe conjugarse la presencia de factores que promuevan tanto su expansión como su activación (39).

Mecanismos de supresión de CMS

Arginasa e iNOS

El metabolismo de la L-arginina es uno de los mecanismos principales de supresión utilizado por las CMS. La L-arginina es convertida a ornitina y urea por la enzima ARG y a óxido nítrico y citrulina por la NOS. En células maduras como macrófagos hay un balance entre ambas enzimas. Dependiendo del perfil del macrófago, que puede ser M1, inflamatorio o M2, relacionado a la inmunoregulación y reparación de heridas, se utiliza más la vía de la NOS o la ARG, respectivamente (49). Las CMS poseen ambos mecanismos para metabolizar L-arginina, que coexisten generando una mayor depleción de L-arginina del medio extracelular. Este metabolito es utilizado también por los linfoticos T para el correcto armado de su receptor (TCR), por lo tanto la deprivación de L-arginina producida por las CMS genera un impedimento en el armado del receptor T, que deviene en una incorrecta presentación antigénica y, si se prolonga la deprivación de nutrientes, en anergia y apoptosis de los linfocitos T (50, 51). El metabolismo de la cisteína también es utilizado por estas células como mecanismo inmunosupresor. Tanto los linfocitos T como las CMS necesitan consumir cisteína del medio porque carecen de las enzimas necesarias para producirla. Por lo tanto un aumento de la población CMS compite con los linfocitos T por la cisteína del medio, generando en estas células una carencia metabólica que impide su correcta activación y proliferación (52, 53). El producto principal de la NOS, el óxido nítrico (ON) también es utilizado como un mediador de la inmunosupresión, ya que puede producir en linfocitos T un estado reversible de anergia por inhibición de la cascada Jak3/STAT5 (54), inhibir la expresión de las moléculas de histocompatibilidad clase II (MHCII, 55) y producir

apoptosis (56). Además puede combinarse con las especies reactivas de oxígeno (EROs) para producir peroxinitritos.

Estas especies químicas producen la nitración del TCR y el co-receptor CD8 evitando la correcta unión del péptido presentado y la consecuente activación celular (57).

Especies Reactivas de Oxígeno (EROs)

Factores inflamatorios como TGFβ, IL-3, IL-6, IL-10, factor de crecimiento plaquetario y GM-CSF, inducen la producción de EROs en CMS. Estos factores pueden estar presentes en procesos inflamatorios o ser liberados por las células tumorales. Tanto infecciones bacterianas o parasitarias como enfermedades autoinmunes (ej. Encefalomielitis autoinmune experimental, modelo de esclerosis múltiple en ratones) generan un aumento en la producción de EROs y ON en CMS luego de su contacto con los linfocitos T (58; 47). La producción de EROs es perjudicial para la presentación antigénica, pon un lado porque impide la expresión de la cadena CD3ζ del receptor del linfocito T CD8 (59, 60), al igual que la deprivación de L-Arg del medio, y por otro lado porque puede inhibir la producción de IFN-γ (43)

Citoquinas regulatorias

Frente a estímulos inflamatorios, principalmente IFN-γ producido por linfocitos T activados, las CMS producen citoquinas regulatorias como IL-13 e IL-10 y TGF-β, que generan la polarización de linfocitos T hacia un perfil Th2 y estimulan la producción de linfocitos T regulatorios, respectivamente. Al mismo tiempo las CMS producen más IFN-γ realimentando el circuito regulatorio (61; 48).

MDSC y cáncer

Las células mieloides supresoras se describieron por primera vez en pacientes con cáncer y modelos tumorales en ratones. En los modelos animales, se genera un aumento rápido de CMS tanto como resultado del crecimiento tumoral a partir de células tumorales transplantadas, o por la presencia de tumores espontáneos en ratones transgénicos. En el bazo de ratones portadores de tumor, esta población que normalmente se encuentra en 2-4% puede elevarse hasta un 20-40% del total

de esplenocitos nucleados, estando además presentes en ganglios linfáticos e infiltrando el tumor (39). En pacientes, las células mieloides inmaduras constituyen alrededor del 0,5% de las células mononucleares circulantes en sangre, valor que aumenta cinco veces en pacientes con cáncer en etapas tempranas. En pacientes con estados avanzados de la enfermedad, las células CMS aumentan al mismo tiempo que disminuyen las células dendríticas y este fenómeno se correlaciona con una inmunidad anti-tumoral disminuida (62). Las CMS no sólo se asocian a una inhibición de la respuesta anti-tumoral, sino que también pueden promover la angiogénesis, aumentar la invasión tumoral y la metástasis (63, 64).
La eliminación de esta población supresora mejora la respuesta inmunológica anti-tumoral en ratones portadores de tumor y en pacientes (65).

CMS en cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón además de producir una serie de factores con un potente efecto antiinflamatorio, puede generar en las células inflamatorias circundantes, la producción de citoquinas regulatorias. La PGE2 secretada por las células tumorales es uno de los mediadores del desbalance entre citoquinas regulatorias e inflamatorias producidas por linfocitos y macrófagos en el sitio del tumor (66).

La PGE_2 se produce por las enzimas COX-1 y 2 a partir del ácido araquidónico liberado de los fosfolípidos de membrana por acción de fosfolipasas (67). En general, la COX-1 se expresa constitutivamente, mientras que la expresión de COX-2 es inducible en diferentes tipos de células y no es detectable en la mayoría de los tejidos en condiciones basales (68).

Esta última isoenzima está frecuentemente expresada de forma constitutiva en tumores no microcíticos (69). La sobreexpresión de COX-2 en células tumorales se asoció con la resistencia a la apoptosis, a través de estimular la producción de proteínas anti-apoptóticas (70) y alteraciones en la adhesión a la matriz extracelular (71), Se le atribuye además la promoción de la angiogénesis (72) a través de la producción de factores pro-angiogénicos por las células tumorales y endoteliales (73 tsujii 1998), un aumento de la invasión y metástasis, regulando la producción de metaloproteasas y la expresión de CD44 (74) y una menor respuesta anti-tumoral (66, 39). La COX-2 producida por células tumorales también puede regular la actividad de las CMS a través del efecto estimulador de PGE_2 sobre la ARG en cáncer de pulmón (75).

Por otro lado, se sabe que las CMS pueden estimular la actividad de linfocitos T regulatorios (Treg) y que la producción de PGE_2 por las células tumorales de pulmón inducen la expresión del factor de Foxp3, necesario para la diferenciación de Treg (76).

Por lo tanto las CMS reclutadas por las células tumorales favorecen la progresión tumoral, inhibiendo la correcta presentación antigénica y actividad de linfocitos T citotóxicos, induciendo poblaciones inmuno-supresoras como T regs y células dendríticas regulatorias y aumentando la capacidad angiogénica y metastásica del tumor.

Antiinflamatorios no esteroides

Los antiinflamatorios no esteroides (AINE) se indican para el tratamiento de condiciones crónicas o agudas que incluyen dolor y/o inflamación, como artritis reumatoide, gota, migrañas y jaquecas. Además se han estudiado para el tratamiento y la quimioprevención del cáncer, especialmente en los tumores de tipo colorectal (77).

Los AINEs inhiben competitivamente el sitio de la actividad de COX, con excepción de la aspirina, que la modifica covalentemente. Aunque los sitios con actividad ciclooxigenasa de la COX-1 y la COX-2 son estructuralmente similares (85% de homología en contraste con el 65% para la proteína total), difieren en cuanto a su tamaño, más grande en la COX-2, que posee un bolsillo lateral sobre el estrechamiento mencionado. La existencia de este bolsillo lateral permite la recepción de moléculas inhibitorias con una estructura más grande. Esta diferencia de tamaño permitió el desarrollo de inhibidores selectivos de la COX-2 (78).

Existen numerosas evidencias acumuladas a partir de estudios poblacionales, de casos y controles y de ensayos clínicos que indican que el uso regular de los AINEs en periodos de 10-15 años reduce entre 40 y 50% el riesgo relativo de desarrollar cáncer colorrectal (79). Confirmando esos estudios, el uso de los AINEs promovió la regresión de adenomas preexistentes en pacientes que padecen de poliposis adenomatosa familiar (80). Dado que el blanco primario de los AINEs son las ciclooxigenasas, resultó inmediata la hipótesis de que su inhibición sería beneficiosa para el tratamiento de este tipo de cáncer. Muchos otros tipos de tumores, además del colorrectal, incluyendo los de pulmón y mama, poseen elevados niveles de expresión de COX-2 y de producción de PG (81-89). Además de factores intrínsecos como mutaciones de los protooncogenes *Wnt* y *Ras* (90), con la consiguiente alteración de sus vías de señalización, existen otros procedentes del microambiente tumoral que pueden aumentar la expresión de COX-2, entre ellos la hipoxia y los estímulos inflamatorios (91, 92). Tanto los AINEs selectivos como no selectivos de COX-2 previnieron el desarrollo de cáncer de pulmón en modelos experimentales de manera dosis dependiente, al mismo tiempo que un número limitado de estudios epidemiológicos sugieren que el uso regular de

AINEs puede reducir la incidencia de cáncer de pulmón (93). En este sentido, se observó que inhibidores no específicos de COX-2 como la aspirina y el sulindac reducen la incidencia de cáncer de pulmón en ratones expuestos a compuestos presentes en el tabaco (94).

La indometacina posee propiedades antiinflamatorias (95, 96), quimiopreventivas y antitumorales, inhibiendo la acumulación de células tumorales en los pulmones y el subsecuente crecimiento de metástasis experimentales en ratones (97) y retrasando la iniciación del crecimiento tumoral y reduciendo el tamaño del tumor primario y la diseminación metastásica (98). Sumado a estos efectos, se observó que la Indo fue capaz de restablecer la capacidad anti-tumoral de macrófagos en un modelo de inmunidad concomitante (98) y que inhibidores de COX-2 reducen la acumulación de CMS en un modelo murino de cáncer de mama (99).

Modelo experimental: Adenocarcinoma de Pulmón Murino LP07

La línea LP07 es una línea celular tumoral derivada del adenocarcinoma de pulmón murino llamado P07. El mismo apareció espontáneamente en una hembra BALB/c de 12 meses de edad, en el Departamento de Bioterio del Área de Investigación del Instituto Oncológico Ángel H. Roffo. El tumor fue extraído y transplantado sucesivamente mediante trocar en el flanco derecho en forma sc, obteniéndose un modelo de tumor subcutáneo derivado del original (100) que metastatiza en pulmón. Una vez establecido el tumor subcutáneo, se obtuvo la línea celular continua LP07 (101).

Las células LP07 inyectadas de forma sc., al igual que el tumor original P07, desarrollan un tumor de tipo adenocarcinoma poco diferenciado, el cual no presenta signos de invasión local pero sí metástasis pulmonares. El análisis histopatológico revela células poliédricas rodeadas por células ahusadas y algunas estructuras de aspecto glandular (Figura I-3). Se observan además, focos de apoptosis y necrosis, especialmente hacia el centro del tumor, donde los nutrientes se vuelven escasos y la llegada de oxígeno es menor. Presenta además infiltrado inflamatorio.

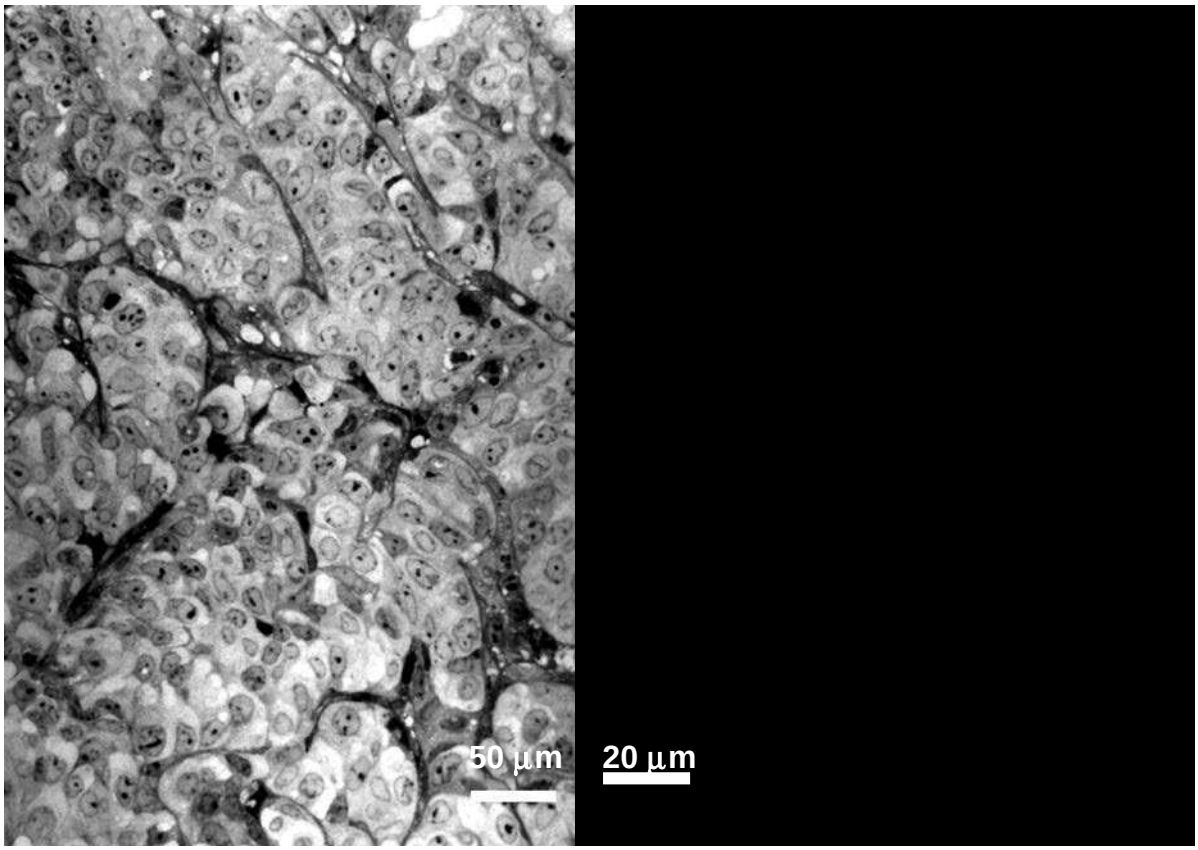


Figura I-3. A, Tinción hematoxilina-eosina de corte de tumor LP07, se observan células poliédricas rodeadas por células ahusadas. **B**, Microscopía de fluorescencia de células LP07 *in vitro* marcadas con naranja de acridina, se observa gran cantidad de gránulos intracelulares con localización perinuclear. Fotografías provistas por el Dr. Urtreger, A.

Ambos tumores LP07 y P07 inducen síndromes paraneoplásicos en el ratón portador tales como hipercalcemia, caquexia y leucocitosis, similares a los observados en pacientes que presentan cáncer de pulmón a células no pequeñas (102). La hipercalcemia es consecuencia de la elevada producción de la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) secretada por el tumor. La caquexia, que se refiere a la pérdida de peso, debilidad y bajo rendimiento del animal, está relacionada con la liberación de citoquinas inflamatorias como IL-6, IL-1β, TNF-α y GM-CSF por el tumor. La leucocitosis implica un aumento en el número total de glóbulos blancos en sangre y en el bazo (produciendo además esplenomegalia). Este síndrome se produce a expensas de un aumento en la población polimorfonuclear, generando en consecuencia una inversión en la fórmula leucocitaria en ratones portadores de tumor avanzado. En cambio los ratones normales y los portadores de tumores pequeños de corta evolución presentan una mayor proporción de linfocitos.

Además, la línea celular LP07 expresa altos niveles de la enzima COX-2 y por lo tanto produce grandes cantidades de PGE_2 (103).

OBJETIVOS

Esta tesis tuvo como objetivo general evaluar el efecto de un antiinflamatorio no esteroide, la indometacina, sobre la población de Células Mieloides Supresoras (CMS), en patologías inflamatorias y tumorales.

Las CMS son una población celular con capacidad de inmunoregulación que juega un papel fundamental tanto en desordenes inflamatorios como en el escape tumoral, (104, 39). La indometacina es un AINE que por su potente efecto antiinflamatorio, debido en gran parte a la inhibición de las enzimas COX1 y 2, puede asimismo tener acción sobre el desarrollo tumoral (105,106). A partir de estos antecedentes el objetivo fue investigar si el mecanismo de su acción en ambos tipos de patología podría radicar en la modulación de la población CMS. Dado que se había demostrado anteriormente que la Indo inhibía el cáncer de pulmón murino LP07 (107), empleando este modelo experimental nos planteamos los siguientes objetivos específicos.

Objetivos específicos

- Determinar la presencia de CMS en el tumor y en los órganos linfáticos de un ratón portador de tumor LP07 en las diferentes etapas de la progresión tumoral.

- Estudiar el efecto de la administración de Indo sobre la acumulación de las CMS y el estado inmune sistémico.

- Estudiar el efecto de la administración de Indo sobre la capacidad supresora de CMS esplénicas aisladas de ratones portadores de tumor LP07.

- Estudiar el efecto de la Indo sobre CMS diferenciadas en un microambiente tumoral y en un microambiente inflamatorio no tumoral y determinar:

    - Capacidad supresora *in vitro*
    - Capacidad supresora *in vivo* sobre el crecimiento tumoral
    - Capacidad supresora *in vivo* sobre el desarrollo de una patología inflamatoria autoinmune
    - mecanismos de inmunosupresión involucrados

MATERIALES Y MÉTODOS

Drogas

El antiinflamatorio no esteroide Indo (Sigma-Aldrich) se disolvió en 100% de etanol (5 mg/ml). Para los experimentos *in vitro* se utilizó en concentración de entre 10-100 µM. En los experimentos *in vivo*, la Indo se suministró a los ratones en el agua de bebida, en una concentración final de 10 µg/ml, desde el momento de inoculación de las células tumorales y hasta finalizar cada experimento. Los animales control recibieron en el agua de bebida sólo el solvente de la droga en la misma concentración que el grupo tratado.

Líneas celulares

La línea celular LP07 se obtuvo a partir de un pasaje sc. del tumor espontáneo P07. Las células LP07 se cultivaron en medio de cultivo MEM 41500 (GIBCO) suplementado con 10% de SFB, L-glutamina 2mM y 80 µg/ml de gentamicina, a 37˚C en una atmósfera húmeda con 5% de CO2.

La línea LP07^{-COX-2} fue provista por el Dr. Guillermo Peluffo, del Área de Investigación del Instituto de Oncología Ángel H. Roffo. Las mismas tienen silenciado el gen de COX-2 por transducción con un ARNhc. Las condiciones de cultivo son las mismas que las utilizadas para las células LP07. La línea control del silenciamiento tiene un ARNhc contra el gen de GFP.

La línea celular 4T1, carcinoma mamario singeneico en BALB/c, se utilizó como control de la especificidad antitumoral del efecto de la Indo. La misma se cultivó en medio RPMI (GIBCO) suplementado con 10% de SFB, a 37˚C en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2.

La línea celular B16, melanoma de origen C57BL/6, se utilizó para obtener medio condicionado, utilizado en los experimentos de diferenciación de CMS para transferencia a ratones con EAE. La misma fue cultivada en medio DMEM (GIBCO) suplementado con 10% de SFB a 37˚C en una atmósfera húmeda con 5% de CO2.

Animales

Hembras BALB/c, de 3 a 4 meses de edad, endocriadas en el Departamento de Bioterio del Instituto Oncológico Ángel H. Roffo, se utilizaron para el trasplante de

las células tumorales LP07 y 4T1. Células progenitoras de médula ósea se obtuvieron de ratones BALB/c de entre 6 y 8 semanas de edad.

Hembras C57BL/6 de 3 a 4 meses de edad, provistas por el Departamento del Bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental, se utilizaron para el desarrollo de la encefalomielitis aguda experimental (EAE). Células progenitoras de médula ósea de obtuvieron de ratones C57BL/6 de entre 6 y 8 semanas de edad.

Los animales tuvieron libre acceso a la bebida y el alimento *(ad libitum*) y se mantuvieron en un régimen de 12 h de luz y oscuridad. Todos los estudios se llevaron a cabo siguiendo las normas de cuidado animal definidas en la "Guía para el cuidado de los animales de laboratorio" del National Institutes of Health (NIH; Guide for the care and use of laboratory animals, eight edition, 2011)

Crecimiento subcutáneo de los tumores

Las células LP07 (3 x10^5) y 4T1 (1,5 x10^4) se inocularon sc. en el flanco derecho de ratones hembra BALB/c. El tamaño tumoral se evaluó dos veces por semana midiendo dos de sus diámetros perpendiculares con un calibre de Vernier. El volumen tumoral (mm3) se calculó según: (A x B2)/2, donde A y B fueron los diámetros mayor y menor respectivamente. A diferentes días de evolución los animales fueron sacrificados y se procedió a realizar su autopsia (ver ítem siguiente). Los pulmones se fijaron en fijador de Bouin (ácido acético, ácido pícrico y formaldehido) y las metástasis superficiales se contaron bajo lupa estereoscópica.

Preparación de tejidos para estudios de citometría

Se realizó la disección de los ratones portadores de tumor tratados o no con Indo y de los ratones normales. Los animales se sacrificaron a distintos tiempos de la progresión tumoral (10, 20 y 30 días) y se disecaron el bazo, el tumor, ganglios drenantes (inguinales + axilares) y los ganglios contralaterales. Se realizaron suspensiones celulares por disociación mecánica y los glóbulos rojos se lisaron con una solución tampón de lisis de glóbulos rojos (Sigma-Aldrich). Luego se resuspendieron las células en solución tampón de citometría (Tampón fosfato, 10% SFB, 0,1% azida sódica) y se marcaron durante 30 min a 4 ℃ con los anticuerpos

que se definen en la tabla 1 (eBioscience). Luego se fijaron las muestras en 150µl de solución tampón fosfato y 50µl de paraformaldehido al 4%. Para analizar la presencia de CMS en el bazo y ganglios de ratones con EAE, se repitió el mismo procedimiento y se marcaron las muestras sólo con los primeros dos anticuerpos de la tabla. Se utilizó el citómetro FacsAria 1 de BD y los datos se analizaron con el programa FlowJo.

Anticuerpo Anti	**Tipo celular que detecta**	**Fluorocromo asociado**
CD11b	CMS	APC
GR1	CMS	PE
CD8	LinfocitoT citotóxicos	FITC
CD25	Linfocitos T Regulatorios	APC
CD4		FITC
FOXP3		PE

Ensayo de actividad de la enzima arginasa

Se obtuvo bazo, tumor y pulmón de los ratones portadores de tumor, tratados o no con Indo y de ratones normales. Se disgregó el tejido mecánicamente utilizando el equipo Ultra Turrax T25 (IKA Labortechnik), en solución tampón fosfato (PBS). Para activar la enzima, los homogenatos se incubaron por 10 min a 56 ℃ en presencia de 10 µl de Cloruro de Manganeso (en agua destilada, PH=7,4), luego se agregaron 100 µl de arginina (en agua destilada 0,5 M PH=9,7-9,8) y se incubaron las muestras a 37℃ por dos horas. Se construyó una curva *standard* de urea que se preparó a partir de una solución de urea (Timper) en agua destilada 150 µg/100 µl y luego se realizaron diluciones seriadas. Como control se utilizó agua destilada. Las diluciones *standard* y las muestras se incubaron 45 min a 95-100℃ en presencia de 900 µl de una solución de ácidos (H_2O:H_2SO_4(96%):H_3PO_4(85%) en relación 7:1:3) y

una solución de α-isonitrosopropiofenona (Sigma-Aldrich) al 6% en etanol absoluto. Se evaluó la absorbancia en un lector de ELISA (Labsystems) a 540nm (108).

Ensayo de hipersensibilidad retardada (HR)

Preparación de células formalinizadas

Células LP07 previamente lavadas con solución tampón fosfato se resuspendieron en 25 volúmenes de formol neutro (PH=7,4) y se dejaron 12 hs a temperatura ambiente. Se lavaron 2 veces y se resuspendió la muestra final en solución fisiológica.

Ensayo de HR *in vivo*

Se inyectaron $5x10^5$ células LP07 formalinizadas de subcutánea en la almohadilla plantar de ratones portadores de tumor de 10, 20 y 30 días de crecimiento, y tratados o no con Indo. En la almohadilla contralateral se inyectó solución fisiológica como control. Luego de 24 hs se midió el grosor de la almohadilla con un calibre neumático y se calculó el engrosamiento (HR) del la almohadilla plantar como: Grosor 48 hs post-inoculación – Grosor pre-inoculación.

Obtención de CMS de bazo

Se obtuvieron suspensiones unicelulares provenientes de bazos de ratones portadores de tumor tratados o no con Indo de 30-33 días y se repitió el proceso de preparación de tejidos para citometría. Se aislaron las células $CD11b^+GR1^+$ (CMS) por la técnica de separación celular utilizando el equipo FacsAria I, obteniendo un porcentaje de pureza de más del 95%. Se utilizó paralelamente la técnica de separación magnética de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Miltenyi Biotec), alcanzando un porcentaje de pureza de alrededor del 85%.

Preparación del factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF)

Se utilizó el hibridoma J588 productor de GM-CSF. Se descongelaron las células, se lavaron por centrifugación con RPMI suplementado con 10% SFB y se sembraron en una placa de Petri con 10 ml de RPMI suplementado con 10%SFB y antibiótico/antimicótico (Gibco 15240). Se dejaron toda la noche en estufa gaseada con 5% de CO2 a 37℃ y al día siguiente se incorporaron 20mg/ml de geniticina. Luego de 24-48 hs se lavaron dos veces con solución tampón fosfato libre de LPS y se dividió la muestra en dos frascos de cultivo T175 con 200ml RPMI completo. Luego de 5 días se recogió el sobrenadante y se filtró con filtros de 0,22 μm.

Preparación de medio condicionado de LP07 y B16

Células LP07 y B16 fueron cultivadas de acuerdo a las especificaciones de cada línea celular. Al alcanzar a una confluencia del 80% se descartó el sobrenadante, se lavó una vez con solución fosfato estéril y se agregó RPMI (GIBCO) suplementado con antibiótico/antimicótico, sin SFB. A las 12-18hs se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 1000 RPM, 10 min. Se congeló a -80° hasta su uso.

Obtención de CMS a partir de medula ósea

Se sacrificaron ratones normales BALB/c o C57BL/6 de 6-8 semanas de edad y se colectaron los fémures de ambos miembros posteriores. Se desprendió el tejido circundante al hueso mecánicamente y, en esterilidad, se obtuvieron las médulas óseas por presión con jeringa de 5 ml y aguja 25 mm. Se resuspendieron en RPMI suplementado con 10% SFB, 50μM β-mercaptoethanol (Gibco), 1mM HEPES (Gibco), 10% GM-CSF (obtenido del sobrenadante de células J588) y se centrifugaron a 2000 RPM por 10 min. Luego se lisaron los glóbulos rojos y se lavó nuevamente la solución por centrifugación. El precipitado celular fue dividido en cuatro partes iguales para realizar los diferentes tratamientos.

Producción de CMS a partir de progenitores de médula ósea

Los progenitores de médula ósea obtenidos como se detalla anteriormente fueron cultivados por 4 días en presencia de RPMI suplementado con 10% SFB, 50μM β-mercaptoethanol (Gibco), 1mM HEPES (Gibco), 10% GM-CSF y antibiótico/antimicótico. A este medio tradicional de diferenciación, se le agregaron los tratamientos detallados en la tabla 2.

Tratamiento	**Denominación**
Medio tradicional	CMS normales (CMS_{norm})
10 μM Indo	CMS normales tratadas con Indo ($CMS_{norm+Indo}$)
10% Medio condicionado LP07/B16	CMS tumorales (CMS_{tum})
10% Medio condicionado LP07/B16 + 10 μM Indo	CMS tumorales tratadas con Indo ($CMS_{tum+Indo}$)

Se determinó la pureza de cada población $CD11^+GR1^+$ obtenida después de cada tratamiento mediante citometría, obteniéndose una pureza mayor al 90%.

Reacción mixta leucocitaria (RML)

Se co-cultivaron $5x10^5$ esplenocitos de ratones BALB/c con $1x10^5$ esplenocitos irradiados de ratones C57BL/6 (5:1 relación célula respondedora: estimuladora), en RPMI suplementado con 10% SFB, 50μM β-mercaptoetanol, 1mM HEPES, antibiotic/antimicotic. Luego se agregaron $1x10^5$ CMS (5:1 relación célula respondedora: CMS) de bazo de ratones portadores de tumor tratados o no con Indo o CMS de médula ósea normal. Después de 4 días de incubación se agregó timidina tritiada (^{3}H-timidina) y se midió la proliferación celular de los esplenocitos de BALB/c en un contador de centelleo (Perkin Elmer). Para ensayar las CMS de la cepa C57BL/6, se utilizaron esplenocitos de C57BL/6 como respondedores y

esplenocitos de BALB/c irradiados como antígeno. Se mantuvieron las proporciones de todas las poblaciones celulares.

Transferencia adoptiva

CMS esplénicas o de médula ósea (5 x10^5 /300µl de tampón fosfato) fueron transferidas i.p. a ratones BALB/c 3 días después de la inoculación de 3x10^5 células LP07. Como control del crecimiento tumoral se dejó un grupo de ratones inoculados con LP07 sin transferir. Para la observación de las células inoculadas, se marcaron con 2µl de colorante diacetato de carboxifluoresceína succinimidil éster (CFDA-SE, Molecular probes, Life Technologies) a 37℃ en solución tampón fosfato, se centrifugaron durante 5 min a 2000 RPM y se resuspendieron por 30 min a temperatura ambiente en el medio de diferenciación tradicional, pasado el tiempo se lavó una vez y se resuspendieron en solución tampón fosfato para su inoculación. El crecimiento tumoral se evaluó como se detalla para el crecimiento subcutáneo de los tumores.

Inducción de la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE)

Ratones

Se utilizaron C57BL/6, criados en el Bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (Bs.As., Argentina). El péptido encefalitogénico correspondiente a la secuencia murina MOG_{35-55} (M-E-V-G-W-Y-R-S-P-F-S-R-V-V-H-L-Y-R-N-G-K) fue sintetizado por el Laboratorio de Biopolímeros de la Universidad de Californa y purificado por HPLC hasta llegar a más del 99% de pureza. Los ratones fueron inmunizados s.c. en los flancos derecho e izquierdo con 150 µg del péptido MOG_{35-55}, emulsificado previamente en adyuvante completo de Freund (CFA, Sigma Aldrich), junto con 200 µg de *Mycobacterium Tuberculosis* (Difco Laboratories). Al mismo tiempo, los ratones recibieron 200 ng. de toxina pertussis (TP, List Biological Laboratories Inc.) en 0,2 ml de solución tampón fosfato. 48 hs después de la inmunización se repitió la inyección con TP. Los ratones se observaron diariamente

para evaluar el *score* siendo: 0, sin enfermedad; 1, pérdida del tono muscular de la cola; 1,5, pérdida de habilidad para mantenerse derecho; 2, debilidad de las extremidades posteriores; 3, parálisis de los miembros posteriores; 4, cuadriparesia; 5, moribundo. Los animales fueron mantenidos de acuerdo a las guías de cuidado animal del Instituto Nacional de Salud (NIH) (109).

Tratamiento con CMS de médula ósea

Los 4 grupos experimentales de CMS de médula ósea detallados en la tabla 2 se inyectaron por vía intra peritoneal ($5x10^5$ cel./ 300 µl solución fisiológica) a animales con *score* 1. Se evaluó la evolución de la EAE observando el *score* día por medio, luego de la transferencia celular.

Western Blot

Las CMS se lisaron con la solución tampón RIPA (20 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM de NaCl, 1% de Nonidet P-40, 0,5% de deoxicolato de sodio, 1 mM de EDTA y 0,1% de SDS) suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (*Protease Inhibitor Cocktail*, Sigma-Aldrich). Se midió la concentración proteica de las muestras mediante el método de Bradford. Los lisados se mezclaron con solución tampón de siembra con 5% de β- mercaptoetanol, se calentaron a 95˚C durante 5 min y se sembraron en geles de poliacrimilamida del porcentaje adecuado. La electroforesis se desarrolló en una solución tampón Tris-Glicina. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF. La detección inmunológica se realizó con los anticuerpos primarios para CCAAT-enhancer-binding protein-β (C/EBP-β, 1/1000, Cell Signaling) luego de la incubación con el anticuerpo secundario se detectaron las bandas específicas con el reactivo ECL.

Determinación de la producción de Óxido Nítrico

Volúmenes iguales de sobrenadante del cultivo de CMS de médula ósea normal (100µl) se mezclaron con 100µl de reactivo de Griess (1% sulfanilamida en 5% ácido fosfórico y 0.1% *N*-1 dihidrocloruro de naftiletilendiamina in agua destilada).

Luego de 10 min de incubación a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 550 nm, usando un lector de microplaca de ELISA (LabSystems). La concentración de nitrito se determinó comparando la absorbancia de las muestras con las de una curva de nitrito de sodio (Diluciones seriadas partiendo de 0,1 mM; 110).

Producción de Especies Reactivas de Óxígeno

Se marcaron las CMS con 2 μM de dihidroetidio (DHE, Calbiochem) en RPMI 1640 durante 5 min a 37℃, luego de un lavado con RPMI 1640, se dejaron las células 30 min a temperatura ambiente en medio de diferenciación tradicional de CMS y se midió la fluorescencia por citometría de flujo (111).

Arreglo de genes de inmuno-tolerancia e inflamación

El ARN total de CMS tumorales y CMS tumorales tratadas con Indo se aisló por el protocolo de extracción con trizol (Life Technologies). Se generó el ADN copia por transcripción reversa utilizando el sistema Superscript III First-Strand (Life Technologies), con primers al azar. Se analizó la expresión de genes asociados a inflamación e inmuno tolerancia por la técnica de PCR en tiempo real del ADN copia, mediante el Arreglo de inmuno-tolerancia y anergia de linfocitos T (SABioscience). Los datos se analizaron con el programa de análisis de datos de arreglos de PCR (RT2 profiler PCR array data analysis software; http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php).

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc). Las barras representan las medias ± SEM. Para el ensayo de MLR y el análisis de porcentaje de CMS en bazo y ganglios de ratones con EAE se utilizó un ANOVA de un factor seguido de un post-test de Bonferroni; para analizar las diferencias significativas en el crecimiento tumoral, porcentaje de MDSC durante el crecimiento tumoral y la evolución de la EAE, se utilizó un ANOVA de dos factores

seguido de un post-test de Bonferroni. Valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadisticamente significativos.

RESULTADOS

La Indo reduce la progresión tumoral

Se estudió el efecto de la Indo sobre la progresión tumoral de modelo experimental de cáncer de pulmón no microcítico LP07 (101), confirmando los resultados del ensayo realizado anteriormente por el grupo (107).

Así, el tratamiento in vivo con Indo disminuyó significativamente el crecimiento tumoral de las células LP07 (Fig. 1). Además se observó la disminución de los síndromes paraneoplásicos asociados a la progresión tumoral del modelo experimental LP07 y reportada en trabajos previos del grupo (101, 107, 112).

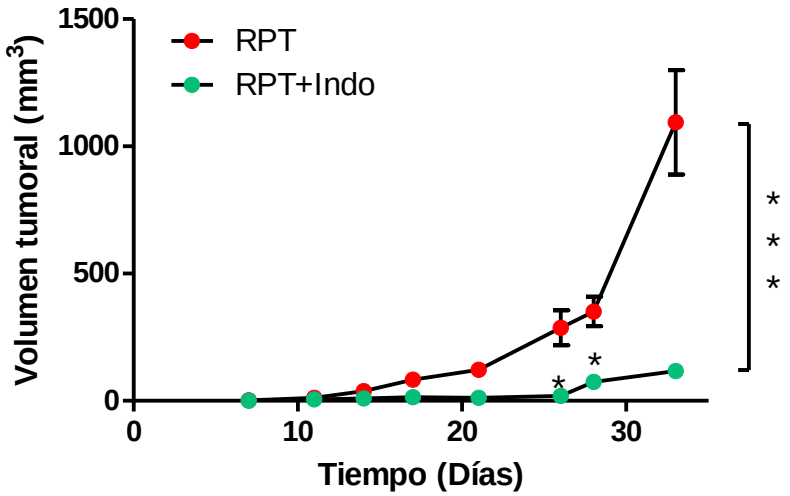


Figura 1A: El tratamiento con indometacina disminuye el desarrollo tumoral LP07. Ratones BALB/c se inocularon con $3x10^5$ células tumorales LP07, a un grupo se lo trató con Indo por vía oral en el agua de bebida (concentración final 10µM). Se registró el volumen tumoral con un calibre cada 2 días. Se muestran los promedios de 8 ratones por grupos. Gráfico representativo de 3 experimentos independientes, con resultados similares. P< 0,001.

La acción de la Indo posee mecanismos independientes de la COX-2 tumoral

Numerosos trabajos revelan la independencia de COX-2 de los AINEs para ejercer algunas de sus funciones (116, 117). Por lo tanto, estudiamos el efecto del tratamiento *in vivo* con Indo en ratones portadores de un tumor LP07 que no expresa COX-2

(LP07 $^{-COX\text{-}2}$).

En primer lugar encontramos una disminución en el crecimiento tumoral de la línea LP07$^{-COX\text{-}2}$, comparada con el control. Esta disminución del tamaño del tumor fue similar a la observada en los RPT que sólo estaban bajo tratamiento con Indo (volumen RPT+Indo a 33 días: 117mm^3, RPT$^{-COX\text{-}2}$ a 33 días: 90 mm^3, Figura 1A y 1B). En segundo lugar, observamos que la combinación del silenciamiento de COX-2 con el tratamiento *in vivo* con Indo (LP07 $^{-COX\text{-}2}$ + Indo) disminuyó significativamente el crecimiento tumoral, comparado con el grupo que sólo recibió las células silenciadas para COX-2 (LP07 $^{-COX\text{-}2}$; Figura 1B).

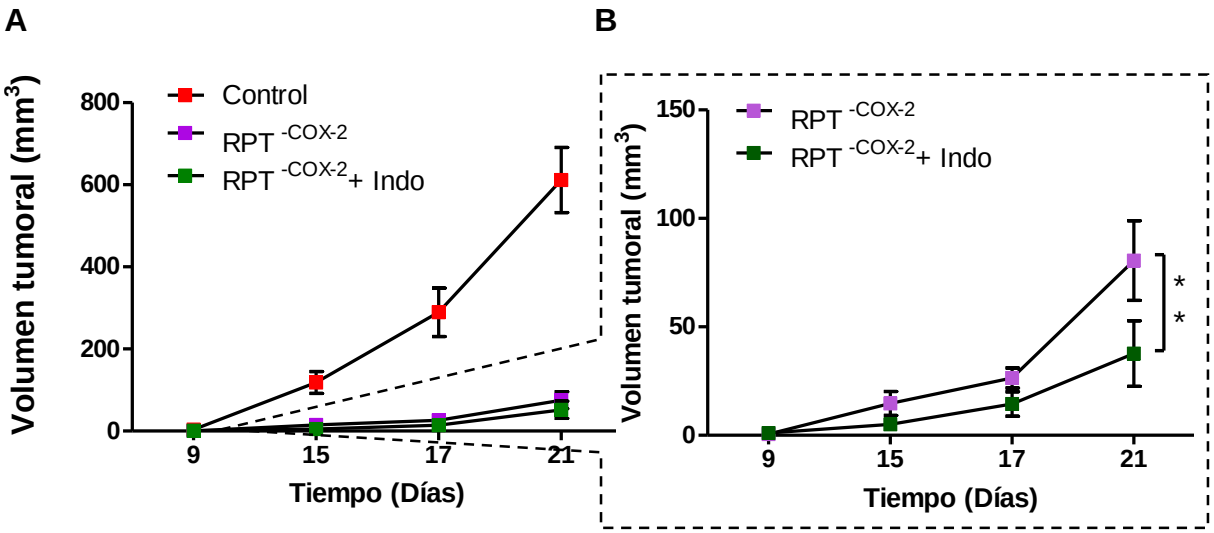


Figura 1B: La acción de la Indo posee mecanismos independientes de la COX-2 tumoral. **A**, Ratones BALB/c fueron inyectados con $3x10^5$ LP07 o LP07 silenciadas para el gen de COX-2 (producidos por el Dr. Peluffo), se midió el volumen tumoral cada 3 días. **B**, inserto de figura A, donde se muestra con mayor aumento la diferencia significativa en el crecimiento tumoral de la combinación LP07^{-COX-2} con el tratamiento *in vivo* con Indo. El control (RPT) son células LP07 infectadas con adenovirus portando un ARNhc contra GFP. ANOVA de dos factores, P< 0,01. Se muestran promedios de 10 ratones por grupo. Gráfico representativo de 2 experimentos independientes, con resultados similares.

La Indo inhibe el microambiente inmunosupresor

El tratamiento con indometacina revierte el aumento de CMS asociado a la progresión tumoral

El tumor LP07 secreta, durante su crecimiento *in vivo*, GM-CSF, IL-6 e IL-1β, además de producir elevados niveles de PGE_2 como producto de la alta expresión de COX-2 por las células tumorales. Como consecuencia de la secreción de estos factores, se genera una respuesta inflamatoria sistémica (101, 112). Dado que se sabe que las CMS son inducidas por estos factores pro-inflamatorios (113, 114) estudiamos la presencia de esta población en bazo, tumor y ganglios drenantes de ratones portadores de tumor y el efecto del tratamiento con Indo sobre esta población celular regulatoria. El tumor LP07 se desarrolla a lo largo de 30-35 días, caracterizándose la última etapa por un tamaño tumoral de aprox. 1000 mm^3, pronunciada caquexia, hipercalcemia y leucocitosis, y presencia de metástasis pulmonares. Por lo tanto, para correlacionar la proporción de CMS con la progresión tumoral, se analizaron los valores de CMS en los siguientes tiempos: 1) 10 días, etapa temprana, 2) 20-23 días, etapa media y 3) 30-35 días, etapa tardía de la progresión tumoral. Se utilizaron ratones normales como control.

Por citometría de flujo observamos un aumento del porcentaje de CMS en bazo y ganglios drenantes del tumor (GDT) que se correspondió con la evolución tumoral, siendo significativamente mayor a etapas tardías de portación (33 días). En bazo el porcentaje de CMS alcanzó aproximadamente un 30% de la población total de esplenocitos, dato que concuerda con lo reportado para varios tipos tumorales en bibliografía (39). El tratamiento con Indo no sólo previno el aumento de CMS en ambos órganos linfáticos sino que además encontramos una disminución significativa el porcentaje de CMS intra-tumorales comparado con el grupo RPT (Figura 2A, B y C).

Posteriormente evaluamos la proporción de linfocitos T regulatorios y linfocitos T CD8 en los GDT de los ratones portadores de tumor tratados (RPT+Indo) o no (RPT) con Indo. El tratamiento con Indo aumentó la proporción de linfocitos T

CD8 y redujo la proporción de T regs (Figura 2D y F). Encontramos además un aumento en la población de linfocitos T CD8 intra-tumoral (Figura 2E). Por otro lado, a raíz del tratamiento con Indo se produjo un aumento en la expresión del marcador GR1 en la población CMS esplénica de RPT+Indo (Figura 2A derecha y abajo).

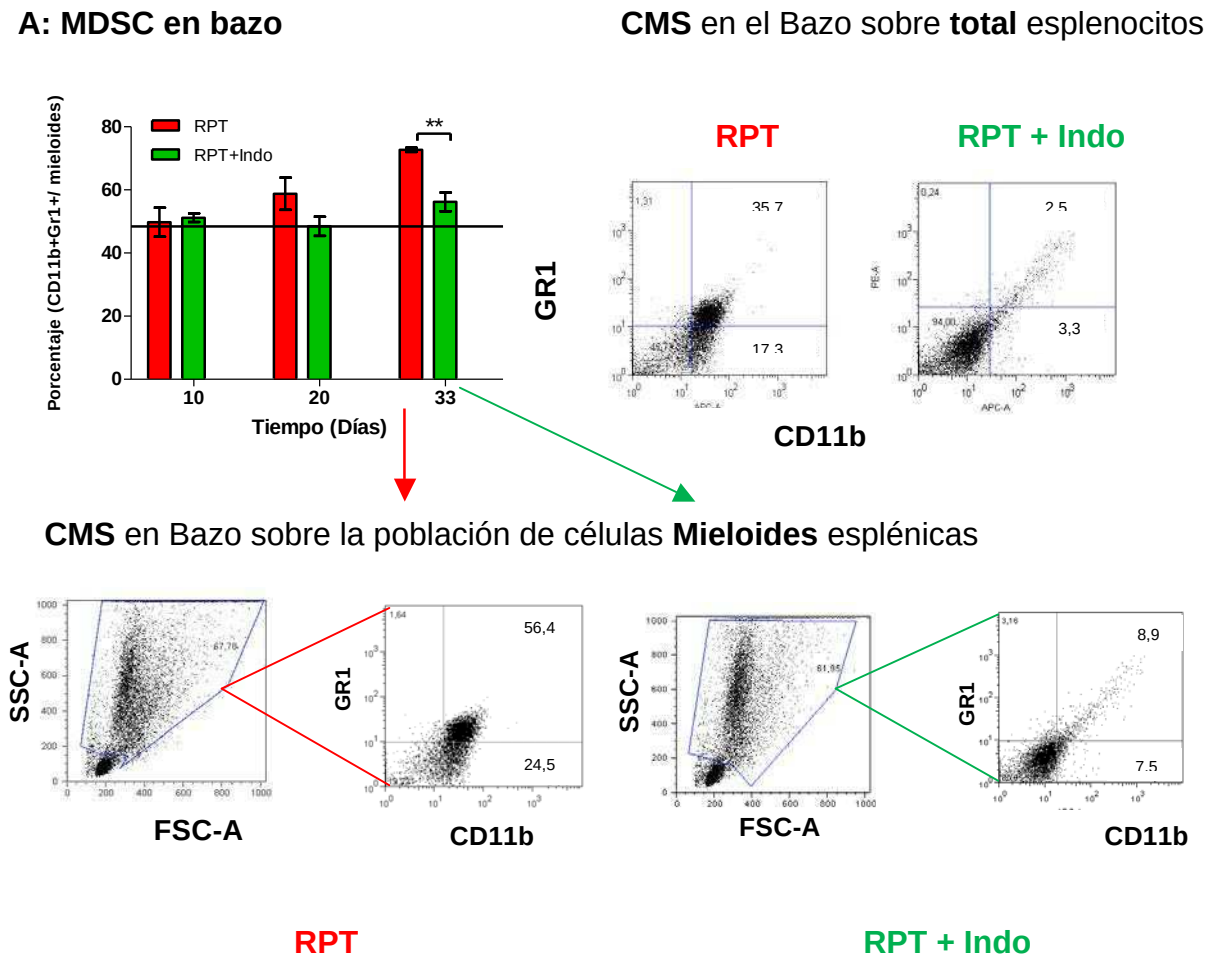
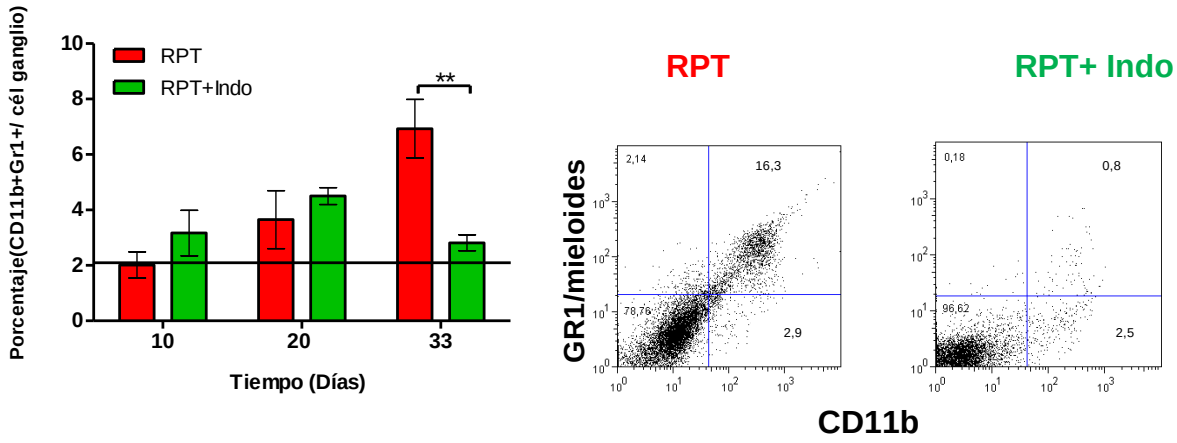


Figura 2. El tratamiento con indometacina regula la proporción de células inflamatorias durante la progresión del tumor LP07. A, Se analizó el contenido de CMS por citometría en esplenocitos extraídos de RPT y RPT+Indo a los 10, 20 y 33 dias de portación (n=5) (RPT 33 días vs Control P< 0,01; RPT 33 días vs RPT+Indo 33 días P< 0,01). Se utilizaron esplenocitos de ratones normales como control (n= 5). Derecha arriba**,** se muestra el porcentaje de CMS esplénicas sobre el total de esplenocitos analizados y abajo, sobre el subgrupo de células mieloides. Gráfico representativo de 3 experimentos independientes con resultados similares.

B: Porcentaje de CMS en GDT



C: **Porcentaje de CMS en tumor**

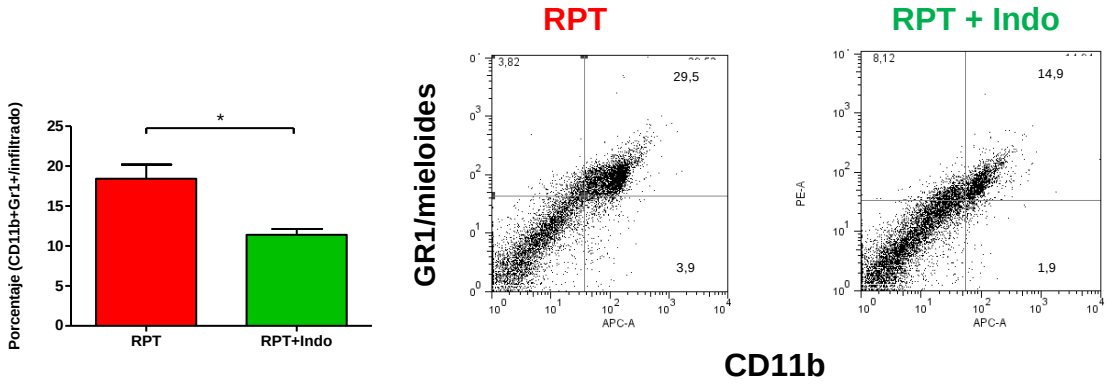


Figura 2 B, porcentaje de CMS en ganglios drenantes del tumor, extraídos de RPT y RPT+Indo a los 10, 20 y 33 días de portación (n=6) (RPT 33 días vs. Control P< 0,05; RPT día 33 vs RPT+Indo día 33 P< 0,01). Se utilizaron ganglios inguinales y axilares de ratones normales como control (n=6). **C,** se repitió el procedimiento para los tumores (n=8) (RPT 33 días vs RPT+Indo 33 días P< 0,05). Los valores control se representan con una línea recta horizontal. Graficos de barras muestra promedio de todas las muestras de cada grupo y los gráficos de puntos muestran ejemplos de 1 muestra de cada grupo. Gráficos representativos de 2 experimentos independientes con resultados similares.

D: Porcentaje de linfocitos T CD8 en GDT

Histogramas

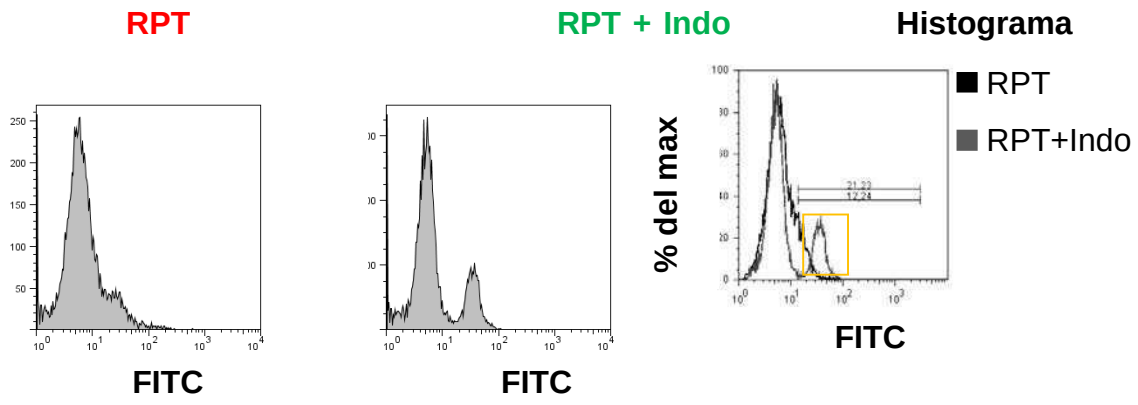
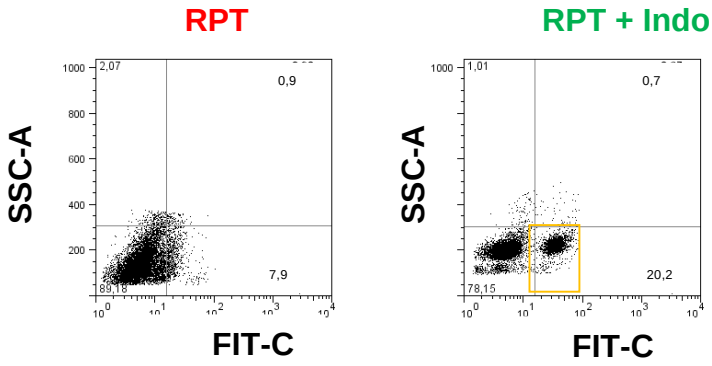
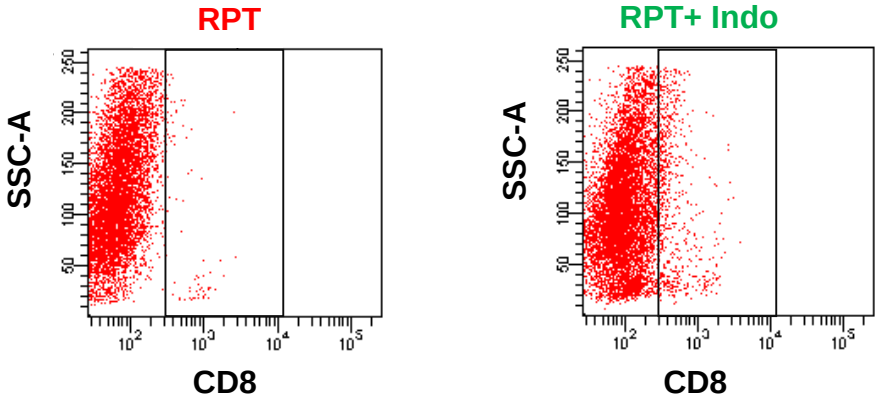


Gráfico de puntos

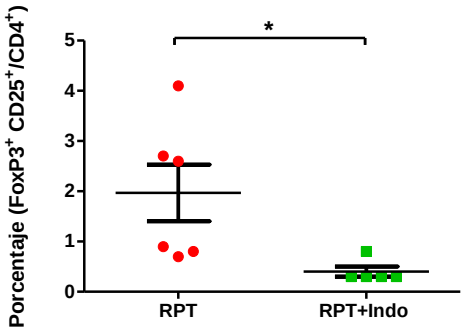


E: Porcentaje de linfocitos CD8 en tumor



F: Porcentaje de T regs en GDT

Figura 2 D, Se analizó el porcentaje de Linfocitos T CD8 en los ganglios drenantes del tumor, se muestran los resultados en forma de histograma y gráfico de puntos. **E,** tumor de RPT y RPT+Indo a día 33 de portación. Gráficos representativos de 2 experimentos independientes con resultados similares.



F, Se analizó el porcentaje de linfocitos T regulatorios en los ganglios drenantes del tumor de RPT y RPT+Indo a día 33 de portación. P<0,05, n=6. Gráfico de 2 experimentos independientes promediados.

El tratamiento *in vivo* con Indo revierte el aumento de actividad arginasa

La enzima arginasa (ARG) es uno de los principales mecanismos de inmuno-supresión utilizados por las CMS sobre la actividad y proliferación de linfocitos T (61). En este sentido, analizamos la actividad ARG en el tumor, el bazo y los pulmones (sitio de metástasis del tumor subcutáneo LP07) de ratones portadores de tumor LP07 y portadores tratados *in vivo* con Indo a diferentes tiempos de la progresión tumoral (las tres etapas definidas anteriormente).

La actividad de ARG se midió por el método colorimétrico de medición de urea y se utilizaron tejidos de ratones normales, como control.

La actividad ARG aumentó en el bazo (Normales 115 μgUrea/mg proteína vs. RPT 33 días 282 μgUrea/mg proteína $P< 0,01$), pulmón (Normales 30 μgUrea/mg proteína vs. RPT 33 días 107 μgUrea/mg proteína $P< 0,001$); y tumor (RPT 10 días 3.359 μgUrea/mg proteína v. RPT 33 días 827.100 μgUrea/mg proteína $P< 0,01$), con la progresión tumoral (Figura 3A Bazo, 3B Pulmón, 3C Tumor).

Por el contrario, cuando los ratones portadores de LP07 fueron tratados *in vivo* con Indo, la actividad ARG permaneció dentro de los valores normales en bazo y pulmón (Figura 3A y C), y en el tumor disminuyó significativamente en etapas avanzadas de portación, comparado con el grupo portador RPT (Figura 3B).

A

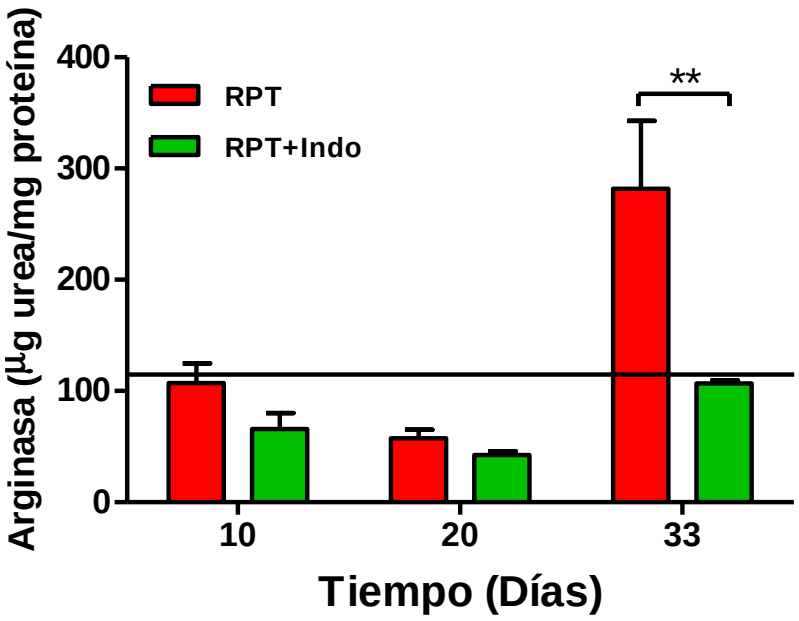
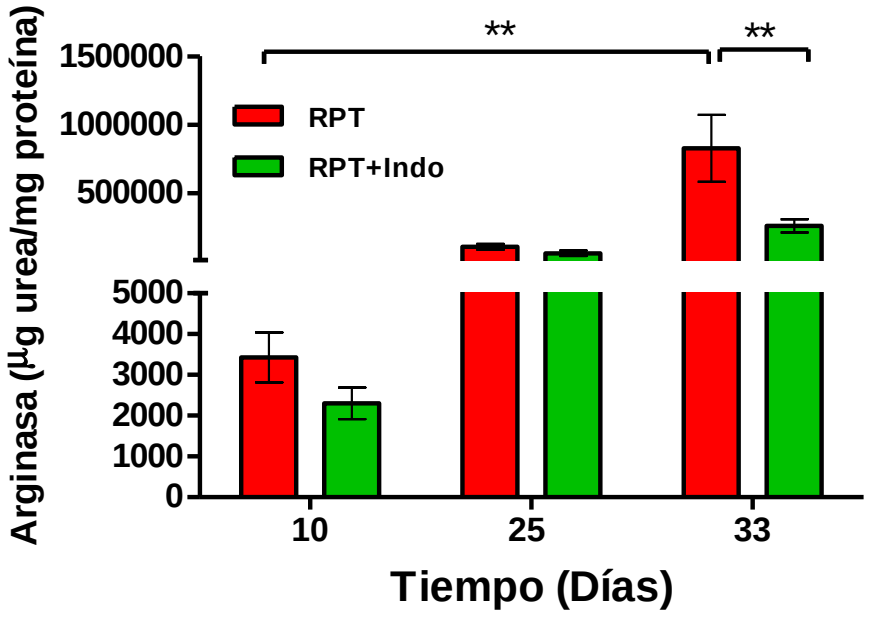


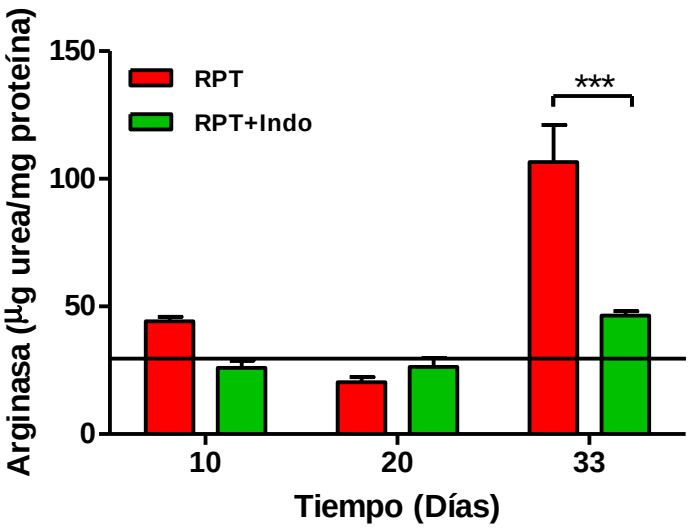
Figura 3. El tratamiento con Indo disminuye la actividad ARG in vivo. Se midió, como producto de la actividad ARG, la producción de urea en **A,** Bazos extraídos a los 10, 20 y 30 días post-inoculación de las células tumorales, de ratones portadores tratados o no con Indo (n=10) (RPT vs RPT+Indo P< 0,01; RPT 33días vs Control P< 0,01). Gráfico de 2 experimentos independientes promediados.

B



B, Tumores de RPT de 10, 20 y 33 días, tratados o no con Indo (n=10) (RPT vs RPT+Indo P< 0,01; RPT 33 días vs RPT 10 días P< 0,01). Gráfico de 2 experimentos independientes promediados.

C



C y pulmones (n=10) (RPT vs. RPT+Indo P< 0,001; RPT 33 días vs Control P< 0,001). Bazos y pulmones de ratones normales fueron utilizados como control (n=8) y se graficaron como una línea recta horizontal.

El tratamiento con Indo revierte la inmunosupresión sistémica provocada por la progresión tumoral

Dado que observamos un aumento en la población de CMS y la actividad arginasa, con la progresión tumoral, lo que podría ser un indicador de inmuno-supresión sistémica (115, 116), evaluamos la respuesta inmunológica sistémica específica contra el tumor realizando un ensayo de hipersensibilidad retardada en RPT y RPT+Indo. Este ensayo *in vivo* permite evaluar el estado de la respuesta inmunológica específica contra el tumor pero a nivel sistémico y dependiente, mayoritariamente de la respuesta Th1 (117). Se estudió la capacidad de responder al antígeno tumoral en las mismas tres etapas que evaluamos anteriormente mediante el método de HR (Tabla 3). El sistema inmunológico de ratones portadores de tumor fue capaz de responder al antígeno tumoral durante las primeras dos etapas, la temprana y la media (10 y 20 días respectivamente), sin embargo a etapas tardías, correspondiendo al aumento significativo de CMS en bazo y GDT y de actividad arginasa en bazo, tumor y pulmón, el sistema inmunológico de estos ratones fue incapaz de generar inflamación en respuesta al antígeno tumoral. El tratamiento con Indo revirtió este efecto inmunosupresor sistémico generado por el tumor, ya que aún a etapas tardías (33 días) el sistema inmunológico de los ratones tratados siguió respondiendo frente al antígeno tumoral. Este efecto se correlacionó además con una mayor proporción de linfocitos T CD8 y una menor proporción de linfocitos T regs en ratones tratados con Indo.

Hipersensibilidad Retardada

	RPT		RPT + Indo	
Días	LP07	SF	LP07	SF
14	0,16 ± 0,08	0,05 ± 0,05	0,15 ± 0,09	0,03 ± 0,03
22	0,17 ± 0,06	0,02 ± 0,03	0,17 ± 0,05	0,014 ± 0,02
35	0,06 ± 0,05	0 ± 0,03	0,14 ± 0,04	0,02 ± 0,04

Tabla 3: Hipersensibilidad Retardada. Ratones portadores de LP07 fueron inyectados con $5x10^5$ células LP07 formalinizadas en la almohadilla plantar. Se midió el diámetro de la almohadilla plantar en tiempo 0 y post-48hs. El control se realizó con solución fisiológica en la pata contra-lateral. Gráfico del promedio de 8 ratones por grupo. $P<0,05$.

El tratamiento con Indo disminuye la capacidad supresora de CMS en RPT

Siguiendo el estudio del efecto de la Indo sobre las CMS y habiendo observado una reducción en la cantidad de esta población en RPT tratados, nos propusimos estudiar el efecto del tratamiento sobre la capacidad supresora propia de las CMS.

Primero realizamos una reacción mixta leucocitaria (RML), para evaluar la capacidad supresora de las células $Gr1^+CD11b^+$ observadas en bazo de RPT. Este ensayo es necesario para la identificación de la población $Gr1^+CD11b^+$ como CMS, ya que estos marcadores son compartidos por otras células mieloides en distinto estado de diferenciación tales como neutrófilos, los cuales no poseen una capacidad supresora intrínseca (118). Por lo tanto, para asegurarnos que las células $Gr1^+CD11b^+$ presentes en el modelo tumoral LP07 fueran efectivamente CMS debimos evaluar su capacidad de suprimir la proliferación de linfocitos T in vitro (63). Utilizamos como antígeno estimulador de la proliferación, esplenocitos de ratones C57BL/6, generando así la proliferación de los linfocitos T respondedores BALB/c, por reacción alogeneica.

Observamos una disminución en la proliferación de linfocitos T respondedores que se co-cultivaron en presencia de CMS aisladas y purificadas de bazo de RPT (Figura 4A), evidenciando la función supresora de las células $Gr1^+CD11b^+$ y pudiendo identificarlas como CMS. En segundo lugar, las CMS aisladas de bazo de RPT tratados con Indo fueron incapaces de suprimir la proliferación de linfocitos T frente al antígeno alogeneico (Figura 4A), indicando que el tratamiento con Indo *in vivo* afectó la capacidad supresora de las CMS esplénicas.

En segundo lugar, evaluamos la capacidad supresora de la respuesta anti-tumoral *in vivo*. Para ello realizamos un ensayo de transferencia adoptiva, en el que evaluamos la capacidad de las CMS de promover o disminuir la evolución tumoral (119). Ratones portadores de un tumor LP07 de 3 días fueron inoculados i.p. con $5x10^5$ CMS esplénicas de RPT y RPT+Indo. Durante 25-30 días se siguió el

crecimiento tumoral y se evaluó el efecto de la transferencia adoptiva sobre la evolución del tumor.

El crecimiento de los tumores de los ratones que fueron inoculados con CMS esplénicas provenientes de RPT fue similar al crecimiento de los tumores de los ratones control. En cambio, las CMS provenientes de RPT+Indo redujeron significativamente la progresión tumoral (Figura 4B).

Con el fin de descartar que el efecto del tratamiento con Indo sea específico del tumor LP07, realizamos el ensayo de transferencia adoptiva en el modelo animal de tumor mamario, 4T1. Para ello tratamos RPT 4T1 con la misma dosis de Indo y a etapas tardías de portación (18-20 días), en primer lugar observamos que el tratamiento con Indo disminuyó el crecimiento del tumor 4T1 (Figura 5A) y la carga metastásica (Figura 5B); en segundo lugar extrajimos CMS del bazo de ambos grupos de ratones y las transferimos a ratones portadores de 4T1. Observamos, al igual que con el modelo de tumor LP07, que la transferencia con CMS de RPT_{4T1}+Indo disminuyó la progresión tumoral de los ratones transferidos (Figura 5C).

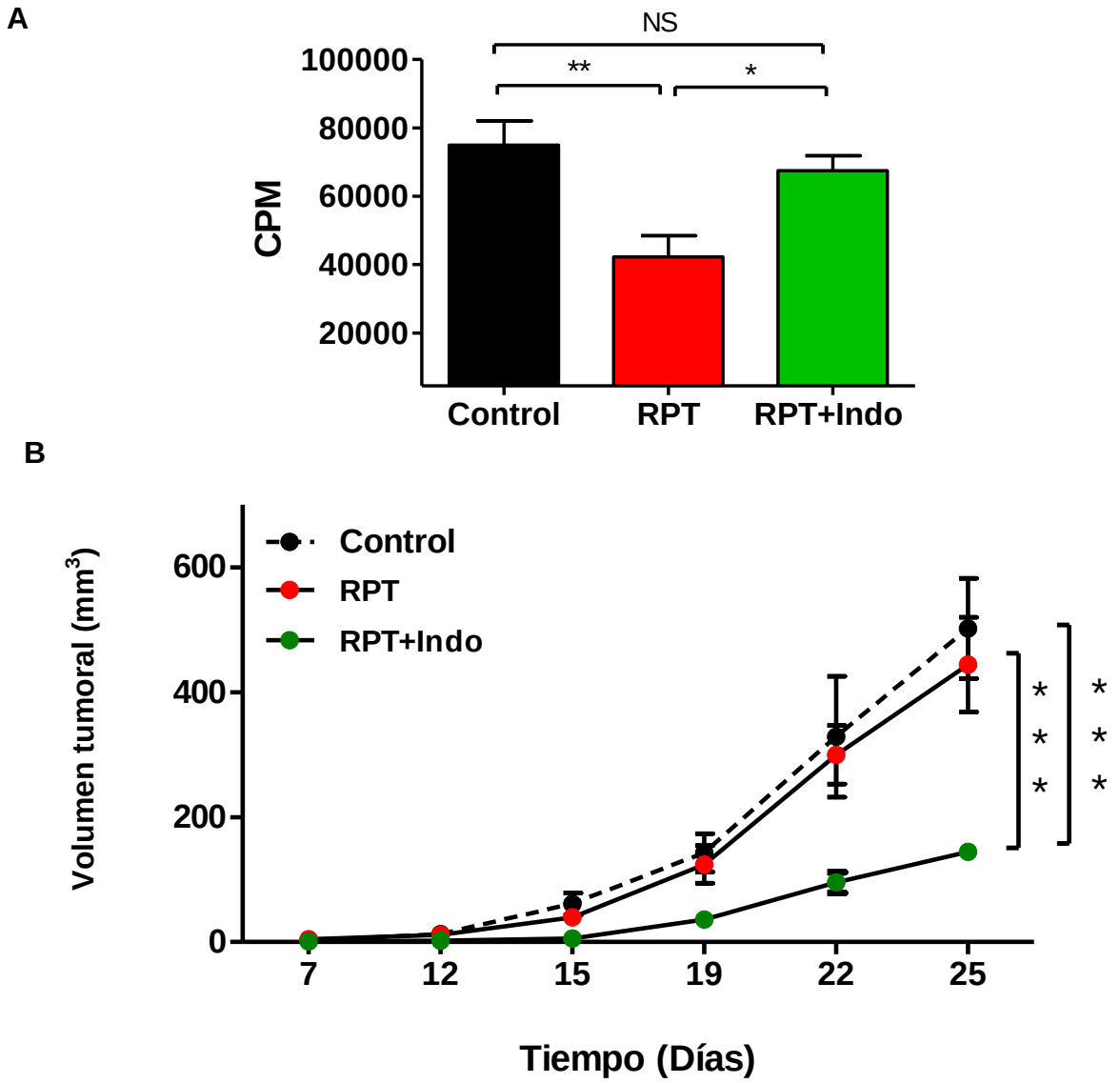
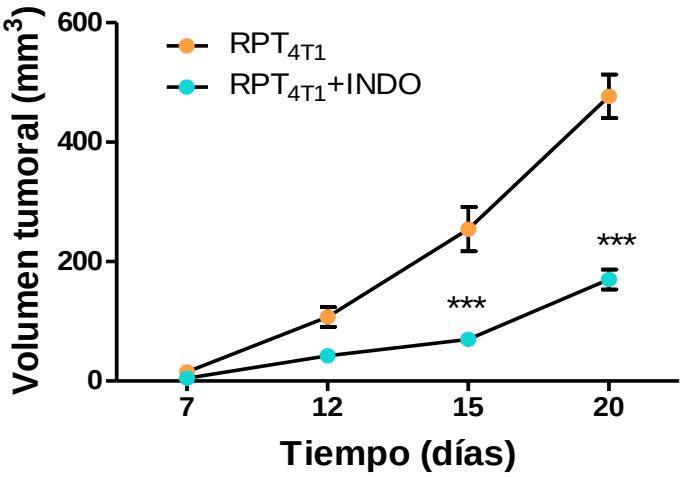


Figura 4. El tratamiento con indometacina disminuye la capacidad supresora de CMS en RPT. A, RML. CMS aisladas por *sorting* de esplenocitos totales de RPT y RPT+Indo (n=6), portando un tumor de 30 días fueron co-cultivadas con esplenocitos de ratones BALB/c normales (respondedores) y esplenocitos irradiados de ratones C57BL/6 normales (estímulo alogenéico). Esplenocitos de BALB/c cultivados en presencia del estímulo alogeneico fueron utilizados como control. RPT vs. Control P< 0,001; RPT vs RPT+Indo P< 0,001. CPM= Cuentas por minuto. Gráfico de 2 experimentos independientes promediados. **B**, Transferencia adoptiva. CMS aisladas por el mismo procedimiento se inocularon i.p. en ratones portadores de LP07(n= 8). El volumen tumoral de los ratones transferidos se midió con un calibre cada 3 días. RPT vs. RPT+Indo P< 0,001; RPT+Indo vs. Control P< 0,001. Gráfico representativo de 2 experimentos independientes con resultados similares.

A



B

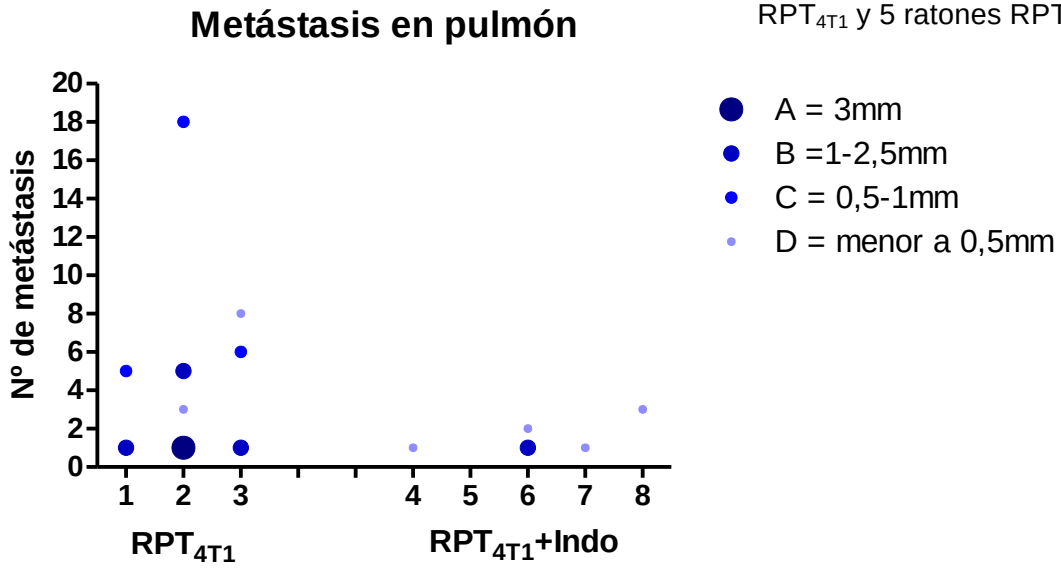
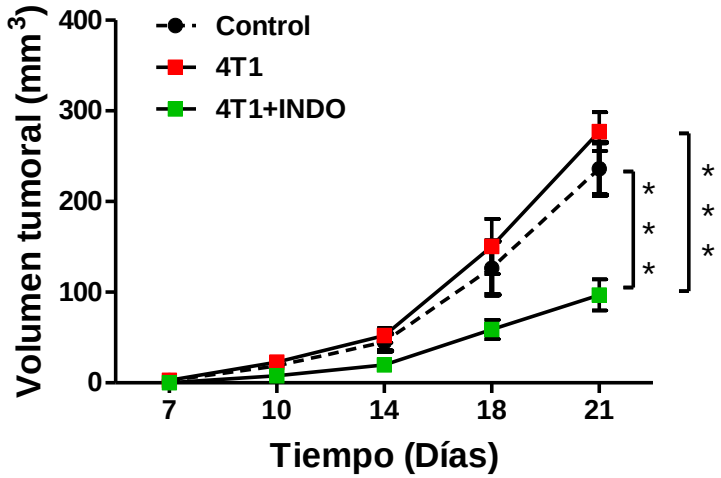


Figura 5. A, Crecimiento tumoral 4T1. Ratones portadores del tumor 4T1 fueron tratados in vivo con Indo 10µM. P< 0,001. B, Metástasis pulmonares de RPT_{4T1} y RPT_{4T1}+Indo. Se muestra el promedio de 8 ratones por grupo. **B,** Se obtuvieron los pulmones de ambos grupos experimentales a día 20 de portación y se observaron las metástasis bajo lupa estereoscópica. Se muestran 3 ratones RPT_{4T1} y 5 ratones RPT_{4T1}+Indo.

C



C, Transferencia adoptiva en el modelo 4T1. RPT_{4T1} vs. RPT_{4T1}+Indo P< 0,001; RPT_{4T1}+Indo vs. Control P< 0,001. Se muestra el promedio de 8 ratones por grupo.

El efecto de la Indo sobre las CMS depende del microambiente en el que se diferencian

Indo aumenta la capacidad supresora de CMS normales

Teniendo en cuenta que las CMS participan en patologías inflamatorias para restablecer la homeostasis del sistema inmunológico (120, 63, 121), decidimos estudiar el efecto del tratamiento con Indo sobre esta población diferenciada en un ambiente libre de tumor. Para ello, extrajimos células progenitoras de médula ósea proveniente de ratones normales BALB/c, y las incubamos durante 4 días en presencia del factor de GM-CSF, como se describió previamente (122, figura 6A). Para estudiar el efecto de la Indo sobre la actividad supresora de las CMS, incluimos en el medio de diferenciación Indo (10μM y 100μM). Las concentraciones fueron elegidas en base a los ensayos en vivo, ya que se determinó previamente que la concentración plasmática de Indo en ratones tratados por el agua de bebida es de entre 10μM y 20μM (97). Utilizamos, además, como prueba inicial una concentración diez veces mayor, sin embargo la descartamos ya que produjo alrededor de un 40% de muerte celular, lo que, junto con una concentración intermedia de 30μM nos permitió establecer la IC50 sobre las CMS (IC50=125μM).

Pasados los 4 días de diferenciación *in vitro* realizamos un ensayo de RML y evaluamos la capacidad de las CMS normales (CMS_{norm}) y las CMS normales tratadas con Indo ($CMS_{norm+Indo}$) de inhibir la proliferación de linfocitos T *in vitro.* Si bien estas células se diferencian en presencia de un factor presente en sitios de inflamación como GM-CSF, las llamamos normales para referirnos a las CMS que se inducen en inflamaciones no tumorales.

Para nuestra sorpresa, el tratamiento con Indo no sólo no disminuyó la actividad supresora de las CMS normales, sino que la aumentó significativamente (Figura 6B).

Indo disminuye la capacidad supresora de CMS tumorales

Con el fin de comparar el efecto del tratamiento con Indo en CMS_{norm} y aquellas diferenciadas en un microambiente tumoral, incluimos al medio de diferenciación tradicional, medio condicionado de LP07 (concentración final: 10%), y la combinación de medio condicionado (MC) e Indo (Figura 6A). Luego repetimos el ensayo de RML y observamos que las CMS diferenciadas en presencia de MC (CMS tumorales, CMS_{tum}) mostraron una capacidad supresora aumentada con respecto a las CMS_{norm} (Figura 6C).

En segundo lugar, el tratamiento con Indo sobre las CMS tumorales (CMS tumorales tratadas con Indo, $CMS_{tum+Indo}$) inhibió su capacidad supresora, similar a lo observado para las CMS esplénicas provenientes de ratones tratados con Indo *in vivo* (Figura 6D).

Encontramos un aumento del marcador GR1 en $CMS_{tum+Indo}$ comparado con $CMS_{tum,}$ este efecto del tratamiento con Indo no se observó en CMS_{norm} (Figura 6E).

A

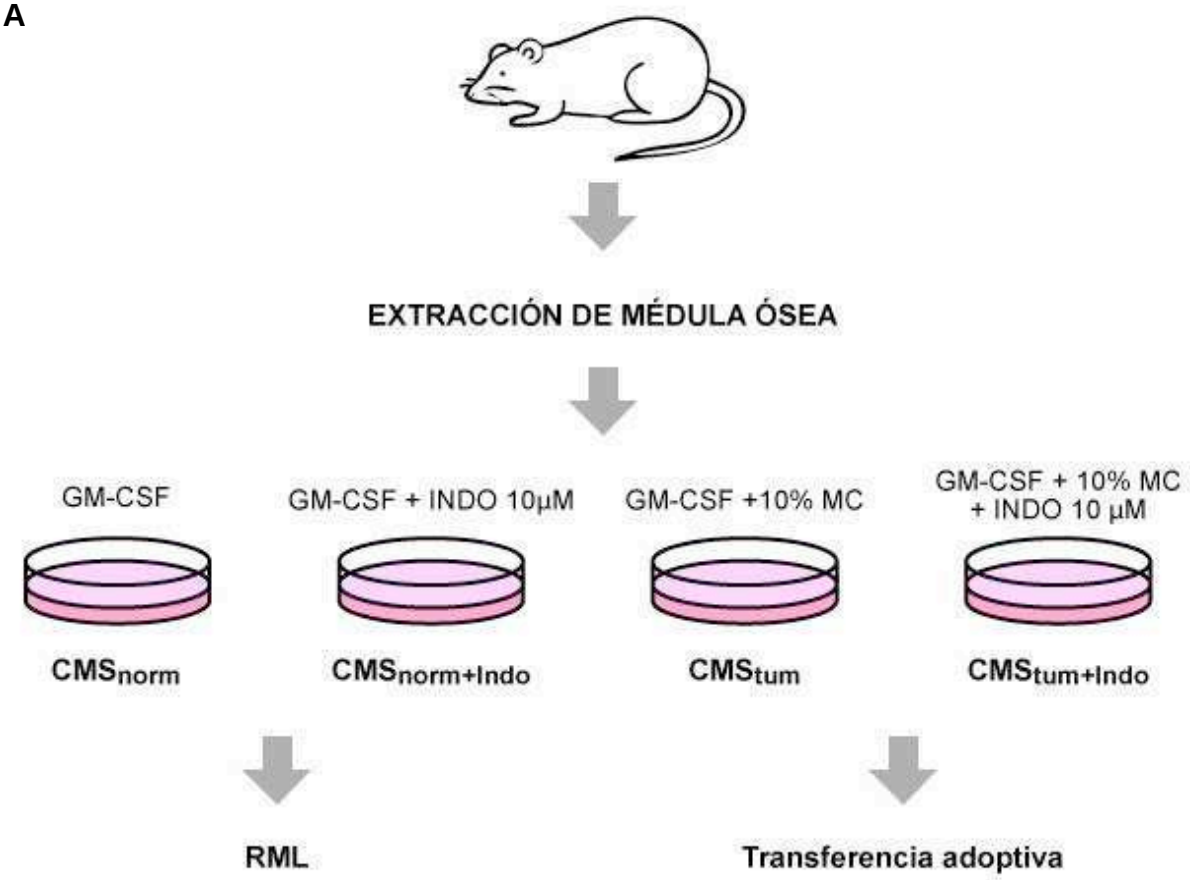


Figura 6. El efecto de la Indo sobre las CMS depende del microambiente en el que se diferencian. A, Esquema de tratamientos utilizados para la diferenciación de progenitores de médula ósea hacia CMS.

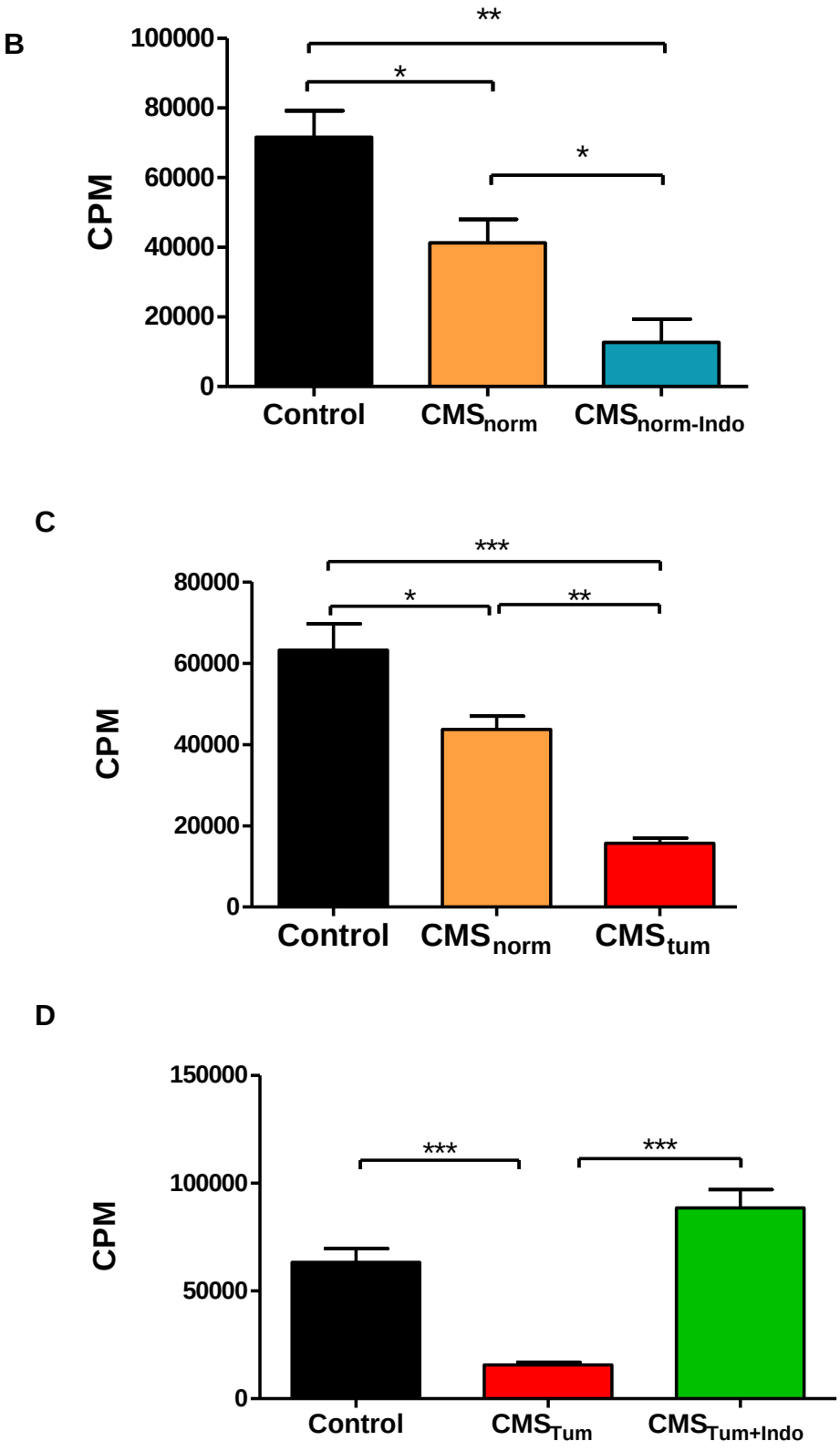


Figura 6 B, CMS_{norm} o $CMS_{norm+Indo}$ (n=9), se co-cultivaron con esplenocitos de ratones BALB/c en presencia de esplenocitos irradiados de C57BL/6, como antígeno alogeneico (Control vs. CMS_{norm} P< 0,05; Control vs. $CMS_{norm+Indo}$ P< 0,01; CMS_{norm} vs. $CMS_{norm+Indo}$ P< 0,05). **C**, CMS_{norm} o CMS_{tum} se co-cultivaron como se describe arriba (n=9) (Control vs. CMS_{tum} P< 0,001; CMS_{norm} vs CMS_{tum} P< 0,01). **D**, CMS_{tum} o $CMS_{tum+Indo}$ (n=9) se co-cultivaron como se describe arriba (CMS_{tum} vs. $CMS_{tum+Indo}$ P< 0,001). La proliferación de los Linfocitos T respondedores se evaluó por incorporación de timidina tritiada. Como control se utilizaron esplenocitos de BALB/c en presencia del antígeno alogeneico. Se muestran gráficos promedio de 3 experimentos independientes, de n=3 cada uno.

E

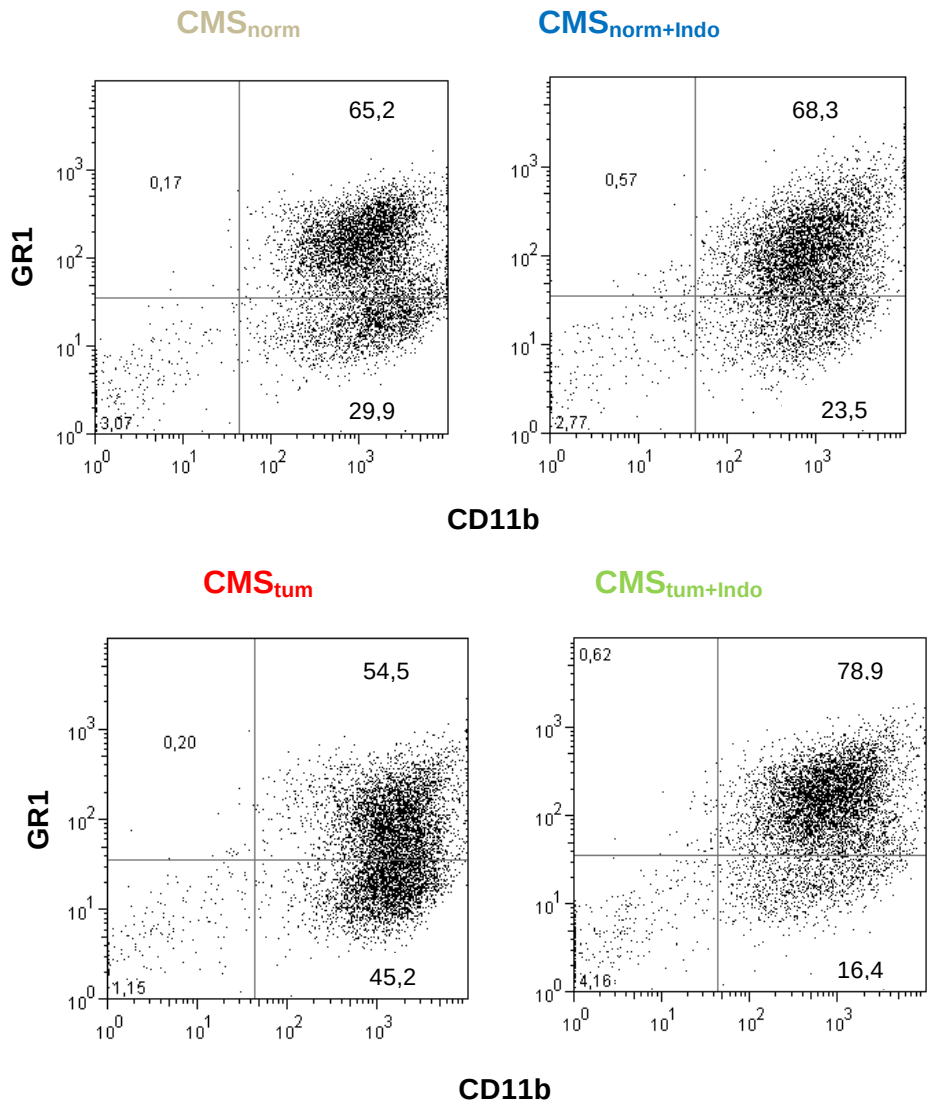


Figura 6 E. Citometría de flujo de CMS de m.o., luego de los 4 días de incubación con los diferentes tratamientos se evaluó la expresión de los marcadores GR1 y CD11b, sobre el total de células analizadas. Gráficos representativos de 3 experimentos independientes.

El efecto de Indo sobre las CMS depende del ambiente en el que se diferencian

Para continuar evaluando el efecto de Indo sobre las CMS normales y CMS tumorales, repetimos el ensayo de transferencia adoptiva con los 4 grupos experimentales detallados en la figura 6A. La transferencia adoptiva de las $CMS_{norm+Indo}$ o las CMS_{tum}, no tuvo efecto sobre el crecimiento tumoral; sin embargo la transferencia adoptiva de las $CMS_{tum+Indo}$ redujo significativamente el tamaño tumoral, comparado tanto con el control sin transferir (LP07 sólo) como con los grupos transferidos con $CMS_{norm+Indo}$ y CMS_{tum}. Los ratones transferidos con CMS_{norm} tuvieron una progresión tumoral disminuida con respecto a los ratones transferidos con CMS normales tratadas con Indo (Figura 7A).

La transferencia adoptiva con CMS tumorales tratadas con Indo modula las poblaciones inflamatorias en los ratones receptores

En el bazo no observamos una disminución de CMS totales en los ratones transferidos con $CMS_{tum+Indo}$, pero sí un aumento de CMS $GR1^{high}$ en detrimento de las CMS $GR1^{low}$ (Figura 7B), similar al observado en CMS esplénicas de ratones tratados con Indo *in vivo.* Observamos una disminución en la proporción de CMS GDT de ratones transferidos con $CMS_{tum+Indo}$ comparado con los ratones transferidos con CMS_{tum} y con el control sin transferir (Figura 7C). Al mismo tiempo, observamos un aumento de linfocitos CD8 en ganglios drenantes del tumor (Figura 7D).

A

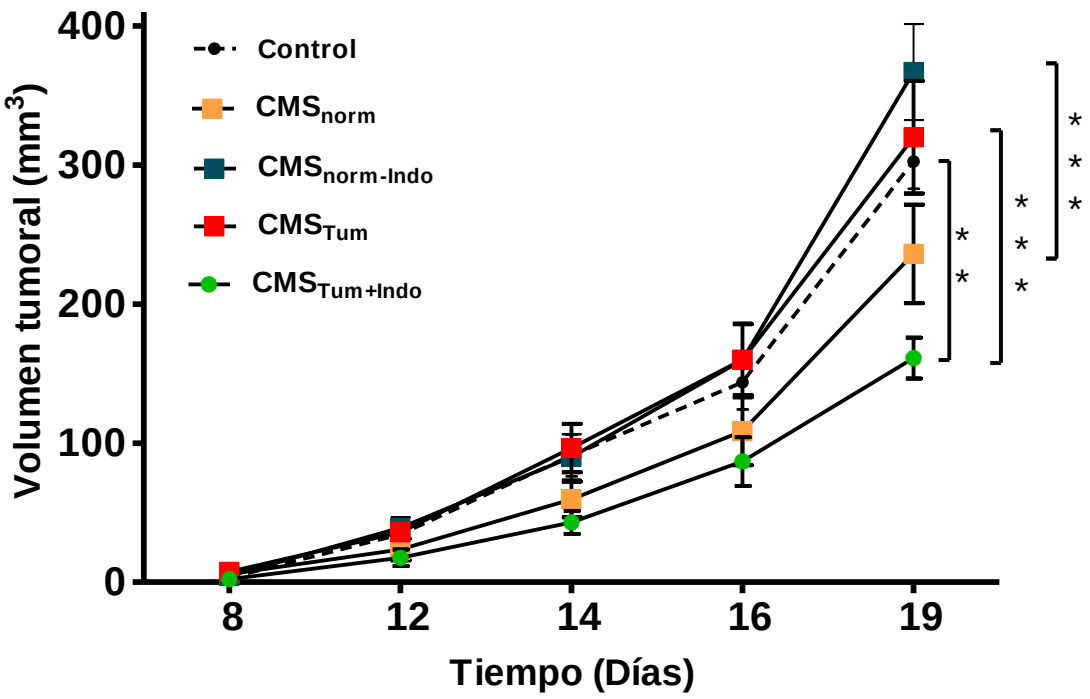
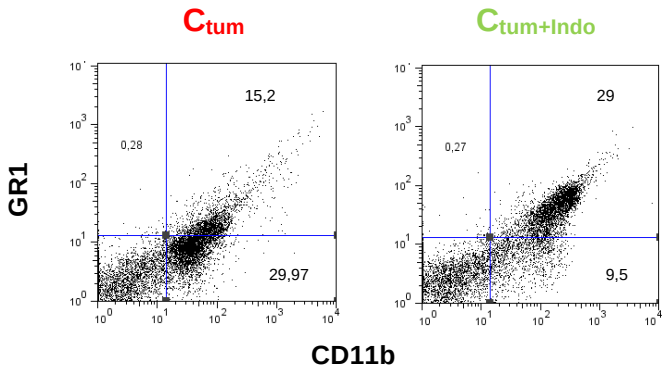
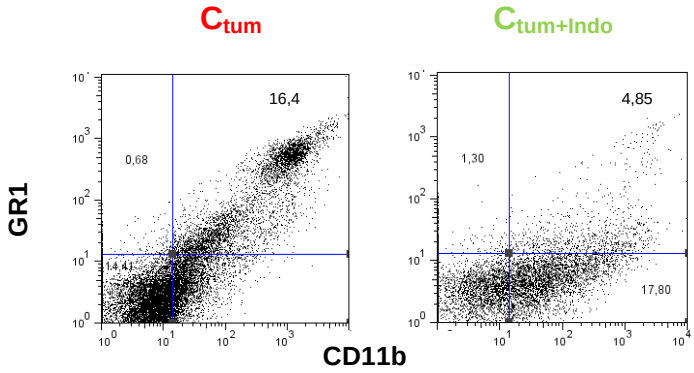


Figura 7: A. $CMS_{norm,}$ $CMS_{norm+Indo,}$ CMS_{tum} o $CMS_{tum+Indo}$ fueron inyectadas i.p. en ratones BALB/c portando un tumor LP07 de 3 días (CMS_{norm} vs. $CMS_{norm+Indo}$ $P < 0,001$; CMS_{norm} vs. CMS_{tum} $P < 0,01$; CMS_{norm} vs. $CMS_{tum+Indo}$ $P < 0,05$; $CMS_{norm+Indo,}$ vs. $CMS_{tum+Indo,}$ $P < 0,001$; CMS_{tum} vs. $CMS_{tum+Indo}$ $P < 0,001$). Ratones portadores de tumor sin transferir fueron utilizados como control. Se muestran promedios de 8 ratones por grupo. Gráfico representativo de 2 experimentos independientes con resultados similares.

B: Porcentaje de CMS en Bazo



C: Porcentaje de CMS en GDT



Porcentaje de linfocitos CD8 en GDT

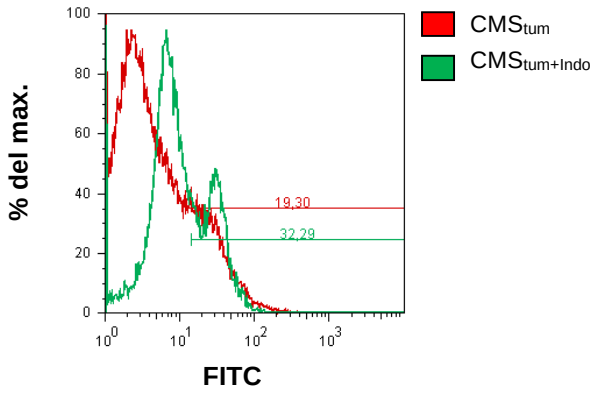


Figura 7B, Porcentaje de CMS en el bazo de ratones transferidos con CMS_{tum} y $CMS_{tum+Indo}$. Se muestra porcentaje de CMS del total de esplenocitos. **C,** Porcentaje de CMS en ganglios drenantes del tumor (GDT) de ratones transferidos con CMS_{tum} y $CMS_{tum+Indo}$. Se muestra porcentaje de CMS del total de células de ganglio drenante (CMS_{tum} vs. $CMS_{tum+Indo}$ $P < 0,05$). **D**, Porcentaje de Linfocitos CD8 en GDT de ratones transferidos con CMS_{tum} y $CMS_{tum+Indo}$. Se muestra porcentaje de $CD8^+$ del total de células de ganglio drenante (CMS_{tum} vs. $CMS_{tum+Indo}$ $P < 0,05$). Gráficos representativos de 2 experimentos independientes con resultados similares.

Las CMS transferidas migran al bazo, ganglios drenantes y tumor de ratones receptores

Para estudiar la localización de las CMS transferidas, marcamos un grupo con el colorante citoplasmático CFDA-SE, el cual emite su fluorescencia en el espectro de emisión del fluorocromo FITC y puede indentificarse por citometría la presencia de CMS marcadas. Luego de 48 hs post-inoculación de las CMS a ratones portadores de LP07, realizamos la autopsia, separando bazo, GDT y tumor. Repetimos el ensayo de transferencia adoptiva sólo para los grupos CMS_{tum} y $CMS_{tum+Indo}$. Las CMS transferidas se detectaron en bazo, GDT y tumor (Figura 8). Esta observación implica que las CMS luego de la inyección i.p. migran a ambos órganos linfáticos el infiltran el tumor. Cuando analizamos más detenidamente las CMS marcadas que llegaron al bazo de los ratones transferidos, observamos que el grupo que había sido tratado con Indo exhibía un perfil $GR1^{high}$ (Figura 8A). Esto no se observó en ganglio ni en el infiltrado tumoral (Figura 8B y C).

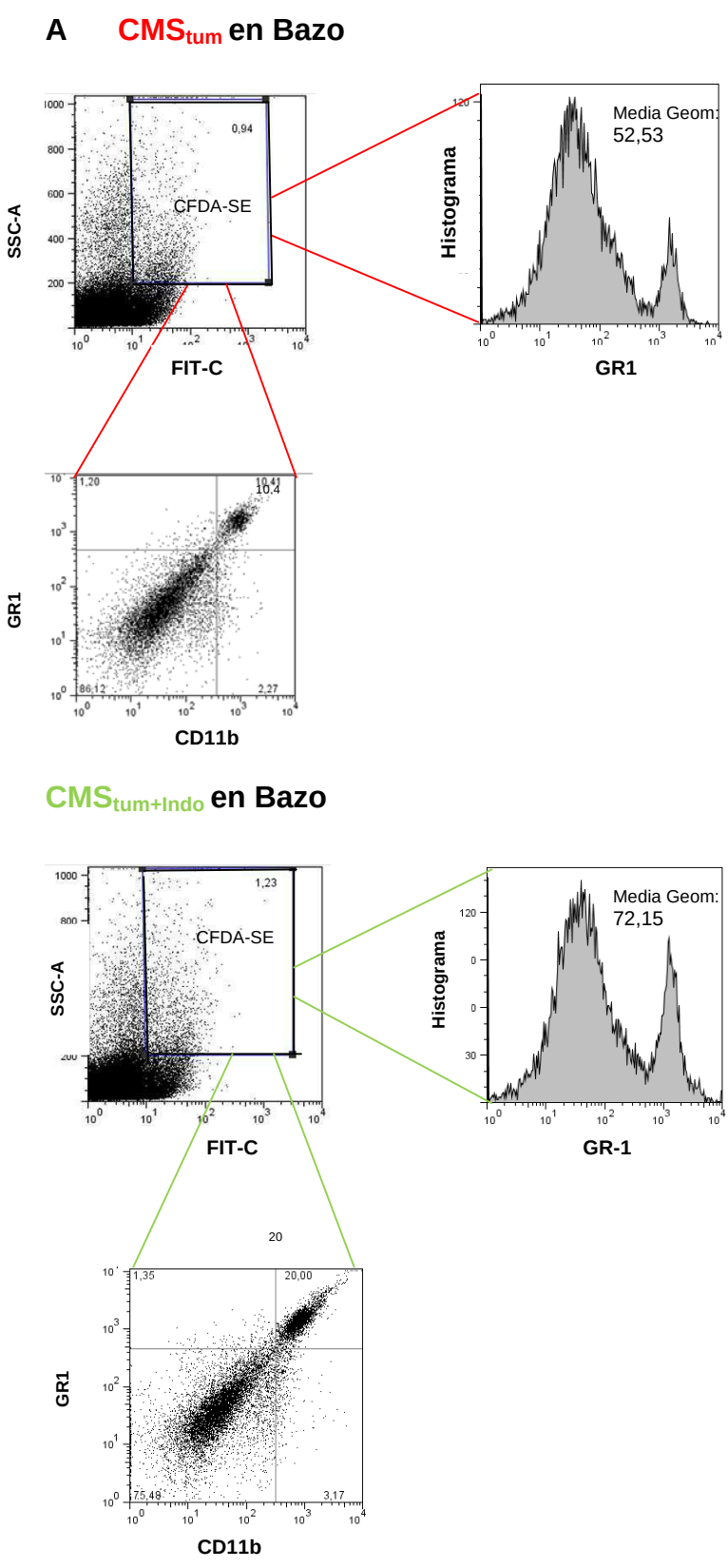
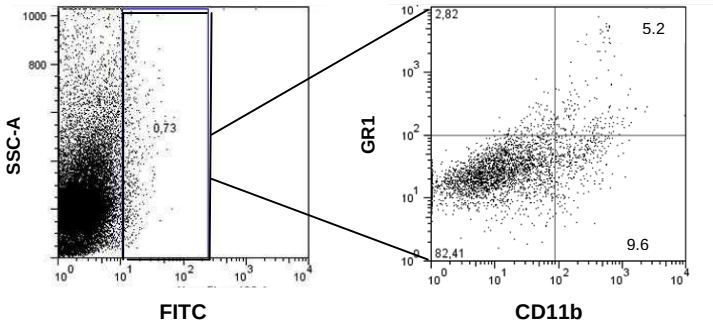


Figura 8: Las CMS transferidas migran al bazo, ganglios drenantes y tumor de ratones receptores. CMS_{tum} y $CMS_{tum+Indo}$ se marcaron con CFDA-SE y se transfirieron a ratones portadores de LP07 de 3 días de evolución. **A**, citometría de bazos de ratones transferidos 48hs post-inoculación con CMS. Gráficos izq. arriba: células CFDA-SE positivas del total de células analizadas, der. arriba: Histograma de células GR1 positivas del total de CFDA-SE positivas, izq. abajo: Células GR1,CD11b positivas del total de CFDA-SE positivas. Media Geométrica: Indicador de la intensidad de GR1, área debajo de la curva del histograma.

B: CMS en GDT



C: CMS en el tumor

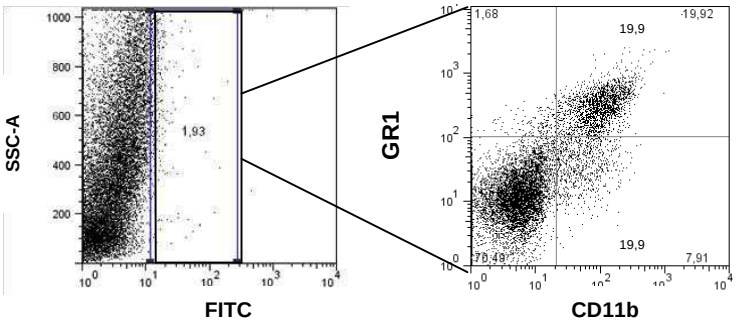


Figura 8 B, Citometría de CMS marcadas en ganglios drenantes del tumor de ratones transferidos, der: células GR1, CD11b positivas del total de CFDA-SE positivas. **C,** Citometría de CMS marcadas infiltrando el tumor. der: células GR1, CD11b positivas del total de CFDA-SE positivas. No hay diferencias entre ambos grupos experimentales, por lo tanto las figuras B y C representan lo observado tanto para CMS_{tum} como para

Las CMS normales y tumorales tratadas con Indo controlan de manera diferente la evolución de un desorden inflamatorio crónico

El conjunto de los resultados anteriores sugieren que la presencia de Indo durante la diferenciación de las CMS, en ausencia de un microambiente tumoral, aumenta su capacidad supresora para ayudar a restablecer la homeostasis del sistema inmunológico. Para verificar esta hipótesis en una patología inflamatoria no tumoral, y al mismo tiempo seguir evaluando la habilidad de las CMS de resolver una situación de inflamación patológica, utilizamos un modelo de desorden inflamatorio mediado por linfocitos T que recrea en ratones la esclerosis múltiple (123, 124), llamado encefalomielitis autoinmune experimental (EAE). En este ensayo podríamos comprobar simultáneamente, si la Indo podría aumentar la capacidad de las CMS normales para frenar una respuesta T exacerbada frente a un antígeno estimulador, y si el tratamiento con Indo en CMS tumorales las transformaría en una población inflamatoria en detrimento de su función regulatoria.

Dado que la EAE es una enfermedad autoinmune dependiente de linfocitos autorreactivos de tipo Th1 y Th17 (125, 126), no se desarrolla en ratones BALB/c, a causa de que esta cepa de ratones tiene una tendencia a desarrollar respuestas inflamatorias de tipo Th2. Por lo tanto, utilizamos ratones C57BL/6, los cuales tienen predisposición a desarrollar enfermedades autoinmunes dependientes de linfocitos Th1 (127).

Para ello, primero debimos realizar los mismos 4 tratamientos para diferenciar CMS de médula ósea provenientes de ratones C57BL/6.

Por lo tanto utilizamos para obtener medio condicionado de tumor con trasfondo singeneico de C57BL/6, el melanoma B16.

Repetimos el protocolo de diferenciación exactamente como lo realizamos para los progenitores de médula ósea de ratones BALB/c, reemplazando el MC de LP07 por MC de B16.

Para evaluar el perfil supresor de estas nuevas CMS de C57BL/6, realizamos un RML previo al experimento de EAE.

Observamos que las CMS de C57BL/6 responden exactamente igual que las CMS de BALB/c a los 4 tratamientos utilizados (Figura 9A). Por lo tanto pudimos comparar los resultados de la EAE con los resultados observados para los experimentos anteriores.

Para desarrollar la EAE, inmunizamos ratones C57BL/6 con el péptido MOG_{35-55} que corresponde a la secuencia de los aminoácidos 35 al 55 de la glicoproteína de los oligodendrocitos de la mielina. Luego monitoreamos la progresión y seleccionamos los ratones cuyo *score* fuera 1, que implica el comienzo de los síntomas de la EAE. Estos ratones se dividieron en 5 grupos, de los cuales 4 fueron inoculados cada uno con un tratamiento de CMS (CMS_{norm}, $CMS_{nom+Indo}$, CMS_{tum}, $CMS_{tum+Indo}$) y uno fue dejado sin transferir como control de desarrollo normal de la EAE.

La inoculación con $CMS_{nom+Indo}$ y CMS_{tum} disminuyó la severidad clínica de la enfermedad ($P< 0,05$), observamos que los ratones pertenecientes a estos dos grupos nunca desarrollaron la enfermedad, ya que unos pocos individuos llegaron a tener un pico de *score* 2, pero la mayoría se mantuvo entre los *scores* 0,5 y 1,5. Por el contrario, la inoculación de $CMS_{tum+Indo}$ aumentó significativamente los síntomas patológicos de la EAE ($P< 0,05$) y previno la resolución de la inflamación comúnmente observada en las fases finales de la enfermedad. Notablemente, la inoculación con CMS_{norm} retrasó el comienzo normal de la enfermedad, pero luego, el grupo alcanzó el pico máximo de *score* clínico a los 14-15 días al igual que el grupo control y, finalmente resolvió la inflamación (Figura 9B).

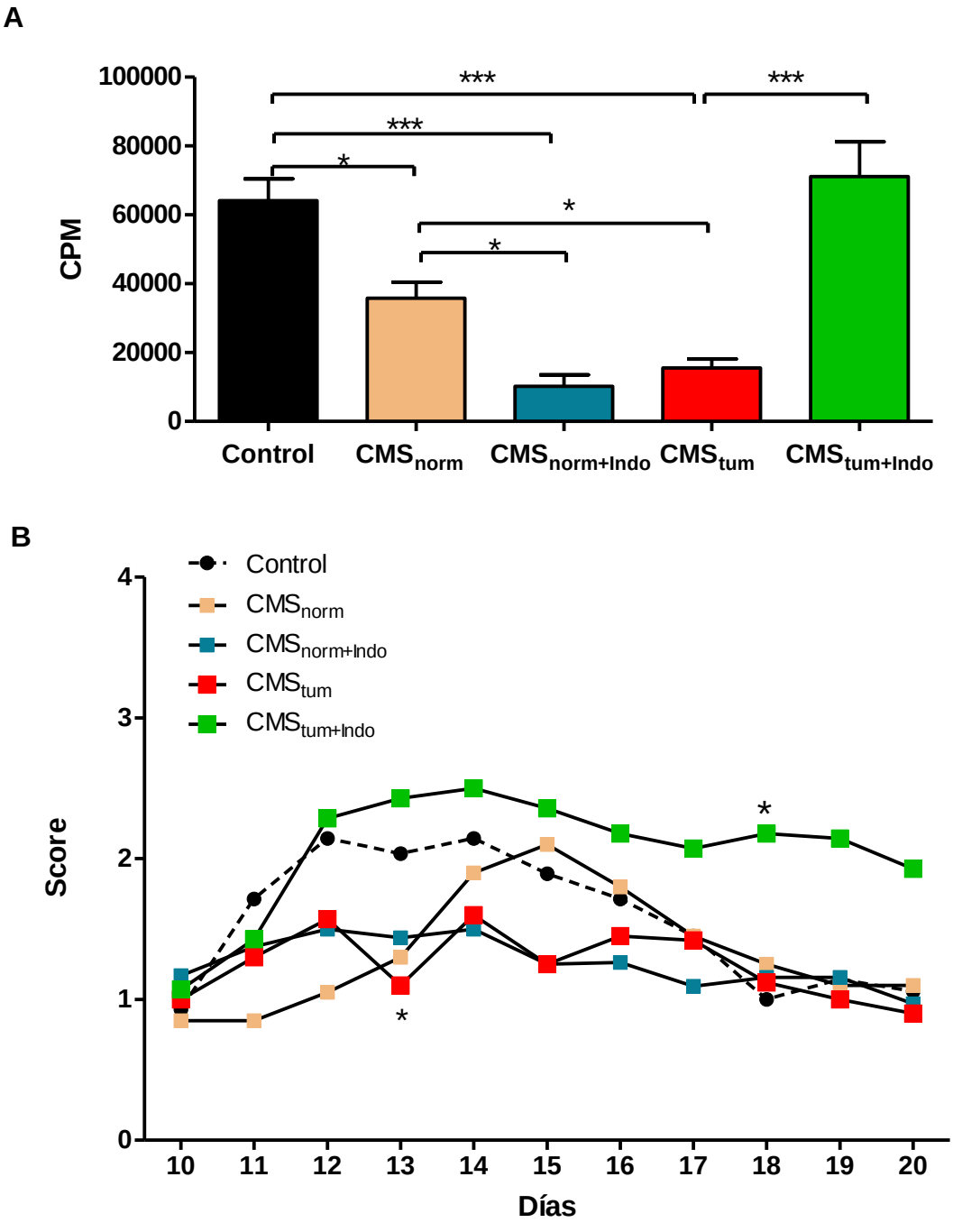


Figura 9: Las CMS normales y tumorales tratadas con Indo controlan de manera diferente la evolución de un desorden inflamatorio crónico. A, RML de CMS de médula ósea de ratones C57BL/6. **B,** Valores clínicos de ratones C57BL/6 con EAE fueron inyectados con CMS singeneicas después de 10 días post-inoculación del péptido MOG_{35-55} (n=11). (CMS_{norm} vs. $CMS_{tum+Indo}$ $P < 0,05$; $CMS_{norm+Indo}$ vs. $CMS_{tum+Indo}$ $P < 0,05$; CMS_{tum} vs. $CMS_{tum+Indo}$ $P < 0,05$). Ratones con EAE sin inocular fueron utilizados como control (n=11). Gráfico de 2 experimentos independientes promediados.

El porcentaje de MDSC en el bazo y ganglios de ratones con EAE se correlaciona con el desarrollo de la enfermedad

Previamente se describió un aumento de CMS en el bazo y ganglios de ratones con EAE (47). Por lo tanto decidimos estudiar por citometría el porcentaje de CMS en los ratones que recibieron los 4 tratamientos distintos de CMS. Los ratones transferidos con $CMS_{tum+Indo}$ tumorales tratadas con Indo exhibieron un porcentaje de CMS esplénicas significativamente menor que aquellos inoculados con CMS_{tum} ($P< 0,05$). Al mismo tiempo los ratones transferidos con $CMS_{norm+Indo}$ tuvieron mayor porcentaje de CMS esplénicas que aquellos transferidos con CMS_{norm} (Figura 10A). Cuando evaluamos el porcentaje de CMS en los ganglios inguinales y axilares, encontramos un perfil muy similar al observado en el bazo, sin embargo las diferencias no fueron significativas (Figura 10B). Al evaluar la expresión del marcador GR1, observamos que las CMS esplénicas de ratones transferidos con $CMS_{tum+Indo}$ exhibieron un perfil $GR1^{high}$ aumentado, comparadas con las CMS de ratones transferidos con CMS_{tum} y $CMS_{norm+Indo}$.

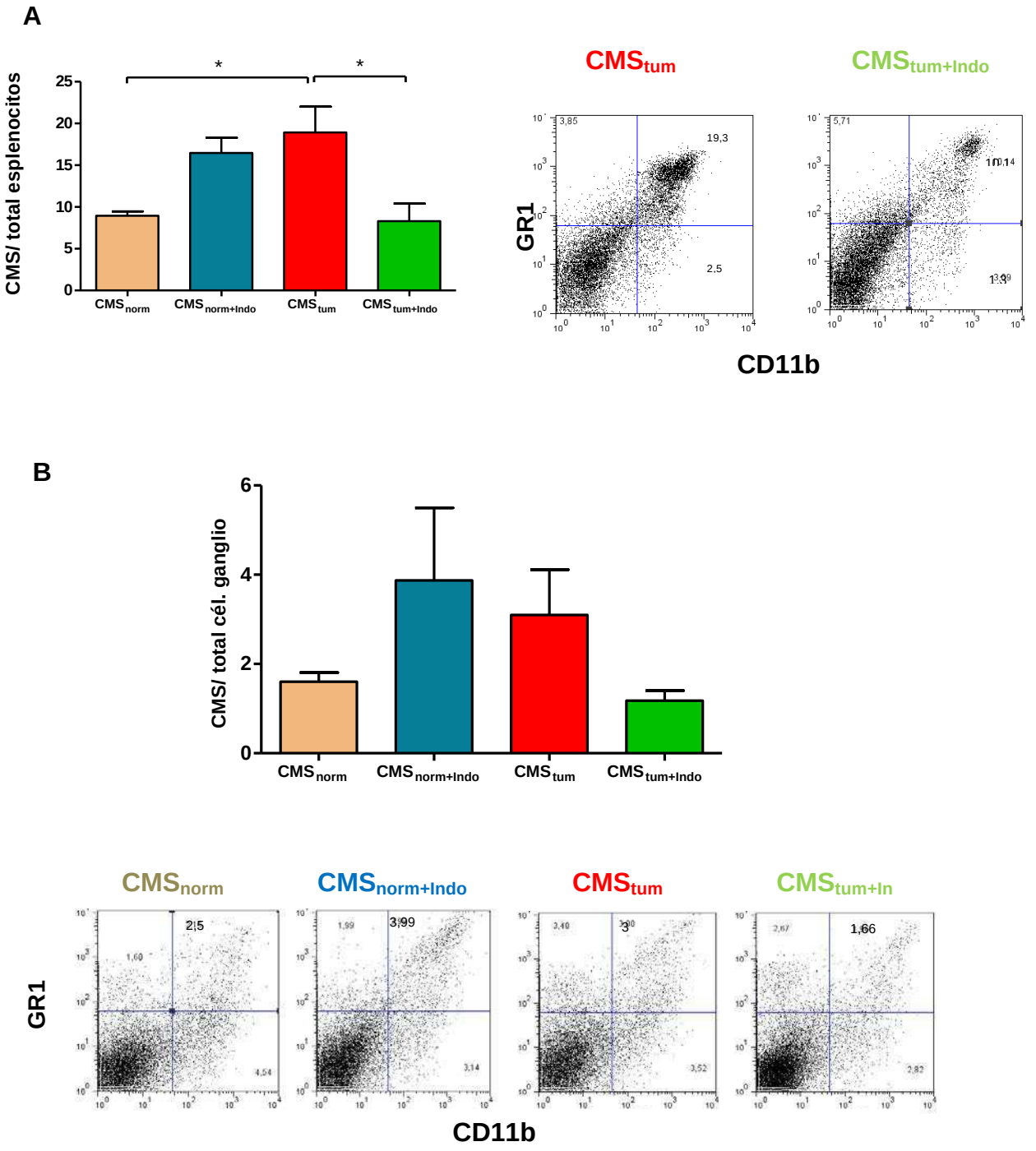


Figura 10 A, Porcentaje de CMS esplénicas de ratones con EAE a tiempo final (CMS_{tum} vs. $CMS_{tum+Indo}$ $P < 0,05$; CMS_{norm} vs. CMS_{tum} $P < 0,05$). **B**, Porcentaje de CMS en ganglio de ratones con EAE a tiempo final. Se muestran gráficos de puntos de CMS en ganglio sobre el total de células del ganglio. Gráficos de barra muestran promedio de 2 experimentos independientes. Gráficos de puntos, representativos de uno de los 2 experimentos.

La Indo modifica los mecanismos de supresión utilizados por las CMS

Teniendo en cuenta que el tratamiento con Indo modificó diferencialmente la capacidad supresora de CMS normales y CMS tumorales, nos propusimos estudiar los mecanismos de supresión comúnmente utilizados por las CMS que pudieron haber sido modulados por el tratamiento con Indo. En primer lugar evaluamos la expresión del factor de transcripción C/EBPβ, que fue identificado como un regulador clave del ambiente tolerogénico e inmunosupresor inducido por el tumor (122).

Analizamos por western blot la expresión de C/EBPβ y encontramos una correlación entre los niveles de este factor de transcripción y la capacidad supresora de las CMS. Siendo las CMS_{tum} y $CMS_{norm+Indo}$ aquellas con mayores niveles de C/EBPβ y $CMS_{tum+Indo}$ la menor expresión (Figura 11A).

En segundo lugar analizamos la actividad arginasa de los 4 tratamientos de CMS provenientes de médula ósea de ratones BALB/c. Encontramos que las CMS tumorales tienen una actividad arginasa aumentada comparada con las CMS normales y que el tratamiento con Indo disminuye significativamente la actividad arginasa en CMS tumorales pero no en las CMS normales (Figura 11B).

Luego evaluamos la producción de óxido nítrico (ON) y encontramos que el tratamiento con Indo disminuyó la producción de ON en CMS tumorales ($P < 0,01$); por el contrario, el tratamiento con Indo aumentó la producción de ON en CMS normales ($P< 0,05$) (Figura 11C).

Analizando la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), encontramos que las CMS_{tum} y las $CMS_{norm+Indo}$ produjeron mayores niveles de EROs, con respecto a las CMS_{norm} y $CMS_{tum+Indo}$ ($P< 0,05$) (Figura 11D).

Por último realizamos por PCR en tiempo real un arreglo de genes relacionados con la inmunosupresión y la inflamación, utilizando como muestra el ARN de las CMS_{tum} y las $CMS_{tum+Indo.}$ Observamos un aumento modesto en ciertos genes que podrían relacionarse con un perfil pro-inflamatorio en $CMS_{tum+Indo}$ con respecto a las CMS_{tum}. Al mismo tiempo que ciertos genes relacionados con la tolerancia e inmunoregulación disminuyeron levemente sus niveles de expresión (Figura 12 A y B).

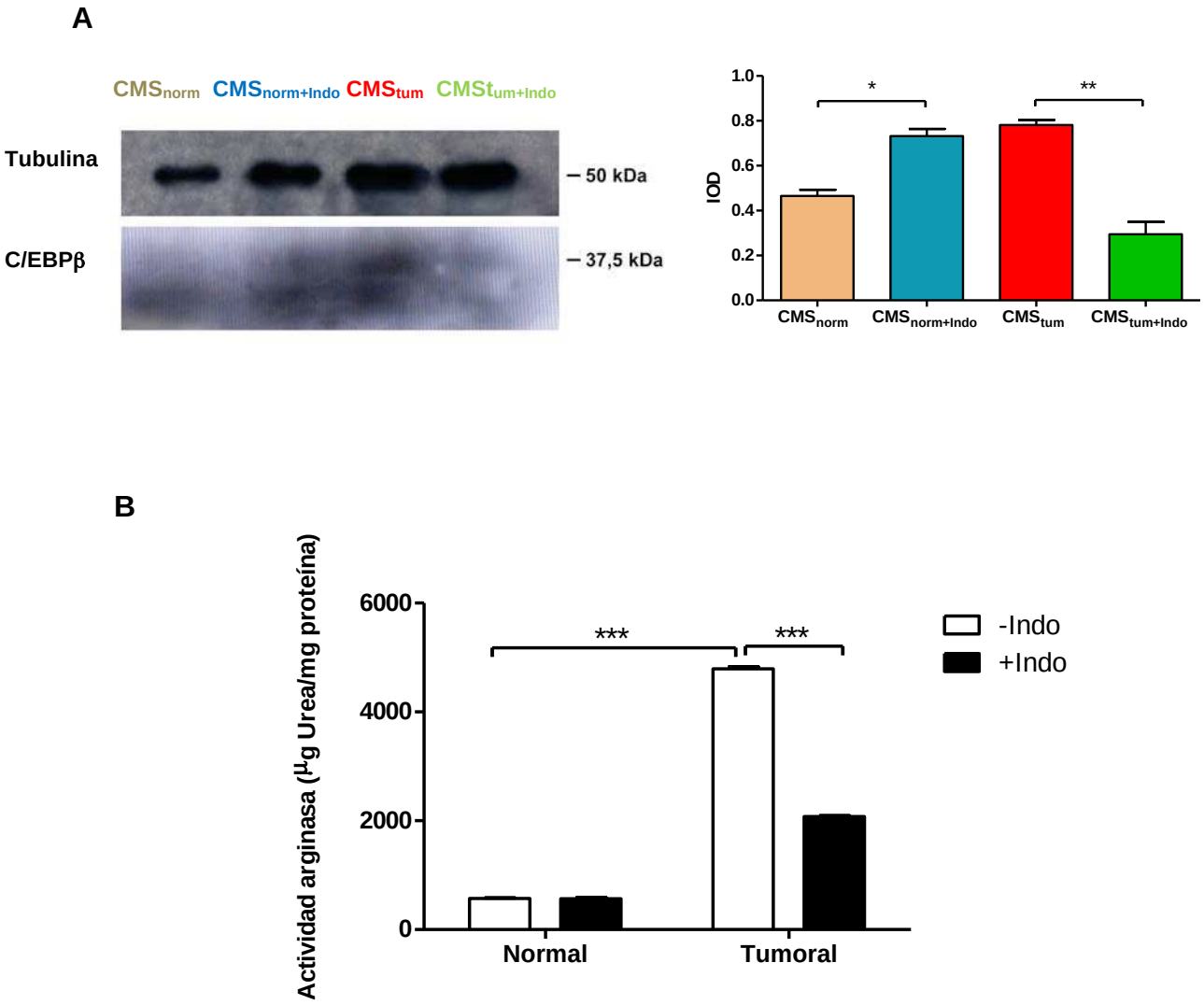


Figura 11: La Indometacina modifica los mecanismos de supresión utilizados por las CMS. A, Western Blott de C/EBPβ en CMS_{norm}, $CMS_{norm+Indo}$, CMS_{tum} y $CMS_{tum+Indo,}$ se muestra imagen de un ensayo representativo. Histograma de densidades ópticas contiene datos de dos ensayos independientes promediados. (CMS_{norm} vs $CMS_{norm+Indo}$ P< 0,05**;** CMS_{tum} vs $CMS_{tum+Indo}$ P< 0,01) **B,** Actividad arginasa de CMS_{norm}, $CMS_{norm+Indo}$, CMS_{tum} y $CMS_{tum+Indo.}$ (CMS_{tum} vs CMS_{norm} y CMS_{tum} vs. $CMS_{tum+Indo.}$ P< 0,001), gráfico representativo de 2 experimentos independientes con resultados similares.

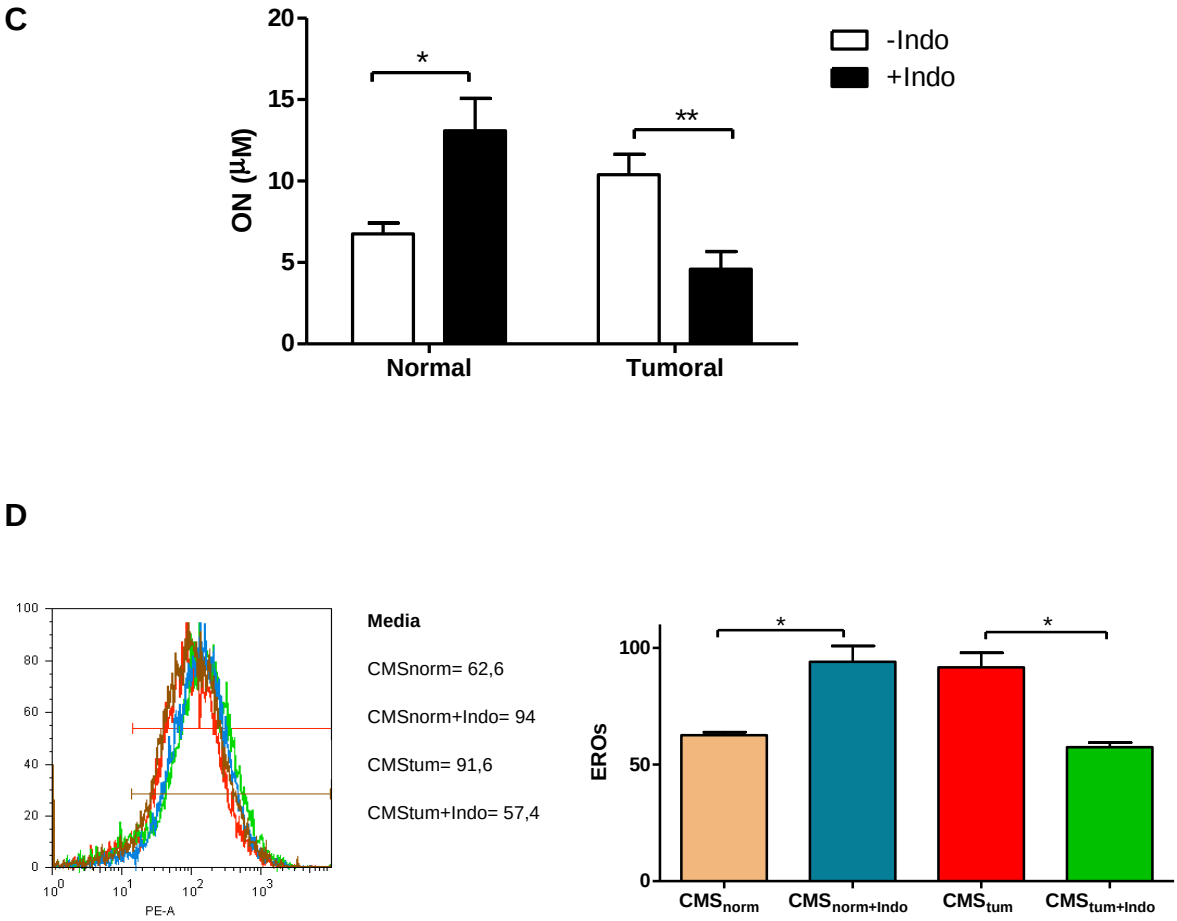


Figura 11C, Producción de óxido níitrico. Método de Griess (CMS_{norm} vs. $CMS_{norm+Indo}$ P< 0,05; CMS_{tum} vs. $CMS_{tum+Indo.}$ P< 0,01). Gráfico representativo de 2 experimentos indpendientes promediados. **D**, Producción de EROs evaluada por citometría (CMS_{norm} vs. $CMS_{norm+Indo}$ P< 0,05; CMS_{tum} vs. $CMS_{tum+Indo.}$ P< 0,05). Gráfico promedio de 2 experimentos independientes.

A

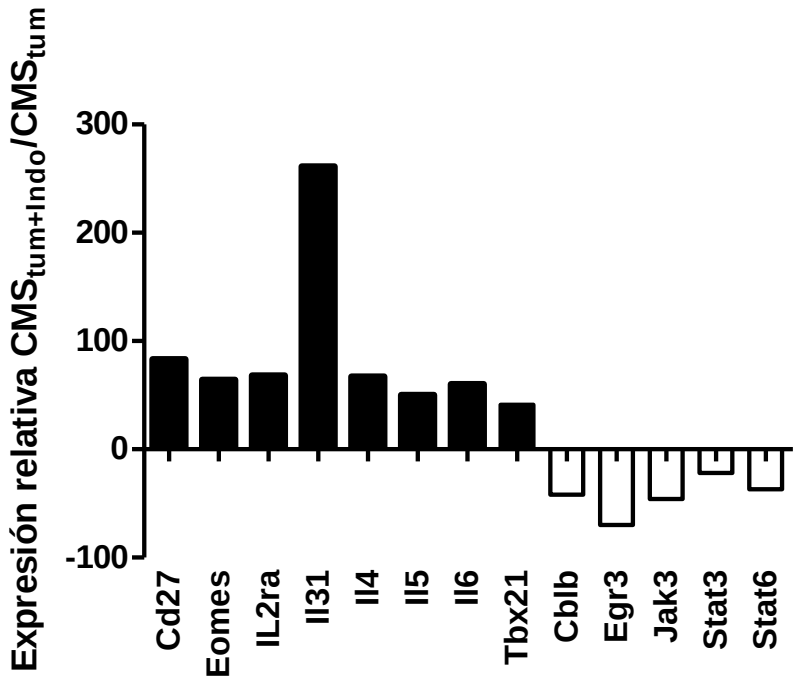


Figura 12: Estudio de genes relacionados con la inflamación e inmunosupresión. A, Se analizó el ARN mensajero de CMS_{tum} y $CMS_{tum+Indo}$, utilizando la técnica de PCR en tiempo real. El grafico muestra porcentajes de expresión relativos.

DISCUSIÓN

Durante el proceso de carcinogénesis se producen mutaciones genéticas que favorecen el establecimiento de un microambiente inflamatorio (128, 129, 130). Por otro lado, numerosos estudios demostraron la capacidad pro-tumoral de mediadores inflamatorios durante las distintas fases de la progresión tumoral maligna (131- 134), ya que la continua liberación de moléculas inflamatorias puede afectar la progresión tumoral aumentando la proliferación celular y su resistencia a la apoptosis, promoviendo la angiogénesis y la remodelación del estroma e inhibiendo una respuesta inmunológica anti-tumoral eficiente (135). El escape tumoral es una consecuencia de la interacción entre el sistema inmunológico y las células malignas, y ha sido reconocido como una de las características fundamentales que facilitan la progresión tumoral (21).

La auto-regulación del sistema inmunológico frente a una injuria (trauma, infección, trasplantes, etc.) es indispensable para recuperar la homeostasis y evitar la exacerbación de la respuesta inmunológica y el consecuente daño de los diferentes tejidos. El papel de las CMS en este proceso ha sido documentado en numerosos trabajos (136 -140); al mismo tiempo, los antiinflamatorios no esteroides constituyen un abordaje terapéutico eficiente para el tratamiento de enfermedades que implican la desregulación del sistema inmunológico.

Dada la importancia de las CMS para regular tanto la progresión tumoral como para controlar el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas, nos centramos en el estudio de la respuesta de las CMS a un antiinflamatorio no esteroide como la Indo y en particular la influencia del microambiente en el que se diferencian. Por lo tanto, para estudiar los mecanismos involucrados en el efecto de la Indo sobre la actividad de las CMS, utilizamos un modelo experimental de cáncer murino como el tumor de pulmón LP07 y un modelo de enfermedad inflamatoria crónica como la encefalomielitis (EAE).

Tumor LP07

Se estudiaron las CMS infiltrantes del tumor, del bazo y GDT en diferentes etapas de la progresión de la enfermedad (temprana, media y avanzada, 10, 20 y 30 días respectivamente). Observamos un aumento significativo de las CMS en el estadio avanzado tanto en bazo como en GDT comparado con el bazo normal y los ganglios contralaterales como con etapas tempranas. Esta acumulación de la población mieloide supresora durante la progresión tumoral ha sido descripta en otros modelos experimentales (141-144) y en pacientes con cáncer en etapa metastásica (41, 62, 145). El mayor volumen tumoral correlacionó en forma directa con un aumento de CMS infiltrantes del tumor, sin embargo el porcentaje de esta población con respecto a otras células del infiltrado celular no aumentó significativamente, implicando que el tumor LP07 recluta diferentes poblaciones celulares a medida que progresa.

La administración por vía oral de un AINE como la Indo durante todo el desarrollo del tumor, redujo la acumulación de CMS en bazo, GDT y tumor así como produjo un aumento de linfocitos CD8+ y una disminución de Treg en los GDT. Estos resultados sugieren que en el portador de tumor LP07, la administración prolongada de Indo regula diversas poblaciones celulares involucradas con el estado de inmunosupresión y la respuesta citotóxica efectora, lo cual apoya evidencias previamente publicadas sobre el efecto modulador de otros AINEs en la acumulación (146, 147, 99) y actividad (148 , 149) de las CMS.

Es interesante remarcar tanto la acumulación de CMS como el efecto de la Indo sobre las poblaciones celulares en los GDT ya que es el lugar donde se produce el contacto entre la APC y el linfocito T. El aumento de las CMS en este órgano linfático tendría influencia directa sobre la activación y proliferación de los linfocitos T con actividad antitumoral y el aumento de CMS en el tumor también afectaría la eliminación de las células tumorales. Al mismo tiempo, la disminución de CMS ocasionada por el tratamiento con Indo probablemente permitió el aumento de linfoctos T CD8 y la disminución de Treg en los GDT. Generando un ambiente proclive a la producción de una respuesta anti-tumoral eficiente.

Uno de los mecanismos por los cuales las CMS ejercen inmunosupresión es a través de la actividad de la enzima arginasa (50, 51, 52); en nuestro modelo observamos un aumento significativo en la actividad arginasa en el bazo y en tumor de RPT avanzado. El aumento de esta actividad enzimática se podría asociar a la acumulación de CMS detectada en los mismos tejidos. La Indo revirtió el aumento de la actividad arginasa en el bazo y tumor, asociado posiblemente a una menor acumulación de las CMS, ya que en ambos tejidos observamos un descenso de CMS luego del tratamiento con Indo.

La HR específica se estudió a lo largo del crecimiento tumoral. Mientras que en las etapas temprana y media la HR fue positiva, se negativizó en la etapa avanzada. Estos resultados demuestran que a pesar de que el tumor LP07 es antigénico, a medida que progresa, induce la acumulación de CMS en bazo y GDT, y genera un ambiente inmunosupresor sistémico (150) llevando a la pérdida de la capacidad de elaborar respuestas inflamatorias de tipo Th1, como es la respuesta de HR. Además, se ha demostrado que las CMS pueden generar una inmunosupresión sistémica específica contra el antígeno tumoral (151, 39) y dado que previamente demostramos que el tumor LP07 tiene la capacidad de producir factores inflamatorios tales como IL-6 IL-1β, GM-CSF y PGE_2, conocidos por reclutar CMS y favorecer el escape tumoral, los datos obtenidos en la presente tesis concuerdan con lo observado en los trabajos anteriores (100, 101).

En los animales tratados con Indo, la respuesta de HR fue positiva durante todas las etapas del tumor. Este hecho se asoció con la diminución de CMS en bazo, GDT y tumor, y una disminución de Treg, al mismo tiempo que un aumento de linfocitos T CD8 en GDT. Estas observaciones sugieren que el uso de la Indo, ayudaría a prevenir la inmunosupresión asociada al tumor LP07 y permitiría una respuesta antitumoral eficiente.

Es importante destacar que la dosis de Indo utilizada en los experimentos *in vivo* es una dosis sub-letal y por debajo de la IC50, determinada previamente (107). Esto significa que el efecto antitumoral que se observa no se debe a la actividad citotóxica sobre las células LP07, ya que la IC50 es de 60 μM y con una dosis aún mayor a la utilizada (25μM) no se observa una disminución en la viabilidad celular *in vitro* (107).

Actividad de las CMS

Si bien se ha descrito la capacidad de la Indo de restablecer la función anti-tumoral de macrófagos en un modelo de carcinoma mamario (98), hasta el presente no ha habido evidencias de su efecto sobre la población mieloide supresora. Por lo tanto, en esta tesis reportamos por primera vez, un efecto de la Indo sobre la funcionalidad de las CMS. Las CMS de RPT avanzado mostraron actividad supresora de la respuesta linfocitaria medida en un ensayo de RML que fue inhibida por la administración de Indo. Por lo tanto la administración de Indo no sólo disminuyó el porcentaje de CMS esplénicas sino que además redujo la capacidad supresora de las mismas.

La transferencia adoptiva de CMS $CD11b^{+}Gr1^{+}$ purificadas del bazo de RPT a ratones inoculados con LP07 no afectó el crecimiento del tumor. Postulamos que esta ausencia de efecto se debería a que las células transferidas son similares a las que el tumor induce durante su crecimiento. Sin embargo, en aquellos ratones transferidos con el mismo número de CMS de RPT+ Indo, el crecimiento tumoral fue significativamente menor. Estos resultados se correlacionan con el efecto observado de la Indo sobre la actividad supresora de las CMS en el ensayo de RML y sobre la respuesta de HR, ya que la administración de Indo redujo la capacidad supresora de las CMS sobre la proliferación de linfocitos T y además previno la inmunosupresión específica observada en la HR durante la etapa avanzada de portación. Por otro lado, este resultado implica que las CMS provenientes de RPT+Indo tienen un perfil diferente de las CMS de RPT, que se mantuvo durante todo el experimento.

Con el objetivo de estudiar si el efecto observado de la Indo sobre las CMS se producía también en un tumor no relacionado al LP07, analizamos el tumor de mama murino 4T1. La administración de la misma dosis de Indo en el agua de beber, redujo significativamente el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica. En el ensayo de transferencia adoptiva con las CMS obtenidas de bazo de RPT_{4T1} y RPT_{4T1}+ Indo observamos que la transferencia de CMS de RPT_{4T1}+Indo a ratones inoculados previamente con 4T1, redujo el crecimiento tumoral, y las CMS de RPT_{4T1} no mostraron efecto sobre la progresión del tumor, al igual que lo observado con el tumor LP07. Con estos resultados pudimos concluir que el efecto observado de la Indo, tanto a nivel antitumoral, como sobre la actividad de las CMS

esplénicas no es exclusivo del tumor LP07, sino que podría aplicarse a tumores de distinta localización.

Las CMS que infiltran el tumor de RPT fueron ensayadas en una reacción mixta leucocitaria y, notablemente, no exhibieron capacidad supresora in vitro. Esta observación ha sido previamente reportada por otros grupos de trabajo (120, 151), en los que se plantea la pregunta de cuál podría ser el rol de las CMS intratumorales, ya que la capacidad de suprimir a los linfocitos T antitumorales podría no ser su acción principal en el sitio del tumor. Gabrilovich y col. describieron a las CMS intratumorales como una fuente de macrófagos asociados a tumor (TAM), introduciendo otro posible rol de las CMS en la progresión tumoral (39).

Efecto de la Indo sobre CMS "inflamatorias" y CMS "tumorales"

Estudiamos el efecto de la Indo sobre CMS de órganos linfáticos periféricos provenientes de RPT y, posteriormente, nos interesó analizar en detalle el efecto de la Indo sobre la diferenciación de células progenitoras hacia CMS, para lo que utilizamos un modelo in vitro que nos permitiera controlar las condiciones del proceso de diferenciación. La Indo se utiliza actualmente para controlar patologías inflamatorias crónicas y agudas (152, 153), simultáneamente, la inducción de las CMS en enfermedades inflamatorias ha sido descripta por numerosos grupos internacionales (63, 120, 121). Nosotros estudiamos el efecto de la Indo sobre la actividad de CMS diferenciadas en un ambiente inflamatorio no tumoral. Para ello obtuvimos m.o. de animales normales y las diferenciamos con GM-CSF (CMS_{norm}) o con GM-CSF + Indo ($CMS_{norm+Indo}$). Al determinar su actividad en un ensayo de RML, encontramos, sorprendentemente, una mayor actividad supresora de las $CMS_{norm+Indo}$ comparada con las CMS_{norm}. Esto significa que las CMS normales respondieron en forma contraria a las CMS de RPT frente al tratamiento con Indo; por esta razón decidimos incluir MC de células LP07, caracterizado por la presencia de GM-CSF, IL-6, IL-1β y altas concentración de PGE2 (101, 107), que "mimetizaría" el microambiente tumoral soluble en el medio de diferenciación. En

primer lugar observamos que el MC aumentó la capacidad supresora de las CMS_{norm} y por otro lado que, en estas nuevas condiciones (CMS_{tum}) la Indo inhibió la capacidad supresora de las CMS ($CMS_{tum+Indo}$).

Confirmando estas observaciones, la transferencia adoptiva de $CMS_{tum+Indo}$ resultó tener el mismo efecto inhibitorio del crecimiento tumoral que se describió para las CMS esplénicas de RPT + Indo, al mismo tiempo que la transferencia de $CMS_{norm+Indo}$ y CMS_{tum} no tuvo efecto sobre el desarrollo del tumor. Estos resultados indican que factores liberados por el tumor no sólo aumentarían la actividad supresora de las CMS_{norm}, sino que modularían la respuesta de estas células a la Indo.

Analizando los resultados obtenidos de la transferencia adoptiva de CMS a ratones con EAE, observamos que los grupos de CMS que no modificaban significativamente el crecimiento tumoral en el ensayo de transferencia adoptiva a RPT ($CMS_{norm+Indo}$ y CMS_{tum}) inhibían el desarrollo de la EAE. Mientras que el grupo de $CMS_{tum+Indo}$, que había sido capaz de inhibir el desarrollo tumoral en RPT, exacerbó los síntomas de la EAE y evitó su resolución. Estas observaciones se correlacionan con los datos obtenidos en el ensayo de supresión *in vitro*, RML. En un trabajo publicado recientemente se documenta el papel pro-inflamatorio de las CMS en la EAE (154). Estas células favorecen la diferenciación de linfocitos T naïve hacia linfocitos Th17, en presencia de las citoquinas necesarias para dicha polarización (como IL-6, TGF-β), agravando la inflamación y promoviendo el daño tisular. En este sentido, la depleción de las CMS con gemcitabina, produjo una mejora de los síntomas de la EAE. Este trabajo demuestra que las CMS tienen la capacidad de exacerbar una inflamación de tipo autoinmune, como sucedió con las $CMS_{tum+Indo}$.

El grupo de CMS_{norm}, no disminuyó significativamente el crecimiento tumoral en RPT comparado con el control sin transferir, sin embargo cuando fue comparado con los grupos de CMS_{tum} y $CMS_{norm+Indo}$, sí se observó una diferencia significativa en sus efectos. Asimismo, su transferencia a ratones con EAE retrasó el comienzo de la enfermedad, pero no fue capaz de evitar su desarrollo, alcanzando valores de *score* similares al grupo control. Estos resultados, sumados al hecho de que en el ensayo de RML, su capacidad supresora fue menor que las CMS tratadas con Indo o en presencia de un microambiente tumoral, sugieren que las CMS_{norm} tienen una

capacidad limitada de suprimir una respuesta inflamatoria, y quizás aún sean capaces de estimularla (ya que se observó un menor crecimiento tumoral en RPT transferidos).

Uniendo estas observaciones, podemos pensar que el microambiente tumoral aumenta la capacidad supresora de las CMS_{norm} que podrían estar siendo reclutadas al sitio del tumor, para favorecer así el escape tumoral. En cuanto al tratamiento con Indo sobre las CMS_{norm}, imitando lo que sucedería con la administración de un AINE frente un desorden inflamatorio, aumentaría su capacidad supresora como mecanismo posible para controlar la inflamación. Sin embargo, la combinación de Indo con un microambiente tumoral no sólo parecería disminuir la capacidad supresora de las CMS, sino que podría modularlas hacia un perfil con características pro-inflamatorias, más que regulatorias. En este sentido, el efecto de la Indo es deseable, ya que su posible uso antitumoral podría deberse a la modulación de esta población supresora durante la progresión del tumor.

En los últimos años se publicaron dos artículos muy interesantes que analizan el efecto de factores inflamatorios tales como IL-6 (122) e IL-1β (155) sobre la capacidad supresora y pro-tumoral de las CMS. El trabajo del Dr. V. Bronte, describe que el agregado de IL-6 al medio de diferenciación tradicional de CMS que sólo contiene GM-CSF, aumenta significativamente su capacidad supresora. Mientras que el artículo del grupo de la Dra. S. Ostrand-Rosemberg describe que la IL-1β producida por el tumor aumenta la capacidad pro-tumoral de las CMS, observando una inhibición del crecimiento del tumor 4T1 en ratones *knock out* para el receptor de IL-1β. En nuestro trabajo observamos que el medio condicionado del tumor LP07, que se caracteriza por contener una serie de factores inflamatorios, aumenta la capacidad supresora y pro-tumoral de las CMS normales, apoyando la evidencia previa. Sin embargo la sola presencia de factores inflamatorios no explica los resultados, ya que todos ellos están presentes en procesos inflamatorios no tumorales, probablemente la diferencia radique en la conjunción de factores inflamatorios y otros factores solubles derivados del tumor. En el año 2012, se publicó un trabajo que demuestra la activación de NF-KB en células dendríticas por parte de micro ARNs presentes en exosomas producidos por las células tumorales (156). A través de la señalización de los receptores tipo Toll (TLR7 en ratones y TLR8 en humanos), estos miARNs activarían la vía de NF-KB y la consecuente

producción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF-α por parte de las células dendríticas. Este trabajo provee evidencia de otro posible factor producido por el tumor que podría estar modificando el perfil de las CMS.

Expresión del marcador GR1 y mecanismos de inmunosupresión

Trabajos previos reportaron una relación inversa entre la expresión del marcador GR1 y la capacidad supresora de las CMS, es decir que las CMS llamadas $GR1^{high}CD11b^{+}$ podrían ser menos supresoras que las $GR1^{low}CD11b^{+}$ (150, 157, 158). Nuestros resultados parecerían apoyar esta información previamente publicada.

El tratamiento con Indo a RPT modificó la población de CMS esplénicas hacia un perfil $GR1^{high}$. En segundo lugar, al analizar los bazos de los RPT transferidos, observamos que las CMS esplénicas de aquellos tratados con $CMS_{tum+Indo}$, también presentaban una mayor expresión del marcador GR1. Al analizar más detalladamente la composición de las $CMS_{tum+Indo}$ transferidas, observamos un aumento de la expresión de GR1 con respecto a las CMS_{tum} ,previo a la inoculación y que se mantuvo al menos hasta 48 hs después, hecho que pudimos determinar por la marcación con CFDA-SE.

Por último, analizando los bazos de los ratones con EAE que habían sido transferidos con $CMS_{tum+Indo}$, encontramos el mismo perfil de expresión del marcador GR1.

Resumiendo, en RPT, ya sea tratados *in vivo* con Indo o transferidos con $CMS_{tum+Indo}$, el aumento de GR1 en las CMS esplénicas de estos ratones parecería correlacionarse con una inhibición en la progresión tumoral. En cuanto a las CMS esplénicas de RPT + Indo o las $CMS_{tum+Indo}$ en sí, el aumento de GR1 podría asociarse a su menor capacidad supresora *in vitro* (RML) y a su efecto inhibitorio sobre la progresión tumoral *in vivo* (transferencia adoptiva a RPT). Contrariamente, en ratones con EAE, transferidos con $CMS_{tum+Indo}$, el perfil $GR1^{high}$ de las CMS esplénicas se asoció con una exacerbación de los síntomas de la enfermedad. Este efecto sugiere que el aumento de la expresión de GR1 en CMS podría asociarse a un perfil pro-inflamatorio y anti-tumoral.

Para confirmar esta hipótesis analizamos los mecanismos de supresión estudiados:

El factor de transcripción C/EBPβ es indispensable para la granulopoyesis de emergencia (en contrario a la granulopoyesis basal, cuyo factor de transcripción regulador es el C/EBPα), en respuesta a un aumento de citoquinas pro-inflamatorias o infecciones (159), y ha sido demostrado su rol en la actividad supresora tanto de CMS de médula ósea de ratones normales como de CMS tumorales (122). Marigo y col. demostraron que la ausencia de C/EBPβ disminuye la expresión de los genes de la iNOS y la ARG1 en CMS tumorales. Nuestros resultados sugieren una relación directa entre la expresión de C/EBPβ y la actividad arginasa, la producción de ON y EROs en $CMS_{tum,}$ ya que encontramos que el tratamiento con Indo sobre las CMS_{tum}, disminuyó la producción de C/EBPβ, EROs, ON y la actividad arginasa. Notablemente, la Indo, además, aumentó la expresión de GR1 en CMS tumorales, que junto con la disminución de los mecanismos de supresión, parecería explicar el comportamiento de estas $CMS_{tum+Indo}$ en los ensayos de RML, transferencia adoptiva a RPT y a ratones con EAE, confirmando la modulación hacia un perfil pro-inflamatorio y anti-tumoral. Contrariamente, la Indo aumentó la expresión de C/EBPβ en CMS_{norm} así como la producción de EROs y ON, pero no modificó la actividad arginasa. Este hecho, se correlaciona con el aumento de la capacidad supresora *in vitro* y el aumento del potencial para inhibir el desarrollo de la EAE, provocado por el tratamiento con Indo a CMS_{norm}. La razón por la que no encontramos diferencias entre el perfil $GR1^{high}$ de las CMS_{norm} comparado con las $CMS_{norm+Indo}$, aún siendo éstas últimas más supresoras que las primeras, podría radicar en que las CMS_{norm} tienen tanto capacidad supresora *in vitro*, como cierta capacidad regulatoria de la inflamación, observada en el ensayo de EAE. Por lo tanto no podría decirse que su perfil es pro-inflamatorio o completamente anti-tumoral, como observamos en el comportamiento de las $CMS_{tum+Indo}$, las cuales sí exhibieron un perfil $GR1^{high}$.

Asimismo, se demostró previamente que la expresión de C/EBPβ fue aumentada CMS de m.o. de ratones normales en respuesta a IL-6 (122), lo que podría explicar los mayores niveles de C/EBPβ en CMS_{tum} con respecto a las CMS_{norm}, ya que el MC de LP07 contiene IL-6.

En cuanto a la expresión de genes cuyos productos participan en procesos de inmunosupresión e inflamación, no encontramos grandes diferencias en los

perfiles de expresión de CMS_{tum} y $CMS_{tum+Indo.}$ Esto podría deberse a que la Indo probablemente no actúe mayormente modificando la expresión génica, sino la actividad de las proteínas. Sin embargo, nosotros encontramos un aumento de ciertos genes relacionados con la inflamación como la IL-31, una citoquina pro-inflamatoria del perfil Th2, cuyo receptor se encuentra en monocitos activados. La expresión de Tbet, factor de transcripción responsable de la polarización a Th1, también se vio aumentada en $CMS_{tum+Indo}$. T-bet se induce rápidamente luego de la activación del TCR y permite la reprogramación de la expresión de citoquinas como IFN-γ; además, encontramos aumentada la expresión de Eomesodermina (Eomes), el cual es responsable del mantenimientos de la expresión de IFN-γ, luego de la reprogramación del linfocito T (160, 161). Se ha descubierto que Tbet aumenta su expresión en células de origen mieloide como macrófagos o células dendríticas en respuesta a IFN-γ, y que éste podría ser un mecanismo por el cual las células de la respuesta innata ayudarían a la diferenciación de linfocitos T CD4 naïve hacia Th1 (162), además, en células dendríticas se describió la importancia de T-bet para la correcta activación de los linfocitos T(163) y en neutrófilos $GR1^{high}$ la producción de IFN-γ se asoció con una estimulación del sistema inmunológico frente a la infección con bacterias pulmonares (164). Por otro lado, observamos el aumento de otras citoquinas pro-inflamatorias de tipo Th2 como IL-4 e IL-5 y el receptor de TNF-α. Dentro de los genes cuya expresión fue menor en $CMS_{tum+Indo,}$ encontramos a JAK3/STAT6, cascada que junto con JAK1/STAT6 activa genes de inmunosupresión como ARG, iNOS y TGF-β en CMS y STAT3, conocido por favorecer la acumulación de CMS e impedir su maduración (39). Por otro lado encontramos disminuida la expresión de dos factores de transcripción relacionados con la tolerancia periférica como casitas b linfoma b (Cbl-b) y Early growth response 3 (Eg3), el cual activa a Cbl-b (165); si bien ambos fueron descriptos en linfocitos T, pueden expresarse en células de origen mieloide como macrofagos (166) o células tumorales que desarrollan la leucemia mieloide (167), pudiendo favorecer la progresión tumoral del cáncer de mama a causa de la inhibición del rol antitumoral de TGF-β.

Creemos que estos resultados, sugieren que la Indo puede tener vías de acción alternativas a la conocida inhibición de la enzima COX-2. Postulamos esta posibilidad basados además en el efecto sinérgico de la inhibición del crecimiento tumoral de ratones inyectados con LP07 silenciadas para COX-2 y tratados *in vivo* con Indo. Ya que si bien los ratones portadores del tumor LP07^{-COX-2} exhibieron un crecimiento menor del tumor, comparado con los controles, la combinación del tratamiento *in vivo* con Indo inhibió aún más la progresión tumoral. Tanto en el tumor como en las CMS la expresión de COX-1 se encuentra casi ausente (107), por lo tanto creemos que es poco probable que el mecanismo de acción observado se deba a la no selectividad de la Indo sobre COX-1 y 2. Además numerosas publicaciones han revelado la independencia de COX-2 de los AINEs para ejercer algunas de sus funciones (168, 169). Sin embargo, para corroborarlo, es necesario repetir los ensayos en ratones *Knock out* para esta enzima, ya que es la única forma de obtener un sistema inmunológico que no exprese COX-2 y evaluar cuál sería el efecto en las CMS de los ratones *Knock out.*

Hipótesis para aplicaciones en terapias antitumorales

A pesar de los continuos esfuerzos para desarrollar una vacuna anti-tumoral con células dendríticas, la frustración surge del hecho de que el ambiente tumoral modifica a las células dendríticas activadas hacia un perfil regulatorio (150). Dirigidas por factores solubles presentes en el microambiente tumoral (IL-10, VEGF, Gal-1) y poblaciones celulares infiltrantes como linfocitos Treg y CMS, las células dendríticas producen IL-27, e IDO y sobreexpresan STAT3 y SOCS1 (124). Esta reprogramación guiada por el tumor favorece la perpetuación de la inmunosupresión y finalmente, del escape tumoral.

Por otro lado, diversos estudios de vacunas antitumorales en ratones y pacientes demuestran que su efectividad depende en gran parte de la inhibición de las CMS (53, 170). En este trabajo presentamos evidencia de una modulación farmacológica de las CMS, que podría ser beneficial para los tratamientos con vacunas anti-tumorales. Dado que las CMS se encuentran en el microambiente tumoral e impiden la correcta erradicación del tumor, la capacidad de modificar a esta población hacia un perfil inflamatorio que favorezca la presentación antigénica podría ser un estímulo importante en la utilización de vacunas con células dendríticas, como un adyuvante. Sin embargo, destacamos que en este trabajo revelamos que la progresión tumoral puede ser impedida por CMS tumorales tratadas con Indo, sin el agregado de otras células presentadoras de antígeno. Las CMS tumorales tratadas con Indo no necesitan ser estimuladas con antígenos tumorales para ejercer su función anti-tumoral, lo que podría ser un beneficio frente a la vacunación con células dendríticas, ya que significa que no es necesario conocer el fenotipo de HLA de los pacientes, problema que sí se presenta frecuentemente en la mayoría de los protocolos de vacunación con células dendríticas (171).

Otra razón por la que suelen fallar las vacunas con células dendríticas es la incapacidad de los linfocitos T CD8 de matar células tumorales luego de la presentación antigénica, a causa del ambiente inmunosupresor generado por el tumor (172). En el ensayo de transferencia adoptiva utilizando $CMS_{tum+Indo}$, encontramos que la inhibición en la progresión tumoral se acompañaba de un

aumento de linfocitos T CD8 en los GDT y en el sitio del tumor, así como de una disminución de CMS en el ganglio y un aumento de CMS GR1^{high} en bazo. Estos resultados describen un ambiente propenso a la presentación antigénica y la inhibición del crecimiento del tumor.

Neutralizar la población de CMS puede mejorar los efectos de las inmunoterapias anti-tumorales y ciertamente los tratamientos con gemcitabina y sunitinib han mostrado resultados prometedores (173, 174, 175). Sin embargo, nosotros demostramos que no es necesario eliminar la población CMS, si no que podría ser beneficioso usarla a favor de la terapia antitumoral, modulando su perfil inflamatorio.

Si bien los macrófagos asociados a tumor (TAM) suelen relacionarse con un efecto pro-tumoral, existe una línea de trabajo que estudia la modulación de estos macrófagos, como herramienta para impedir la progresión tumoral (176, 177, 178). La razón de esta idea radica en la capacidad de los leucocitos de infiltrar el tumor y, con el microambiente adecuado, transformarse en una potente herramienta para destruirlo, a causa de un cambio de perfil de los macrófagos de M2 a M1. Hemos visto que las CMS también pueden ser moduladas e, interesantemente, el efecto del tratamiento con Indo ya sea *in vivo* o *in vitro* sobre el perfil de las CMS es irreversible tanto en ambientes tumorales (transferencia adoptiva) e inflamatorios no tumorales (EAE).

El hecho de que las CMS tumorales puedan ser distintas de aquellas originadas durante otras patologías inflamatorias crónicas o agudas, aún está en discusión (120); sin embargo están apareciendo trabajos que describen comportamientos diferentes de CMS tumorales y CMS inflamatorias en cuanto a su capacidad de inhibir la proliferación de linfocitos T (179).

En esta tesis mostramos por primera vez evidencia experimental de la diferencia entre el perfil de las CMS tumorales y de aquellas que se expanden durante otros desordenes inflamatorios. Nosotros encontramos que responden de manera completamente diferente frente al tratamiento con el mismo agente antiinflamatorio, Indo. Evidencias previas del efecto dual de un AINE como el celecoxib, muestran como el tratamiento con este agente en pacientes modifica en las células tumorales genes cuyos productos participan de mecanismos inflamatorios y de transformación maligna, pero no en las células normales

adyacentes (180), demostrando que un AINE puede tener efectos duales sobre diferentes tipos celulares.

Los resultados que se desprenden de esta tesis muestran cómo la misma población celular parece tener la habilidad de adoptar funciones inmunosupresoras o inmuno-estimuladoras dependiendo de la presencia de un microambiente inflamatorio o tumoral, y esto sucede a pesar de su posible origen común en la médula ósea.

Este hecho pone en evidencia la importancia que posee el microambiente en el que se diferencian las poblaciones celulares, ya que el mismo puede determinar el perfil dicha población celular y, por lo tanto, el resultado de un tratamiento farmacológico. Haciendo hincapié en el cuidado que se debe tener a la hora de elegir condiciones de cultivo determinadas para realizar experimentos funcionales.

CONCLUSIONES

Estudios emergentes han destacado el uso de las AINEs no sólo para el tratamiento de desórdenes inflamatorios crónicos y agudos, sino como una posible terapia anti-tumoral (80, 181, 182). Sin embargo los mecanismos subyacentes a este efecto dual encontrado en el tratamiento con AINE aún son desconocidos. En esta tesis proveemos evidencia que apoya el uso de AINEs en cáncer y en enfermedades inflamatorias crónicas. Las Células Mieloides Supresoras fueron descubiertas tanto en cáncer como en enfermedades inflamatorias. Mientras que en el estudio de las terapias anti-tumorales, el objetivo es erradicar esta población para potenciar la respuesta inmunológica anti-tumoral y contrarrestar las estrategias de escape tumoral; en autoinmunidad, en sepsis o traumas las CMS pueden ser utilizadas como una herramienta terapéutica para frenar la respuesta inflamatoria exacerbada. En la presente tesis encontramos un efecto dual de indometacina sobre las CMS, que depende del microambiente en el que esta población se diferencia y de la condición patológica que se está tratando. Mientras que la capacidad de la indometacina de tratar respuestas inflamatorias crónicas podría residir en la habilidad de este agente de aumentar la actividad regulatoria de las CMS normales; su efecto anti-tumoral durante la progresión tumoral podría ser explicado, al menos en parte, a través de su rol inhibitorio sobre la capacidad supresora de las CMS tumorales. Estos resultados proveen nuevas evidencias del mecanismo de acción de la indometacina tanto como regulador de la inflamación y como inhibidor del desarrollo tumoral (C-1).

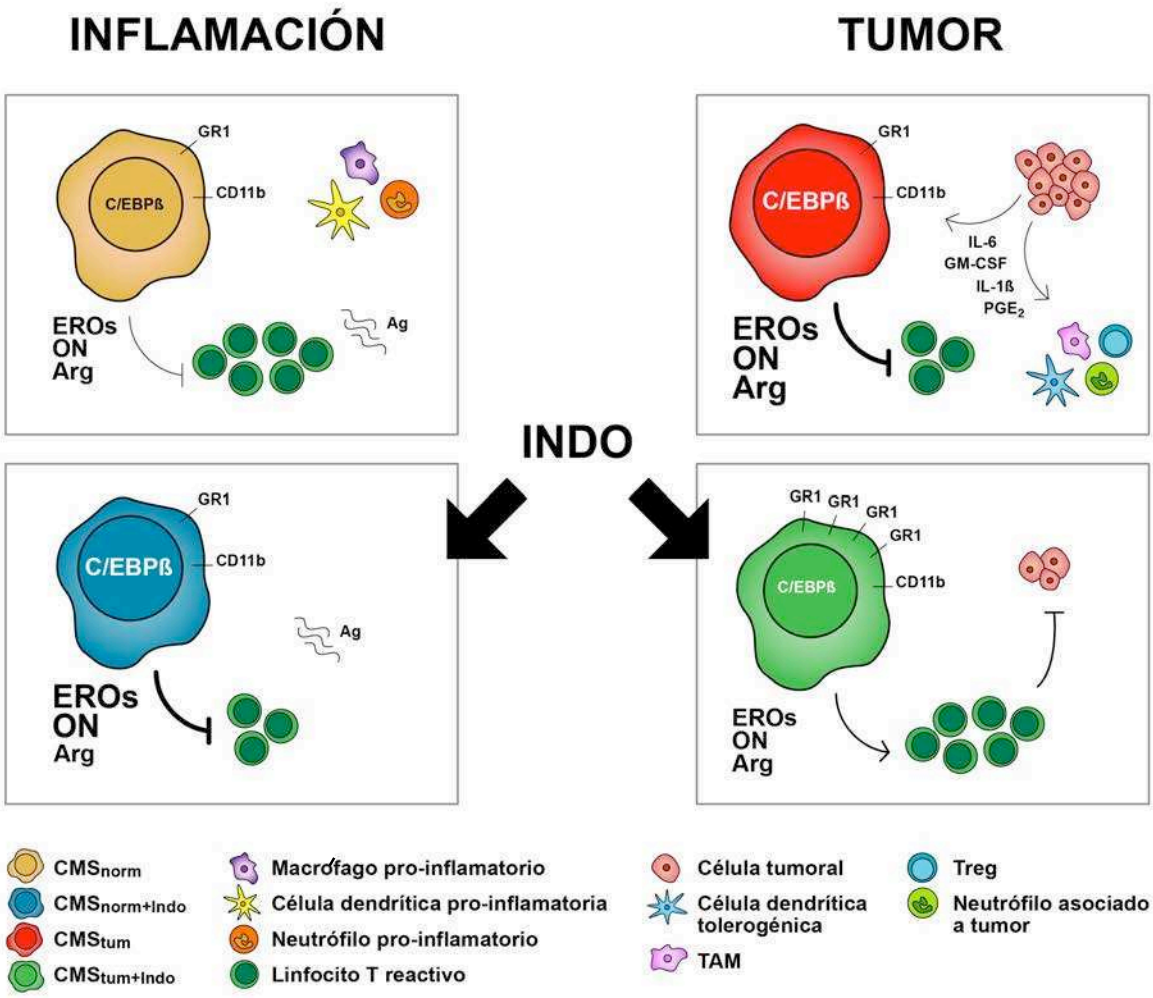


Figura C-1. Indometacina como regulador de la inflamación y supresor del desarrollo tumoral. INFLAMACIÓN: Las CMS se acumulan frente a un antígeno (Ag) inflamatorio, junto con otras células de origen mieloide en distintos estados de maduración (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas). Frente a los estímulos inflamatorios, las CMS producen ON, EROs y activan el metabolismo de la enzima Arginasa (Arg) para regular la proliferación de linfocitos T reactivos. INFLAMACIÓN+INDO: Indo aumenta en CMS normales la expresión de CEBP/β, la producción de ON y EROs, esto aumenta la capacidad supresora sobre la proliferación de linfocitos T reactivos y favorece la resolución de la inflamación. TUMOR: Los mediadores inflamatorios producidos por el tumor (GM-CSF, IL-1β, IL-6, PGE_2) inducen la acumulación de CMS con una alta expresión de CEBP/β, y alta producción de ON y EROs, así como alta actividad arginasa. Al mismo tiempo los mismos factores, generan células dendríticas regulatorias, Treg, y neutrófilos y macrófagos asociados a tumores. Este ambiente inhibe a los linfocitos T responsables de la respuesta anti-tumoral. TUMOR+INDO: Indo aumenta en CMS tumorales la expresión del marcador GR1, disminuye la expresión de CEBP/β , la expresión de ON y EROs y la actividad

arginasa. Este cambio en el perfil de las CMS tumorales permite una correcta respuesta inmunológica anti-tumoral e impide la progresión del tumor.

BIBLIOGRAFÍA

1) Cancer facts and figures, 2012. National Home Office: American Cancer Society Inc.
2) Prevención del cáncer: estrategias basadas en la evidencia, 2006. Union Internationale Contre le Cancer.
3) Matos E. y col. Atlas de mortalidad por cáncer, Argentina 1997-2001.
4) Larsen JE, Minna JD Molecular biology of lung cancer: clinical implications. Clin Chest Med. 2011 Dec; 32(4):703-40.
5) Schwartz. Paul Ehrlich's Magic Bullets n engl j med 350;11 march 11, 2004.
6) Ehrlich, P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy. Cytokine Ned. Tijdschr. Geneeskd. *5*, 273–290 (1909).
7) Stutman O. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. Science. 1974 Feb 8;183(4124):534-6.
8) Gavin P. Dunn, Lloyd J. Old, and Robert D. Schreiber The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting Immunity, Vol. 21, 137–148, August, 2004,
9) Harris CC. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. Cancer Res. 1991 Sep 15;51 (18 Suppl):5023s-5044s.
10) Gomez D, Alonso D., Introducción a la Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes, 1999.
11) Venkitaraman AR. A growing network of cancer susceptibility genes. N Engl J Med. 2003 May 8;348(19):1917-9.
12) Hanahan D Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer *Cell*, Vol. 100, No. 1. (7 January 2000), pp. 57-70
13) Müller-Hübenthal B, Azemar M, Lorenzen D, Huber M, Freudenberg MA, Galanos C, Unger C, Hildenbrand B Tumour Biology: tumour-associated inflammation versus antitumor immunity. Anticancer Res. 2009 Nov;29 (11):4795-805.
14) Schäfer M, Werner S Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 Aug;9 (8):628-38.
15) Aggarwal BB, Vijayalekshmi RV, Sung B Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. Clin Cancer Res. 2009 Jan 15;15(2):425-30.
16) Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. Carcinogenesis 2009;30:1073–1081;
17) Grivennikov, 2010, Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C. & Mantovani, A. The yin-yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. Immunol. Rev. 2008, 222, 155–161.
18) Mantovani,A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. Nature, 2008, 454, 436–444.
19) Soucek L, Lawlor ER, Soto D, Shchors K, Swigart LB, Evan GI. Mast cells are required for angiogenesis and macroscopic expansion of Myc-induced pancreatic islet tumors. Nat Med 2007;13:1211–1218.

20) Sparmann A, Bar-Sagi D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. Cancer Cell 2004;6:447–458.

21) Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011 Mar 4; 144(5):646-74.

22) Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFN gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. Nature. 2001 Apr 26;410:1107-11.

23) Cuenca A, Cheng F, Wang H, Brayer J, Horna P, Gu L, Bien H, Borrello IM, Levitsky HI, Sotomayor EM. Extra-lymphatic solid tumor growth is not immunologically ignored and results in early induction of antigen-specific T-cell anergy: dominant role of cross-tolerance to tumor antigens. Cancer Res 2003;63:9007–9015.

24) Lee PP, Yee C, Savage PA, Fong L, Brockstedt D, Weber JS, Johnson D, Swetter S, Thompson J, Greenberg PD, Roederer M, Davis MM. Characterization of circulating T cells specific for tumorassociated antigens in melanoma patients. Nat Med 1999;5:677–685.

25) Drake CG, Doody AD, Mihalyo MA, Huang CT, Kelleher E, Ravi S, Hipkiss EL, Flies DB, Kennedy EP, Long M, McGary PW, Coryell L, Nelson WG, Pardoll DM, Adler AJ. Androgen ablation mitigates tolerance to a prostate/prostate cancer-restricted antigen. Cancer Cell 2005;7:239–249.

26) Staveley-O'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J, Borrello I, HwangL, Fein S, Pardoll D, Levitsky H. Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Feb 3;95(3):1178-83.

27) Zhou G, Drake CG, Levitsky HI. Amplification of tumor-specific regulatory T cells following therapeutic cancer vaccines. Blood 2006;107:628–636. [PubMed: 16179369]

28) Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstein B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. Clin Cancer Res. 2003 Feb;9(2):606-12.

29) Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., and Enk, A. H. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. J. Exp. Med., *193:* 1285–1294, 2001.

30) Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T., and Schuler, G. *Ex vivo* isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. J. Exp. Med., *193:* 1303–1310, 2001.

31) Stephens, L. A., Mottet, C., Mason, D., and Powrie, F. Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity *in vitro*. Eur. J. Immunol., *31:* 1247–1254, 2001.

32) Sotomayor, E. M., I. Borrello, E. Tubb, F. M. Rattis, H. Bien, Z. Lu, S. Fein, S. Schoenberger, and H. I. Levitsky. 1999. Conversion of tumor-specific CD4_T-cell tolerance to T-cell priming through in vivo ligation of CD40. *Nat. Med.* 5: 780–787.

33) Schinecker, C., McHugh, R., Shevach, E. M., and Germain, R. Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. J. Exp. Med., *196:* 1079–1090, 2002

34) Belz, G., Behrens, G. M. N., Smith, C., Miller, J. F. A. P., Jones, C., Lejon, K., C. G., F., Mueller, S., Shortman, K., Carbone, F., and Heath, W. R. The CD8+ dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens. J. Exp. Med., *196:* 1099–1104, 2002.

35) Munn, D., Sharma, M., Lee, J., Jhaver, K., Jonhson, T., Keskin, D., Marshall, B., Chandler, P., Antonia, S., Burgess, R., Slingluff, C., and Mellor, A. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. Science (Wash. DC), *297:* 1867–1870, 2002.

36) Kao J, Ko EC, Eisenstein S, Sikora AG, Fu S, Chen SH. Targeting immune suppressing myeloid-derived suppressor cells in oncology. Crit Rev Oncol Hematol. 2011 Jan;77(1):12-9.

37) Serafini P, De Santo C, Marigo I, Cingarlini S, Dolcetti L, Gallina G, Zanovello P, Bronte Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells. V. Cancer Immunol Immunother. 2004 Feb;53(2):64-72.

38) Sinha P, Clements VK, Ostrand-Rosenberg S. Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease. J Immunol. 2005 Jan 15;174(2):636-45

39) Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. Nat Rev Immunol. 2009 Mar;9(3):162-74.

40) Gabrilovich DI, Bronte V, Chen SH, Colombo MP, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S, Schreiber H. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. Cancer Res. 2007 Jan 1;67(1):425;

41) Almand, B. *et al.* Increased production of immature myeloid cells in cancer patients. A mechanism of immunosuppression in cancer. *J. Immunol.* 2001, 166, 678–689.

42) Ochoa AC, Zea AH, Hernandez C, Rodriguez PC. Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 13, 721s–726s (2007).

43) Schmielau, J. & Finn, O. J. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of T-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res.* 2001 61, 4756–4760.

44) Bronte V, Apolloni E, Cabrelle A, Ronca R, Serafini P, Zamboni P, Restifo NP, Zanovello P. Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+)T cells.Blood. 2000 Dec 1;96(12):3838-46.

45) V. De Wilde N. Van Rompaey M. HillbJ. F. Lebrun P. Lemaıˆtre, F. LhommeEndotoxin-Induced Myeloid-Derived Suppressor Cells Inhibit Alloimmune Responses via Heme Oxygenase-1.*American Journal of Transplantation 2009; 9: 2034–2047*

46) Collazo MM, Wood D, Paraiso KH, et al. SHIP limits immunoregulatory capacity in the T-cell compartment. Blood 2009;113:2934–44

47) Bing Zhu, Yoshio Bando, Sheng Xiao, Kaiyong Yang, Ana C. Anderson, Vijay K. Kuchroo, and Samia J. Khoury. CD11b_Ly-6Chi Suppressive Monocytes in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology,* 2007, 179: 5228–5237.

48) Delano MJ, Scumpia PO, Weinstein JS, Coco D, Nagaraj S, Kelly-Scumpia KM, et al. MyD88-dependent expansion of an immature GR1(+) CD11b (+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. J Exp Med. 2007 Jun 11;204(6):1463-74.

49) Subhra K Biswas & Alberto Mantovani Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm .Nat Immunol. 2010 Oct;11(10):889-96

50) Rodriguez PC, Quiceno DG, Ochoa AC.L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. Blood. 2007 Feb 15;109(4):1568-73.

51) Rodriguez PC, Zea AH, Culotta KS, Zabaleta J, Ochoa JB, Ochoa AC. Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. J Biol Chem. 2002 Jun 14;277(24):21123-9.

52) Ostrand-Rosenberg. Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity Cancer Immunol Immunother 2010, 59:1593–1600

53) Srivastava MK, Zhu L, Harris-White M, Kar U, Huang M, Johnson MF, Lee JM, Elashoff D, Strieter R, Dubinett S, Sharma S.Myeloid suppressor cell depletion augments antitumor activity in lung cancer. PLoS One. 2012;7(7):e40677

54) Bingisser RM, Tilbrook PA, Holt PG, Kees UR. J Immunol.Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. 1998 Jun 15;160(12):5729-34.

55) Harari O, Liao JK. Inhibition of MHC II Gene Transcription by Nitric Oxide and Antioxidants *Curr Pharm Des*. 2004 ; 10(8): 893–898.

56) Rivoltini Carrabba Huber Castelli Novellino et al. Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte–tumor cell interaction. Immunol Rev. 2002 Oct;188:97-113.

57) Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, Kinarsky L, Sherman S, Kang Herber DL, Schneck J, GabrilovichDI. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. Nat Med. 2007 Jul;13(7):828-35.

58) Dietlin TA, Hofman FM, Lund BT, Gilmore W, Stohlman SA, van der Veen RC.Mycobacteria-induced Gr-1+ subsets from distinct myeloid lineages have opposite effects on T cell expansion. J Leukoc Biol. 2007 May;81(5):1205-12.

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

60) Huang B, Pan PY, Li Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J, Divino CM, Chen SH Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host.. Cancer Res. 2006 Jan 15;66(2):1123-31.

61) Gallina G, Dolcetti L, Serafini P, De Santo C, Marigo I, Colombo MP, Basso G, Brombacher F, Borrello I, Zanovello P, Bicciato S, Bronte Tumors induce a subset of inflammatory

monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. V.J Clin Invest. 2006 Oct;116(10):2777-90.

62) Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, Carbone DP, Gabrilovich DI Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. Clin Cancer Res. 2000 May;6(5):1755-66

63) Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. J Immunol. 2009 Apr 15;182(8):4499-506.

64) Yang, DeBusk, Fukuda, Fingleton et al. Expansion of myeloid immune suppressor Gr1CD11b cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. J Immunol. 2012 Nov 1;189(9):4295-304.

65) Serafini P, Meckel K, Kelso M, Noonan K, Califano J, Koch W, Dolcetti L, Bronte V, Borrello I.Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. J Exp Med. 2006 Nov 27;203(12):2691-702.

66) Huang M, Sharma S, Mao JT, Dubinett SM. Non-small cell lung cancer-derived soluble mediators and prostaglandin E2 enhance peripheral blood lymphocyte IL-10 transcription and protein production. J Immunol. 1996 Dec 15;157(12):5512-20.

67) Chandrasekharan NV, Simmons DL. The cyclooxygenases. Genome Biol. 2004;5(9):241

68) Kang, Mbonye, DeLong, Wada, Smith Regulation of Intracellular Cyclooxygenase Levels by Gene Transcription and Protein Degradation.Prog Lipid Res. 2007 March ; 46(2): 108–125

69) Hosomi Y, Yokose T, Hirose Y, Nakajima R, Nagai K, Nishiwaki Y, Ochiai A. Increased cyclooxygenase 2 (COX2) expression occurs frequently in precursor lesions of hu manadenocarcinoma of the lung. Lung Cancer. 2000 Nov;30(2):73-81.

70) Lin, Lee, Yang, Ho, and Kuo. Cyclooxygenase-2 Inducing Mcl-1-dependent Survival Mechanism in Human Lung Adenocarcinoma CL1.0 Cells THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 276, No. 52, Issue of December 28, pp. 48997–49002, 2001

71) Tsujii and DuBois Alterations in Cellular Adhesion and Apoptosis in Epithelial Cells Overexpressing Prostaglandin Endoperoxide Synthase 2.Cell, Vol. 83, 493-501, November 3, 1995.

72) Masferrer, Leahy, Koki, Zweifel et al. Antiangiogenic and Antitumor Activities of Cyclooxygenase-2 Inhibitors. CANCER RESEARCH 60, 1306–1311, March 1, 2000

73) Tsujii, Kawano, Tsuji, Sawaoka, Hori, and DuBois. Cyclooxygenase Regulates Angiogenesis Induced by Colon Cancer Cells. Cell, Vol. 93, 705–716, May 29, 1998.

74) Dohadwala M, Batra RK, Luo J, Lin Y, Krysan K, Pold M, Sharma S, Dubinett SM Autocrine/paracrine prostaglandin E2 production by non-small cell lung cancer cells regulates matrix metalloproteinase-2 and CD44 in cyclooxygenase-2-dependent invasion.. J Biol Chem. 2002 Dec 27;277(52):50828-33.

75) Rodriguez PC, Hernandez CP, Quiceno D, Dubinett SM, Zabaleta J, Ochoa JB, Gilbert J, Ochoa AC Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma..J Exp Med. 2005 Oct 3;202(7):931-9.

76) Sharma S, Yang SC, Zhu L *et al.* Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin E2-dependent promotion of FOXP3 expression and CD4+ CD25+ T regulatory cell activities in lung cancer. *Cancer Res.* 65(12), 5211–5220 (2005)

77) Thun MJ, Henley SJ, Patrono C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. J Natl Cancer Inst 2002;94:252–66.

78) Habeeb AG, Praveen Rao PN, Knaus EE. Design and synthesis of celecoxib and rofecoxib analogues as selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: replacement of sulfonamide and methylsulfonyl pharmacophores by an azido bioisostere. J Med Chem 2001;44:3039-42.

79) Smalley WE, DuBois RN. Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Adv Pharmacol 1997;39:1-20.

80) Gupta RA, DuBois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. Nat Rev Cancer 2001;1:11-21.

81) Fang HY, Lin TS, Lin JP, Wu YC, Chow KC, Wang LS. Cyclooxygenase-2 in human non-small cell lung cancer. Eur J Surg Oncol 2003;29:171-7.

82) Kerlikowske K, Molinaro AM, Gauthier ML, Berman HK, Waldman F, Bennington J, et al. Biomarker expression and risk of subsequent tumors after initial ductal carcinoma in site diagnosis. J Natl Cancer Inst 2010;102:627-37.

83) Miglietta A, Toselli M, Ravarino N, Vencia W, Chiecchio A, Bozzo F, et al. COX-2 expression in human breast carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. Expert Opin Ther Targets 2010;14:655-64.

84) Frasor J, Weaver AE, Pradhan M, Mehta K. Synergistic up-regulation of prostaglandin E synthase expression in breast cancer cells by 17beta-estradiol and proinflammatory cytokines. Endocrinology 2008;149:6272-9.

85) Sauter ER, Qin W, Hewett JE, Ruhlen RL, Flynn JT, Rottinghaus G, et al. Celecoxib concentration predicts decrease in prostaglandin E2 concentrations in nipple aspirate fluid from high risk women. BMC Cancer 2008;8:49.

86) Zheng Y, Ritzenthaler JD, Sun X, Roman J, Han S. Prostaglandin E2 stimulates human lung carcinoma cell growth through induction of integrin-linked kinase: the involvement of EP4 and Sp1. Cancer Res 2009;69:896-904.

87) Benamouzig R, Uzzan B, Martin A, Deyra J, Little J, Girard B, et al. Cyclooxygenase-2 expression and recurrence of colorectal adenomas: effect of aspirin chemoprevention. Gut 2010;59:622-9.

88) Ghosh N, Chaki R, Mandal V, Mandal SC. COX-2 as a target for cancer chemotherapy. Pharmacol Rep 2010;62:233-44.

89) Kaltoft N, Tilotta MC, Witte AB, Osbak PS, Poulsen SS, Bindslev N, et al. Prostaglandin E2-induced colonic secretion in patients with and without colorectal neoplasia. BMC Gastroenterol 2010;10:9.

90) Araki Y, Okamura S, Hussain SP, Nagashima M, He P, Shiseki M, et al. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the Wnt and ras pathways. Cancer Res 2003;63:728-34.

91) Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, et al. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. Carcinogenesis 2009;30:377-86.

92) Lee JJ, Natsuizaka M, Ohashi S, Wong GS, Takaoka M, Michaylira CZ, et al. Hypoxia activates the cyclooxygenase-2-prostaglandin E synthase axis. Carcinogenesis 2010;31:427-34.

93) Castelao, Bart III, DiPerna, Sievers, Bremner. Lung Cancer and Cyclooxygenase-2. Ann Thorac Surg 2003;76:1327–35

94) Duperron C, Castonguay A. Chemopreventive efficacies of aspirin and sulindac against lung tumorigenesis in A/J mice. Carcinogenesis 1997;18:1001–6.

95) Bahra A., Other primary headaches Ann Indian Acad Neurol. 2012 August; 15(Suppl 1): S66–S71

96) Levin G, Kariv N, Khomiak E, et al. Indomethacin inhibits the accumulation of tumor cells in mouse lungs and subse quent growth of lung metastases. Chemotherapy 2000;46: 429–37.

97) Eli Y, Przedecki F, Levin G, Kariv N, Raz A. Comparative effects of indomethacin on cell proliferation and cell cycle progression in tumor cells grown in vitro and in vivo. Biochem Pharmacol. 2001 Mar 1;61(5):565-71.

98) Jukić MK, Luetić AT, Skudar-Lukinović V, Andreis I.The antimetastatic effect of macrophages restored by indomethacin: concomitant tumor immunity model. Coll Antropol. 2010 Sep;34(3):899-904.

99) Sinha P, Clements VK, Fulton AM, Ostrand-Rosenberg S. Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. Cancer Res. 2007 May 1;67(9):4507-13.

100) Diament MJ, Garcìa C, Stillitani I, Saavedra VM, Manzur T, Vauthay L, Klein S.Spontaneous murine lung adenocarcinoma (P07): A new experimental model to study paraneoplastic syndromes of lung cancer. Int J Mol Med. 1998 Jul;2(1):45-50

101) Urtreger AJ, Diament MJ, Ranuncolo SM, Del C Vidal M, Puricelli LI, Klein SM, De Kier Joffe ED New murine cell line derived from a spontaneous lung tumor induces paraneoplastic syndromes. Int J Oncol. 2001 Mar;18(3):639-47.

102) Collins, L.G., et al., Lung cancer: diagnosis and management. Am Fam Physician, 2007. 75(1): p. 56-63.

103) THE DUAL ROLE OF INFLAMMATION IN CANCER GUILLERMO D. PELUFFO, MIRIAM J. DIAMENT, SLOBODANKA KLEIN MEDICINA (Buenos Aires) 2007; 67 (Supl. II): 55-59

104) Rabinovich, Gabrilovich, Sotomayor IMMUNOSUPPRESSIVE STRATEGIES THAT ARE MEDIATED BY TUMOR CELLS. Annu Rev Immunol. 2007; 25: 267–296.

105) Amin R, Kamitani H, Sultana H, Taniura S, Islam A, Sho A, Ishibashi M, Eling TE, Watanabe T. Aspirin and indomethacin exhibit antiproliferative effects and induce apoptosis in T98G human glioblastoma cells. Neurol Res. 2003 Jun;25(4):370-6.

106) Hull MA, Gardner SH, Hawcroft G Activity of the non-steroidal anti-inflammatory drug indomethacin against colorectal cancer. Cancer Treat Rev. 2003 Aug;29(4):309-20.

107) Peluffo GD, Stillitani I, Rodríguez VA, Diament MJ, Klein SM. Reduction of tumor progression and paraneoplastic syndrome development in murine lung adenocarcinoma by nonsteroidal antiinflammatory drugs. Int J Cancer. 2004 Jul 20;110(6):825-30.

108) Munder, Eichman, Modolell. Alternative Metabolic States in Murine Macrophages Reflected by the Nitric Oxide Synthase/Arginase Balance: Competitive Regulation by CD4+ T Cells Correlates with Th1/Th2 Phenotype. The Journal of Immunology, 1998, 160: 5347-5354.

109) Stromnes IM, Goverman JM. Nat Protoc. 2006;1(4):1810-9.Active induction of experimental allergic encephalomyelitisSourceDepartment of Immunology, University of Washington, Box 357650, 1959 NE Pacific Street, Seattle, Washington 98195-7650, USA

110) Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. Anal Biochem. 1982 Oct;126(1):131-8.

111) Rodriguez PC, Quiceno DG, Zabaleta J, Ortiz B, Zea AH, Piazuelo MB, et al. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. Cancer Res. 2004 Aug 15;64(16):5839-49.

112) Parma M, Diament M, García C, Piccinni E, Mondelo N, Klein S Mechanisms of paraneoplastic syndromes in mice bearing a spontaneous lung adenocarcinoma..Tumour Biol. 1999 Nov-Dec;20(6):304-11.

113) Bunt SK, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S.Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression. J Immunol. 2006 Jan 1;176(1):284-90.

114) Barreda DR, Hanington PC, Belosevic M Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors.. Dev Comp Immunol. 2004 May 3;28(5):509-54.

115) Raychaudhuri, Rayman, Ireland, Ko, Rini, Borden, Garcia, Vogelbaum, Finke. Myeloid-derived suppressor cell accumulation and function in patients with newly diagnosed glioblastoma. *Neuro Oncol* (2011) 13(6): 591-599

116) Cuervo H, Guerrero NA, Carbajosa S, Beschin A, De Baetselier P, Gironès N, Fresno M. J Myeloid-derived suppressor cells infiltrate the heart in acute Trypanosoma cruzi infection. Immunol. 2011 Sep 1;187(5):2656-65.

117) Black CA. Delayed type hypersensitivity: current theories with an historic perspective. Dermatol Online J. 1999 May;5(1):7

118) Youn JI, Collazo M, Shalova IN, Biswas SK, Gabrilovich DI. Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. J Leukoc Biol. 2012 Jan;91(1):167-81.

119) Pan PY, Ma G, Weber KJ, Ozao-Choy J, Wang G, Yin B, Divino CM, Chen SH. Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell

activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer. Cancer Res. 2010 Jan 1;70(1):99-108

120) Cuenca AG, Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, Moreno C, Scumpia PO, Laface DM, Heyworth PG, Efron PA, Moldawer LL A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma..Mol Med. 2011 Mar-Apr;17(3-4):281-92. doi: 10.2119/molmed.2010.00178.

121) Makarenkova VP, Bansal V, Matta BM, Perez LA, Ochoa JB.CD11b+/Gr-1+ myeloid suppressor cells cause T cell dysfunction after traumatic stress. J Immunol. 2006 Feb 15;176(4):2085-94.

122) Marigo I, Bosio E, Solito S, Mesa C, Fernandez A, Dolcetti L, Ugel S, Sonda N, Bicciato S, Falisi E, Calabrese F, Basso G, Zanovello P, Cozzi E, Mandruzzato S, Bronte V Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBPbeta transcription factor..Immunity. 2010 Jun 25;32(6):790-802. Epub 2010 Jun 3.

123) Starossom SC, Mascanfroni ID, Imitola J, Cao L, Raddassi K, Hernandez SF, Bassil R, Croci DO, Cerliani JP, Delacour D, Wang Y, Elyaman W, Khoury SJ, Rabinovich GA Galectin-1 deactivates classically activated microglia and protects from inflammation-induced neurodegeneration.. Immunity. 2012 Aug 24;37(2):249-63. doi: 10.1016/j.immuni.2012.05.023.

124) Ilarregui JM, Croci DO, Bianco GA, Toscano MA, Salatino M, Vermeulen ME, Geffner JR, Rabinovich GA. Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. Nat Immunol. 2009 Sep;10(9):981-91.

125) Gong Y, Wang Z, Liang Z, Duan H, Ouyang L, Yu Q, Xu Z, Shen G, Weng X, Wu X Soluble MOG35-55/I-A(b) Dimers Ameliorate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Reducing Encephalitogenic T Cells.. PLoS One. 2012;7(10):e47435. doi: 10.1371/journal.pone.0047435

126) Shin T, Ahn M, Matsumoto Y.Mechanism of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats: recent insights from macrophages. Anat Cell Biol. 2012 Sep;45(3):141-8. doi: 10.5115/acb.2012.45.3.141.

127) Watanabe H, Numata K, Ito T, Takagi K, Matsukawa A Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains.. shock. 2004 Nov;22(5):460-6.

128) Mantovani,A. et al. Cancer-related inflammation. Nature, 2008, 454, 436–444.

129) Borrello,M.G. et al. (2005) Induction of a proinflammatory program in normal human thyrocytes by the RET/PTC1 oncogene. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 102, 14825–14830.

130) Mantovani,A. (2009) Cancer: inflaming metastasis. Nature, 457, 36–37.

131) Voronov, E., Shouval, D. S., Krelin, Y., Cagnano, E., Benharroch, D., Iwakura, Y., Dinarello, C. A. & Apte, R. N. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 2645–2650.

132) Vidal-Vanaclocha, F., Alvarez, A., Asumendi, A., Urcelay, B., Tonino, P. & Dinarello, C. A. (1996) *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 198–205

133) Greten, F. R., Eckmann, L., Greten, T. F., Park, J. M., Li, Z. W., Egan, L. J., Kagnoff, M. F. & Karin, M. (2004) *Cell* 118, 285–296.

134) Pikarsky, E., Porat, R. M., Stein, I., Abramovitch, R., Amit, S., Kasem, S., Gutkovich-Pyest, E., Urieli-Shoval, S., Galun, E. & Ben Neriah, Y. (2004) *Nature* 431, 461–466.

135) Balkwill, F., Charles, K. A. & Mantovani, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. (2005) *Cancer Cell* 3, 211–21

136) Dilek N, Vuillefroy de Silly R, Blancho G, Vanhove B. Front Myeloid-derived suppressor cells: mechanisms of action and recent advances in their role in transplant tolerance. Immunol. 2012;3:208.

137) Condamine T, Gabrilovich DI. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. Trends in immunology. 2011;32(1):19–25

138) Ezernitchi A. V., Vaknin I., Cohen-Daniel L., Levy O., Manaster E., Halabi A., Pikarsky E., Shapira L., Baniyash M. (2006). TCR zeta down-regulation under chronic inflammation is mediated by myeloid suppressor cells differentially distributed between various lymphatic organs.J. Immunol. 177 4763– 4772.

139) Cauley L. S., Miller E. E., Yen M., Swain S. L.. Superantigen-induced CD4 T cell tolerance mediated by myeloid cells and IFN-gamma. J. Immunol. 2000, 165 6056–6066.

140) Bobe P., Benihoud K., Grandjon D., Opolon P., Pritchard L. L., Huchet R.. Nitric oxide mediation of active immunosuppression associated with graft-versus-host reaction. Blood 1999, 941028–1037.

141) Subiza JL, Viñuela JE, Rodriguez R, Gil J, Figueredo MA, De La Concha EG.Development of splenic natural suppressor (NS) cells in Ehrlich tumor-bearing mice. Int J Cancer. 1989 Aug 15;44(2):307-14

142) Bronte V, Chappell DB, Apolloni E, Cabrelle A, Wang M, Hwu P, Restifo NP. Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation.

J Immunol. 1999 May 15;162(10):5728-37.

143) Gabrilovich DI, Velders MP, Sotomayor EM, Kast WM. Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. J Immunol. 2001 May 1;166(9):5398-406

144) Young MR, Newby M, Wepsic HT Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. Cancer Res. 1987 Jan 1;47(1):100-5.

145) Zea AH, Rodriguez PC, Atkins MB, Hernandez C, Signoretti S, Zabaleta J, McDermott D, Quiceno D, Youmans A, O'Neill A, Mier J, Ochoa AC. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. Cancer Res. 2005 Apr 15;65(8):3044-8

146) Fujita, Kohanbash, Fellows-Mayle, Hamilton, Komohara, Decker, Ohlfest, Okada COX-2 blockade suppresses gliomagenesis by inhibiting myeloid-derived suppressor cells Cancer Res. Cancer Res. 2011 April 1; 71(7): 2664–2674.

147) Obermajer N, Muthuswamy R, Odunsi K, Edwards RP, Kalinski P. PGE(2)-induced CXCL12 production and CXCR4 expression controls the accumulation of human MDSCs in ovarian cancer environment. Cancer Res. 2011 Dec 15;71(24):7463-70.

148) Guan H, Singh NP, Singh UP, Nagarkatti PS, Nagarkatti M Resveratrol prevents endothelial cells injury in highdose **interleukin**2 therapy against melano ma. PLoS One. 2012; 7(4): e35650.

149) Veltman, Lambers, Nimwegen, Hendriks, Hoogsteden, Aerts, Hegmans COX-2 inhibition improves immunotherapy and is associated with decreased numbers of myeloid-derived suppressor cells in mesothelioma. Celecoxib influences MDSC function. BMC Cancer. 2010; 10: 464.

150) Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. Nat Rev Immunol. 2012 Mar 22;12(4):253-68

151) Srinivas Nagaraj, Michele Collazo, Cesar A. Corzo, Je-In Youn, Myrna Ortiz, David Quiceno, and Dmitry I. Gabrilovich Regulatory Myeloid Suppressor Cells in Health and Disease. *Cancer Res* 2009;69:7503-7506.

152) Bonzi M, Fiorelli EM; Gruppo di Autoformazione Metodologica (GrAM). Indomethacin prevents post-ERCP pancreatitis in selected high-risk patients. Intern Emerg Med. 2012 Dec;7(6):557-8.

153) MedlinePlus, U.S: National Library of Medicine, National Institutes of health. http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/meds/a681027.html

154) Yi H, Guo C, Yu X, Zuo D, Wang XY. Mouse CD11b+Gr-1+ myeloid cells can promote Th17 cell differentiation and experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol. 2012 Nov 1;189(9):4295-304.

155) Bunt SK, Yang L, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. Reduced inflammation inthe tumor microenvironment delays the accumulation of myelod derived suppressor cells and limits tumor progression. Cancer Res. 2007 Oct 15;67(20):10019-2.

156) Fabbri M, Paone A, Calore F, Galli R, Gaudio E, Santhanam R, Lovat F, Fadda P, Mao C, Nuovo GJ, Zanesi N, Crawford M, Ozer GH, Wernicke D, Alder H,Caligiuri MA, Nana-Sinkam P, Perrotti D, Croce CM. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response.Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jul 31;109(31):E2110-6.

157) Dolcetti L, Peranzoni E, Ugel S, Marigo I, Fernandez Gomez A, Mesa C, Geilich M, Winkels G, Traggiai E, Casati A, Grassi F, BronteV.Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. Eur J Immunol. 2010 Jan;40(1):22-35.

158) Peranzoni E, Zilio S, Marigo I, Dolcetti L, Zanovello P, Mandruzzato S, Bronte V Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition.. Curr Opin Immunol. 2010 Apr;22(2):238-44.

159) Hirai H, Zhang P, Dayaram T, Hetherington CJ, Mizuno S, Imanishi J, Akashi K, Tenen DG. C/EBPbeta is required for 'emergency' granulopoiesis.Nat Immunol. 2006 Jul;7(7):732-9.

160) Pearce EL, Mullen AC, Martins GA, Krawczyk CM, Hutchins AS, Zediak VP, Banica M, DiCioccio CB, Gross DA, Mao CA, Shen H, Cereb N, Yang SY, Lindsten T,Rossant J, Hunter CA, Reiner SL. Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. Science. 2003 Nov 7;302(5647):1041-3.

161) Cruz-Guilloty F, Pipkin ME, Djuretic IM, Levanon D, Lotem J, Lichtenheld MG, Groner Y, Rao A.Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. J Exp Med. 2009 Jan 16;206(1):51-9.

162) Lighvani AA, Frucht DM, Jankovic D, Yamane H, Aliberti J, Hissong BD, Nguyen BV, Gadina M, Sher A, Paul WE, O'Shea JJ.T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells.Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Dec 18;98(26):15137-42.

163) Lazarevic V, Glimcher LH. T-bet in disease. Nat Immunol. 2011 Jun 20;12(7):597-606.

164) Ellis TN, Beaman BL. Murine polymorphonuclear neutrophils produce interferon-gamma in response to pulmonary infection with Nocardia asteroides.J Leukoc Biol. 2002 Aug;72(2):373-81.

165) Safford M, Collins S, Lutz MA, Allen A, Huang CT, Kowalski J, Blackford A, Horton MR, Drake C, Schwartz RH, Powell JDEpub 2005 Apr 17.Egr-2 and Egr-3 are negative regulators of T cell activation. Nat Immunol. 2005 May;6(5):472-80.

166) Carter JH, Tourtellotte WG. Early growth response transcriptional regulators are dispensable for macrophage differentiation. J Immunol. 2007 Mar 1;178(5):3038-47.

167) Kang JM, Park S, Kim SJ, Hong HY, Jeong J, Kim HS, Kim SJ.CBL enhances breast tumor formation by inhibiting tumor suppressive activity of TGF-β signaling. Oncogene. 2012 Dec 13;31(50):5123-31.

168) Rozic JG, Chakraborty C, Lala PK. Cyclooxygenase inhibitors retard murine mammary tumor progression by reducing tumor cell migration, invasiveness and angiogenesis. Int J Cancer 2001;93:497–506.

169) Minter HA, Eveson JW, Huntley S, Elder DJ, Hague A. The cyclooxygenase 2-selective inhibitor NS398 inhibits proliferation of oral carcinoma cell lines by mechanisms dependent and independent of reduced prostaglandin E2 synthesis. Clin Cancer Res 2003;9:1885–97

170) Montero AJ, Diaz-Montero CM, Kyriakopoulos CE, Bronte V, Mandruzzato S. Myeloid-derived suppressor cells in cancer patients: a clinical perspective. J Immunother. 2012 Feb-Mar;35(2):107-15.

171) Song Z, Guo C, Li Y, Tan B, Fan L, Xiao J Enhanced antitumor effects of a dendritic cell vaccine transfected with gastric cancer cell total RNA carrying the 4-1BBL gene in vitro.. Exp Ther Med. 2012 Feb;3(2):319-323.

172) Yujun Huang, Nikolaus Obholzer, Raja Fayad, and Liang Qiao. Turning On/Off Tumor-Specific CTL Response during Progressive Tumor Growth. *J Immunol* 2005; 175:3110-3116.

173) Suzuki, Kapoor, Jassar, Kaiser, Albelda. Gemcitabine Selectively Eliminates Splenic Gr-1+/CD11b+ Myeloid Suppressor Cells inTumor-Bearing Animals and Enhances Antitumor ImmuneActivity. Clin Cancer Res 2005;11(6713 18).

174) Nowak, Robinson, Lake. Gemcitabine Exerts a Selective Effect on the Humoral Immune Response: Implications for Combination Chemo-immunotherapy. CANCER RESEARCH 62, 2353–2358, April 15, 2002

175) Ko JS, Zea AH, Rini BI, Ireland JL, Elson P, Cohen P, Golshayan A, Rayman PA, Wood L, Garcia J, Dreicer R, Bukowski R, Finke JH. Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients. Clin Cancer Res. 2009 Mar 15;15(6):2148-57.

176) Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. Nat Immunol. 2010 Oct;11(10):889-96.

177) Rolny C, Mazzone M, Tugues S, Laoui D, Johansson I, Coulon C, Squadrito ML, et al. HRG inhibits tumor growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization through downregulation of PlGF. Cancer Cell. 2011 Jan 18;19(1):31-44

178) Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, et al. Macrophage polarization in tumour progression. Semin Cancer Biol. 2008 Oct;18(5):349-55.

179) Källberg E, Stenström M, Liberg D, Ivars F, Leanderson T. CD11b+Ly6C++Ly6G- cells show distinct function in mice with chronic inflammation or tumor burden.BMC Immunol. 2012 Dec 12;13:69.

180) Sagiv E, Sheffer M, Kazanov D, Shapira S, Naumov I, Kraus S, Domany E, Arber N. Gene expression following exposure to celecoxib in humans: pathways of inflammation and carcinogenesis are activated in tumors but not normal tissues. Digestion. 2011;84(3):169-84.

181) Amin R, Kamitani H, Sultana H, Taniura S, Islam A, Sho A, Ishibashi M, Eling TE, Watanabe T. Aspirin and indomethacin exhibit antiproliferative effects and induce apoptosis in T98G human glioblastoma cells. Neurol Res. 2003 Jun;25(4):370-6.

182) Hull MA, Gardner SH, Hawcroft G. Activity of the non-steroidal anti-inflammatory drug indomethacin against colorectal cancer. Cancer Treat Rev. 2003 Aug;29(4):309-20